

Université de Montréal

**Les Signaux Post Mortem (SPM) de l'apoptose
endothéliale : des acteurs du remodelage
vasculaire**

par

Isabelle Sirois

Département de Biochimie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Biochimie
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Biochimie

Décembre 2010

© Isabelle Sirois, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

Les Signaux Post Mortem (SPM) de l'apoptose endothéliale : des acteurs du remodelage vasculaire

Présentée par :
Isabelle Sirois

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Nathalie Grandvaux, président-rapporteur
Alexey V. Pshezhetsky, directeur de recherche
Marie-Josée Hébert, co-directeur
Richard Bertrand, membre du jury
Joyce Rauch, examinateur externe
Michel Desjardins, représentant du doyen de la FES

Résumé

L'immunosuppression a permis d'améliorer l'incidence du rejet aigu sans toutefois améliorer significativement le rejet chronique. Celui-ci est caractérisé par une vasculopathie du greffon (VG) similaire à une forme accélérée d'athérosclérose native accompagnée de fibrose. La pathophysiologie de la VG découle de l'hypothèse de réponse à l'insulte proposée par Russell Ross en 1977. Selon son postulat, l'endothélium stressé par des facteurs immunologiques et non immunologiques initie l'apoptose endothéliale suivi d'une réponse de réparation vasculaire via un épaissement myo-intimal aux sites d'insultes. Toutefois, lorsque les stress endothéliaux initiaux demeurent soutenus, l'apoptose endothéliale et la réponse de réparation perpétuent. Compte tenu que l'inhibition de l'apoptose endothéliale bloque le développement de la VG *in vivo*, notre hypothèse de travail reposait sur les répercussions paracrines de l'apoptose endothéliale sur les types cellulaires participant au remodelage vasculaire. Nous avons généré un système expérimental *in vitro* afin d'induire l'apoptose endothéliale en absence significative de nécrose cellulaire. À l'aide d'une approche protéomique multidimensionnelle et comparative, nous avons démontré que les cellules endothéliales apoptotiques exportent spécifiquement 27 signaux post mortem (SPM). Nous avons démontré que certains de ces SPM ont des propriétés anti-apoptotiques (TCTP et EGF), d'autre fibrogénique (CTGF), récapitulant ainsi certains phénotypes cellulaires associés au développement de la VG. Parmi les médiateurs identifiés, 16 n'avaient pas de signal de sécrétion, incluant TCTP, suggérant que des mécanismes de sécrétion non conventionnels soient favorisés durant l'apoptose. Nous avons démontré que la caspase-3 effectrice régule la voie de sécrétion non classique exosomiale associée à l'export extracellulaire de nanovésicules TCTP^{+VE}, anti-apoptotiques et biochimiquement distinctes des corps apoptotiques. Finalement, l'ensemble des données protéomiques ont permis d'émettre l'hypothèse qu'en réponse à un stress apoptotique, la cellule exporte différents médiateurs (solubles et vésiculaires) de manière non conventionnelle nécessitant la fusion d'organelles de la voie endocyttaire et autophagique avec la membrane plasmique. Ce mécanisme serait régulé durant la phase effectrice de l'apoptose permettant ainsi d'initier une réponse de réparation extracellulaire seulement lorsque le destin cellulaire a atteint un point de non retour. Ainsi, le testament protéique et nanovésiculaire légué durant l'apoptose endothéliale pourrait servir simultanément de biomarqueur de la VG et de cible thérapeutique afin de diminuer le remodelage vasculaire pathologique.

Mots-clés : Vasculopathie du greffon, apoptose, protéomique, TCTP, nanovésicules, sécrétion non conventionnelle.

Abstract

Immunosuppression regimens improved steadily the incidence of acute rejection with minimal positive effects on chronic rejection. The latter is characterized by a transplant vasculopathy (TV) similar to native atherosclerosis, accompanied with fibrosis throughout the vascular wall of the allograft. The pathophysiology associated to TV arose from pioneering work of Russell Ross in 1977. He proposed the 'Response to Injury' hypothesis revealing that endothelium injury initiated by immunological and non immunological factors favors a vascular repair response through neo-intima thickening at the sites of cellular injury. However, when endothelial insult is maintained, apoptosis ensues and the vascular repair process perpetuates. Since inhibition of endothelial apoptosis prevents TV development *in vivo*, we hypothesized that endothelial apoptosis regulates the vascular repair process through a paracrine program active on the cellular components of the vessel wall. We have generated an *in vitro* experimental system to induce endothelial apoptosis in absence of necrosis. Using a multifunctional and comparative proteomic approach, we have identified 27 post mortem signals (PMS) specifically exported by apoptotic endothelial cells. Some of these PMS display anti-apoptotic function (TCTP and EGF), whereas CTGF was identified as a fibrogenic factor, recapitulating the cellular events associated to the development of TV. Interestingly, 16 of these SPM did not contain a peptide signal, suggesting that non conventional secretion mechanisms could be favored during the effector phase of apoptosis. We demonstrated that activated caspase-3 regulates the exosomal secretion pathway associated to the export of nanovesicles TCTP^{+ve}, anti-apoptotic and biochemically different from apoptotic blebs. Finally, the overall proteomic data generated a new hypothesis suggesting that in response to apoptotic stress, the cell exports different mediators (soluble and vesicular) by non conventional mechanism through the fusion of endocytic organelles and autophagic vacuoles with the plasma membrane, releasing their content into the extracellular milieu. This mechanism should be regulated during the effector phase of apoptosis favoring a vascular repair response only when cell's demise reaches a point of no return. Therefore, these PMS could be used both as biomarkers of apoptosis or as biopharmaceutical targets to decrease the incidence of chronic vascular repair.

Keywords : Transplant vasculopathy, apoptosis, proteomic, TCTP, nanovesicles, non conventional secretion mechanism

Table des matières

Résumé	i
Abstract.....	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures - Introduction	vi
Liste des figures et des tableaux de l'article principal :.....	vii
Liste des Annexes :	vii
Liste des figures – Discussion et Conclusion	vii
Lexique	ix
Remerciements	xiii
Introduction	14
Chapitre 1 - La transplantation d'organe : clin d'œil historique	14
Historique positionnant le rôle du système immunitaire dans le rejet	14
Progrès réalisés relatifs à la transplantation d'organes solides	16
Chapitre 2 - Les différents types de rejet.....	18
La classification de Banff	18
Le rejet aigu associé à la réponse humorale (AMR)	19
Le rejet aigu associé à la réponse cellulaire (TCMR)	21
Le rejet chronique	21
Chapitre 3 – La vasculopathie du greffon: l'ultime combat du greffon.....	24
L'hypothèse de réponse à l'Insulte de Russell Ross	25
Pathophysiologie de la VG.....	26
Facteurs initiaux impliqués dans le développement de la VG	32
Facteurs non-immunologiques + facteurs immunologiques : Formation d'une boucle d'insulte autonome.....	40
Chapitre 4 - Endothélium, réponse au stress et mort cellulaire	42
Fonctions endothéliales	42
Coagulation	42
Trafic protéique et tonus musculaire	43
État inflammatoire quiescent et immunosurveillance	45

L'endothélium en réponse au stress	45
Activation endothéliale.....	47
Acquisition transitoire d'un phénotype de résistance	48
Autophagie	48
Apoptose endothéliale	53
Domage tissulaire et dysfonction endothéliale	56
Entre la vie et la mort, il y a le développement	57
Historique associé au concept de la mort cellulaire.....	57
Exemples de la mort cellulaire physiologique apoptotique	58
Schéma référentiel de la mort cellulaire	59
Chapitre 5 - L'apoptose endothéliale: la mort cellulaire programmée au cœur de la vasculopathie du greffon	63
Les différentes voies d'initiation de l'apoptose.....	64
1) La voie intrinsèque et les mitochondries	64
2) La voie extrinsèque	73
3) La voie Perforine et Granzyme.....	74
La phase effectrice de l'apoptose orchestre une démolition cellulaire contrôlée	76
Chapitre 6 - Technologies associées aux 'Omics'	78
Problématique	88
Hypothèse.....	88
Objectifs.....	88
Article principal.....	90
Discussion	123
Le testament protéique et nanovésiculaire de l'apoptose endothéliale	123
Chapitre 1 - Généralités	124
Avantages et limitations de l'étude du sécrétome des CE apoptotiques	125
L'enrichissement du sécrétome des CE apoptotiques dans le milieu extracellulaire représente un phénomène régulé	127
Chapitre 2 - L'apoptose endothéliale augmente l'export extracellulaire de médiateurs nanovésiculaires.....	129
Les différents types de vésicules membranaires associés au transport extracellulaire.....	130

Microparticules	130
Blebs apoptotiques	131
Microvésicules	132
Les exosomes	132
Chapitre 3 - Activités biologiques des Signaux Post Mortem (SPM) de l'apoptose endothéliale	145
1) Médiateurs anti-apoptotiques	145
TCTP associé aux nanovésicules de type exosomal	145
EGF	148
2) Protéases et dégradation de la MEC	149
3) CTGF à titre de médiateur fibrogénique	149
Autres médiateurs issus de l'apoptose endothéliale pertinents au remodelage vasculaire	151
Phospholipase A2, groupIID (PLA2G2D)	152
Tissue Plaminogen Activator (tPA ou PLAT)	152
Heat Shock Protein 90 alpha (HSP90- α)	154
Low Density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)	157
Chapitre 4 - La phase effectrice de l'apoptose lègue un testament moléculaire via des mécanismes de sécrétion non conventionnels	164
Types de sécrétion associés au sécrétome des CE apoptotiques	166
Chapitre 5 - Régulation potentielle des voies de sécrétion non conventionnelles par les caspases effectrices	177
Sécrétion exosomiale et le calcium	177
Sécrétion exosomiale et p53	178
Déprivation de facteur de croissance et sécrétion non conventionnelle	178
Convergence de la voie endocytaire et de l'autophagie via les Small GTPase Rab	184
Régulation de la sécrétion exosomiale durant la phase effectrice de l'apoptose	186
Conclusion	191
Bibliographie	v
Annexe 1 - La classification de Banff	i
Annexe 2 - Nomenclature de la mort cellulaire	ii

Liste des tableaux

- Table 1: (Article principal) List of proteins identified exclusively in SSC-Apo by 2 distinct LC-MS/MS approaches
- Table 2: (Article principal) List of all other exosomal proteins identified by one proteomic approach
- Tableau 3 : Les Signaux Post Mortem (SPM) de l'apoptose et leurs rôles dans le remodelage vasculaire
- Tableau 4 : Classification des 27 médiateurs identifiés spécifiquement dans le SSC-apo selon leur type de sécrétion
- Tableau 5 : Liste des protéines associées au processus d'autophagie et identifiées à l'aide d'une des 3 approches protéomiques effectuées sur les sécrétomes des SSC-apo et SSC-no-apo.

Liste des figures - Introduction

Chapitre 1

- Figure 1 : Ditzingen, 16^{ème} siècle.
- Figure 2 : 'Transplants of delight'

Chapitre 2 :

- Figure 3 : La vascularisation rénale en trois dimensions

Chapitre 3 :

- Figure 4 : Illustration de l'hypothèse de la réponse à l'insulte
- Figure 5 : Russell Ross, Ph.D
- Figure 6 : Illustration de la pathophysiologie de la VG
- Figure 7 : Les facteurs anti et pro apoptotiques pour l'endothélium
- Figure 8 : Le système du complément

Chapitre 4 :

- Figure 9 : Inhibition de la cascade de coagulation par l'endothélium au repos
- Figure 10 : Schématisation de l'endothélium en réponse au stress
- Figure 11: L'autophagie
- Figure 12: La voie autophagique visible par microscopie électronique
- Figure 13: L'autophagie à titre de mécanisme cytoprotecteur
- Figure 14: Stress oxydatif, autophagie et apoptose
- Figure 15 : ASK1 et l'apoptose endothéliale initiée par différents stress cellulaires
- Figure 16 : CE apoptotique visible par microscopie à fluorescence et coloration HOPI
- Figure 17 : CE nécrotique visible par microscopie à fluorescence et coloration HOPI

Chapitre 5

- Figure 18 : Voies d'initiation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose
- Figure 19: Mécanisme d'activation des caspases initiateuses
- Figure 20: Mécanisme d'activation des caspases effectrices
- Figure 21: Voie d'initiation apoptotique via le système Perforine et Granzyme B

Chapitre 6 :

- Figure 22: Aperçu général de l'approche de spectrométrie de masse en tandem
 Figure 23: Les principes d'ionisation des peptides par le MALDI et le ESI
 Figure 24: Sites de clivage favorisé par les caspases effectrices

Liste des figures et des tableaux de l'article**principal :**

- Figure 1 : Serum starvation induces a pure apoptotic response in EC
 Figure 2: Characterization of the secretome of apoptotic EC
 Figure 3: Caspase(s) activation in apoptotic EC fosters the release of anti-apoptotic exosome-like nanovesicles
 Figure 4 : TCTP is a novel anti-apoptotic component of the apoptotic secretome
 Figure 5: TCTP export is specific of apoptotic cell death
 Figure 6: Activated caspase-3 is a novel regulator of TCTP export
 Table 1: List of proteins identified exclusively in SSC-Apo by 2 distinct LC-MS/MS approaches
 Table 2: List of all other exosomal proteins identified by one proteomic approach
 Supplementary Figure S1: TCTP is expressed within MVB of apoptotic EC
 Supplementary Figure S2: Caspase inhibition and TCTP release
 Supplementary Figure S3: Densitometry analysis

Liste des Annexes :

- Annexe 1 : La classification de Banff
 Annexe 2 : La nomenclature de la mort cellulaire

Liste des figures – Discussion et Conclusion**Chapitre 2**

- Figure 25: Rose Johnstone, Ph.D
 Figure 26: La biogénèse et les différents destins des MVB
 Figure 27: Schématisation des protéines exosomiales identifiées dans le sécrétome des CE apoptotiques par LC-MSMS
 Figure 28: Mécanismes d'interactions intercellulaires par les exosomes

Chapitre 3

- Figure 29: TSAP6 et TSG101 et leurs interactions avec TCTP dans le SSC-apo
 Figure 30: Schéma récapitulatif de TCTP et ses partenaires
 Figure 31: TPA et la réponse fibrogénique
 Figure 32: HSP90- α est sécrété suivant un stress oxydatif et active la voie ERK 1/2 de manière autocrine chez les CML
 Figure 33: HSP90- α exosomal et le TPA coopèrent à la dégradation de la MEC, la migration et envahissement tumoral

- Figure 34: HSP90- α exosomal et LRP1 initient, de manière autocrine, la migration tissulaire suivant un stress hypoxique
- Figure 35: Stress inflammatoire et communication intercellulaire via HSP90- α exosomal et LRP1 sur les cellules cibles
- Figure 36 : Mécanismes de signalisation potentielle de sLPR1 ou LRP1-exo
- Figure 37 : Illustration des mécanismes paracrins potentiels de CTGF soluble ou exosomal sur la différenciation myofibroblastique
- Figure 38 : Illustration récapitulative des SPM générés durant l'apoptose endothéliale et leurs activités biologiques sur les composantes cellulaires du mur vasculaire

Chapitre 4

- Figure 39: Sécrétion classique
- Figure 40: Mécanismes de sécrétion non classique
- Figure 41: Fusion potentielle de différentes organelles avec la membrane plasmique suivant une augmentation intracellulaire calcique associée au stress cellulaire
- Figure 42: Microscopie à balayage des CE apoptotiques et normales

Chapitre 5

- Figure 43: Schématisation de la voie autophagique et exocytose de matériel autophagique
- Figure 44: Schématisation des effets fusionnels homotypiques et hétérotypiques des organelles de la voie endocyttaire durant l'autophagie
- Figure 45: Convergence de la voie endocyttaire et de la voie autophagique
- Figure 46: Schéma récapitulatif illustrant la participation des caspases effectrices dans les mécanismes de sécrétion non conventionnels

CONCLUSION

- Figure 47: Schématisation des évènements participant au développement de la vasculopathie du greffon.

Lexique

ABC1	ATP binding cassette transporter 1
ADN	Acide désoxyribonucléique
AIF	Apoptosis inducing factor
AIP1	ASK1-interacting protein 1
alpha-SMA	Alpha smooth muscle actin
AMR	Antibody mediated rejection
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
APC	Antigen presenting cell
ARN	Acide ribonucléique
ASK1	Apoptosis-signaling kinase 1
AT-1	Angiotensin II type 1
ATG	Autophagy-related genes
ATIII	Anti-trhombine III
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-2	B cell lymphoma 2
BFA	Brefeldin A
BH	Bcl-2 homology domains
BIR	Baculoviral IAP repeat
CASBAH	The CAspase Substrate dataBAse Homepage
CD	Cellules dendritiques
CE	Cellules endothéliales
C/EBP	CAAT/enhancer-binding proteins
CFTR	Cystic fibrosis conductance regulator.
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CML	Cellules musculaires lisses
CRP	C-reactive protein
CTGF	Connective tissue growth factor
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques
DED	Dead effector domain
DEVD	Z-D(OMe)-E(OMe)-V-D(OMe)-FMK
DISC	Death-inducing signaling complex
DR	Death receptors
DRAM	DNA damage-regulated autophagy modulator protein
EA	Early autophagosome
EEA1	Early endosome
EGF	Epidermal growth factor
EMT	Epithelial mesenchymal transition
EPC	Cellules souches progénitrices endothéliales
ERBB2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2
ESCRT	Endosomal sorting complexes required for transport
ESI	Electrospray ionization
EV	Endocytic vesicle
FADD	Fas associated Death domain
FGF1	Fibroblast growth factor 1
FGF2	Fibroblast growth factor 2
GAP	GTPase activating proteins
GDF	GDI displacement factor
GDI	Guanine dissociation inhibitor
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucléotide exchange factors
GPCR	G protein coupled receptor
GTP	Guanosine triphosphate
HIPK1	Homeodomain-interacting protein kinase 1
HLA	Human leukocyte antigen

HMG-CoA réductase	3-alpha-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase
HMGB1	High-mobility group box-1 protein
HO	Hoescht
HS	Héparan sulfate
HSP70	Heat shock protein 70
HSP90-A- α	Heat shock protein 90 alpha
HSPG	Protéoglycans héparan sulfate
HUVEC	Human umbilical vascular endothelial cells
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
ICAM-1	Intercellular adhésion molécule 1
IL	Interleukin
ILV	Vésicules intraluminales (ILV)
IMS	Protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRE1	Inositol-requiring enzyme 1
JNK	Jun N-terminal Kinase
Kd	Constante de dissociation
LA	Late autophagosome
LC-MSMS	Spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide
LC3	Microtubule-associated proteins 1A1B light chain 3A
LDH	Lactate déshydrogénase
LDL	Low density lipoprotein
LE	Late endosome
LPC	Lysophosphatidylcholine
LRP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1
LY	Mature lysosome
MAC	Membrane attack complex
MAC	Mitochondrial apoptosis-induced channel
MALDI	Matrix-assisted laser desorption-ionization
MAPK	Mitogen-activated protein kinase 1
MASPs	MBL associated serine protease
MBL	Mannose-binding lectin
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
MEC	Matrice extracellulaire
MICA et MICB	MHC class I related chain A and B
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MIP-2	Macrophage inflammatory protein 2-alpha
miRNA	Micro ARN
mRNA	ARN messenger
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
MVB	Multivesicular bodies
MYD88	Myeloid differentiation primary response protein MyD88
NF-kB	Nuclear factor-kB
NK	Natural killers cells
NO	Oxyde d'azote
PA	Preautophagosome
PAF	Platelet-activating factor
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PDGF	Platelet derived growth factor
PI	Propidium iodide
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
PKD1	Polycystic kidney disease 1

PLA2G2D	Phospholipase A2 groupe IID
PM	Membrane plasmique
PRP	Pattern recognition receptors
PS	Phosphatidylserine
PTP	Permeability transition pore
RE	Réticulum endoplasmique
Rho	Ras homologue
RIP	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
ROCK1	Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 1
ROS	Reactive oxygen species
RRV	Simian rotavirus Rhesus monkey rhadinovirus
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA Ctrl	ARN d'interférence en condition contrôle
SMAC-Diablo	Second messenger of apoptotic cell death
SOXF	Stress oxidative factors
sPLA2	Phospholipases sécrétées
SSC-apo	Milieu conditionné par des cellules endothéliales apoptotiques
SSC-no-apo	Milieu conditionné par des cellules endothéliales non apoptotiques
TCMR	T cell mediated rejection
TCTP	Translationaly controlled Tumor Protein
TEV	Tobacco Etch Virus
TF	Tissue factor
TGF-beta	Transforming growth factor beta
TIRAP	Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein
TLR	Toll-like receptors
TM	Thrombomoduline
TNF-alpha	Tumor necrosis alpha
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor 1
tPA	Tissue plasminogen activator
TPF1	Tissue factor pathway inhibitor
TRADD	Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein
TRAF6	TNF receptor-associated factor
TSAP6	Tumor suppressor-activated pathway protein 6
TSG101	Tumor susceptibility gene 101 protein
UPR	Unfolding protein response
UVB	Rayons ultraviolets B
VCAM-1	Vascular cell adhesion molécule 1
VE-Cadherin	Vascular endothelial cadherin
VG	Vasculopathie du greffon
VVOs	Vesicular-vacuolar organelles
VWF	Von Willerbrand Factor
WPBs	Weibel Palade bodies
ZVAD	Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) uoromethylketone

*Cette thèse est dédiée à tous les patients
hémodialysés que j'ai côtoyés au cours des 10
dernières années.*

Remerciements

Mes premiers remerciements sont destinés aux auteurs de mon existence, mes parents. Merci de m'avoir appuyée tout au long de ces longues années d'études. Je sais que ma présence leur a beaucoup manquée et je les remercie de leur compréhension concernant toutes les invitations et les fêtes que j'ai dû déclinées à cause de mes études. Merci à mes amis qui ont su restés à mes côtés au cours de ce long parcours. Merci d'avoir écouté mes histoires d'exosomes et d'avoir conservé un intérêt par rapport à ma passion. Je tiens aussi à remercier mes directeurs de thèse, Dre Marie-Josée Hébert et Dr Alexey Pshezhetsky. En plus de m'avoir offert un projet très excitant, Marie-Josée m'a donné l'accessibilité à des outils très précieux : la protéomique et la microscopie électronique. Son expertise à titre de médecin transplantateur m'a permis d'avoir une vue d'ensemble plus clinique et non seulement biochimique en ce qui a trait au domaine de la transplantation. Avec nos deux têtes déterminées, nous avons réussi à générer un projet original et très pertinent qui auront probablement des répercussions très positives pour les patients transplantés. Je tiens aussi à remercier Alexey qui nous a offert son espace protéomique ainsi que son expertise à titre de chimiste des protéines. Les nombreuses discussions que nous avons partagées étaient très riches et m'ont permis à chaque fois d'avoir une compréhension plus juste de la biochimie et de la biologie cellulaire. Somme toute, cette co-supervision m'a permis d'avoir une vision plus complète du monde de la recherche. J'offre aussi mes remerciements à mes mentors, les Dr Michel-Ange Rodriguez, Dr Mark Watson et Dr Moise Bendayan qui ont su être sur ma route aux moments opportuns. Merci aussi à ma petite Zéa qui a merveilleusement complété ma vie au cours de la dernière année. Finalement, merci à l'homme que j'aime de tout mon cœur qui a su survivre à cette aventure doctorale. Mon amour, on a terminé !!!

Introduction

Chapitre 1 - La transplantation d'organe : clin d'œil historique

Il existe des récits apocryphes relatant différentes expériences de transplantation d'organe effectuées par des entités dites Saintes, quelques siècles avant Jésus-Christ. Parmi ces récits, des romains catholiques rapportent que les Saints Damian et Cosmas auraient réussi la transplantation d'une jambe provenant d'un éthiopien décédé sur un individu Romain dont la jambe avait été sectionnée suite à une atteinte gangréneuse (Figure 1) (4).



Figure 1 Les Saints Cosmas et Damian performant miraculeusement une transplantation de jambe. Ditzingen, 16^{ème} siècle.

Chez l'humain, la première transplantation de cornée scientifiquement documentée et chirurgicalement réussite a été effectuée par Eduard Zirm en République Tchèque en 1905 (5). Par la suite, Alexis Carrel, récipiendaire nobélisé de Physiologie et Médecine en 1912, fût l'un des pionniers contribuant au succès chirurgical d'anastomose d'artères et de veines (6). Ses travaux soulevèrent deux points fondamentaux relatifs au succès de la transplantation qui demeurent toujours d'actualité au 21^{ème} siècle: 1) l'importance de la conservation d'organes vivants pour des fins de greffe; 2) la limite exacte de la durée de vie des différents organes.

Historique positionnant le rôle du système immunitaire dans le rejet

Durant la 1^{ère} et la 2^{ème} Guerre Mondiale, les pilotes d'avion subissaient de graves brûlures au visage et aux mains. L'une des approches envisagée par les chirurgiens de l'époque consistait à transplanter des segments de peau provenant de la même personne (autogreffe) permettant ainsi de diminuer le taux de

mortalité relié aux infections secondaires aux brûlures. Par contre, la transplantation de fragments de peau entre 2 individus menait indubitablement au rejet (7). Par la suite, Dr Peter Medawar effectua une panoplie d'expériences établissant ainsi les bases immunologiques impliquées dans le rejet. Il mérita le Prix Nobel de physiologie et médecine en 1960 intitulé : 'Immunological Tolerance' (8).

Ces expériences influencèrent grandement le Dr Joseph Murray qui effectua la première transplantation rénale humaine réussie au Peter Bent Brigham Hospital (Boston, Etats-Unis). Le premier objectif de son laboratoire était d'élaborer une transplantation en absence de barrière immunologique permettant au greffon rénal de fonctionner indéfiniment (9). Dr Murray effectua une première transplantation rénale entre jumeaux identiques le 23 décembre 1954 (10). La réussite fût instantanée : le rein fût fonctionnel dès que transplanté et le receveur eu 2 enfants et vécu 8 années avant de mourir d'un infarctus du myocarde.

à

Finalement, le Dr Murray souleva à l'époque des questions qui demeurent actuellement excessivement pertinentes et non résolues :

« It is healthy to realize that the way an antibody destroys an organ graft is not known and that the basic questions remain unanswered: "What mechanism is involved in the survival of a successful transplant? Why do failures occur?" We know that a successfully transplanted host is immunized against his donor, yet something protects the kidney in this potentially hostile environment. Is the host antibody coating the donor endothelium acting as a protective antibody? Or, has the graft endothelium been replaced by the host? Why can some, but not all, animals or patients be weaned from drugs? (...). What immunological process can explain these observations on long-surviving transplants? That is the compelling question we clinical colleagues most urgently seek to answer. » (11)



Figure 2. 'Transplants of delight' Photo représentant les jumeaux ayant participé à la première greffe rénale en 1954. La photo les illustre en train de chanter démontrant que tous deux se portent bien après la chirurgie. Tiré de (2).

55 ans plus tard, la réponse immunitaire de l'hôte et l'intégrité de l'endothélium du greffon demeurent des sujets de recherche clés dans le domaine de la transplantation.

Progrès réalisés relatifs à la transplantation d'organes solides

Les organes solides étant le plus transplantés mondialement sont le rein, le foie, le cœur, les poumons et le pancréas (12). La transplantation rénale est maintenant la méthode de choix permettant d'assurer le relai de la fonction rénale défaillante comparativement à l'hémodialyse initiée en 1924 par le Dr Georg Hass (13, 14). La transplantation n'est pas perçue par notre organisme comme une alternative médicale permettant de remplacer un organe défaillant. Le greffon expérimente inévitablement un stress péri-opératoire accompagné d'inflammation devenant ainsi la cible de choix du système immunitaire de l'hôte. Heureusement ou malheureusement, le cas échéant, le corps humain est merveilleusement doté de différents régiments cellulaires interconnectés capables de communiquer entre eux et prêts à tout pour faire face à un tel assaut.

Malgré que la transplantation d'organe solide soit une discipline médicale raisonnablement récente, celle-ci connaît déjà des progrès importants. Par exemple, l'évaluation de la compatibilité immunologique entre le donneur et le receveur a permis d'augmenter non seulement le taux de transplantation mais aussi la survie à court terme du greffon permettant de diminuer significativement les épisodes de rejet aigu. Cette compatibilité repose sur la présence d'alloantigènes (antigènes provenant de 2 individus de la même espèce et génétiquement différents) codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ces gènes sont hautement polymorphiques et des centaines d'allèles existent pour les 5 loci humains CMH soient HLA-A, HLA-B, HLA-C appartenant à la classe I d'antigènes et HLA-DR et HLA-DQ (HLA; Human Leukocyte Antigen) appartenant à la classe II d'antigènes. Ces antigènes sont exprimés à la surface des cellules nucléées du greffon qui sont reconnus par la suite par les lymphocytes T de l'hôte via un récepteur compatible. Cette interaction permet de rapidement évaluer la présence de protéines n'appartenant pas à l'hôte créant ainsi une série de réactions subséquentes menant à la destruction des cellules arborant des antigènes du non-soi (12).

Par conséquent, des analyses de routine sont maintenant implantées dans le bilan pré-greffe afin d'évaluer la compatibilité entre le receveur et le donneur. Mise à part l'évaluation de la compatibilité des différents groupes sanguins (ABO), les stratégies analytiques ayant permis d'améliorer la

survie du greffon regroupent : 1) le 'typage HLA'; cette analyse dresse le portrait polymorphique des HLA du donneur et du receveur permettant ainsi d'établir les combinaisons immunologiques les plus bénéfiques; 2) le 'cross match'; cette analyse permet d'évaluer la présence d'anticorps présents dans le sérum du receveur dirigés contre les HLA du donneur dans un contexte de pré et post transplantation (15). Mis à part l'amélioration à court terme de la survie du greffon associée au succès du typage HLA (16), l'établissement de l'analyse du 'cross match' a pratiquement permis d'enrayer l'incidence du rejet hyper aigu. Durant ce type de rejet, le receveur déploie initialement des anticorps dirigés contre des antigènes du donneur générés suite à une pré-sensibilisation (transfusion sanguine, transplantation antérieure ou grossesse). Cette situation a pour effet d'activer rapidement le système du complément de la réponse immunitaire innée et mène à la perte totale du greffon en moins de 24 heures (17, 18).

L'implantation de ces analyses de laboratoire a aussi permis d'adapter l'utilisation de différentes combinaisons d'agents immunosuppresseurs afin de freiner l'activation des lymphocytes T du receveur, des acteurs clés du rejet aigu. Mise à part un contexte de transplantation entre jumeaux identiques (absence de barrière immunologique), l'immunosuppression sert à la fois d'agent prophylactique et thérapeutique du rejet et représente un autre progrès important de la transplantation d'organe solide. Cela a eu pour effet d'améliorer significativement le taux de survie du greffon à court terme. Cette situation se reflète aux États-Unis où en 2007, la survie du greffon 12 mois post-greffe affiche un taux de succès de 96% et 85% (greffons provenant de donneurs vivants et cadavériques, respectivement) (19).

L'arrivée de donneurs d'organes vivants a aussi contribué au succès de la transplantation en ayant un impact direct sur le taux de transplantation ainsi que la survie à long terme du greffon. Par exemple, la survie du greffon rénal 10 ans (1996-2006) post-greffe affichait un taux de succès de 58% et 28%, donneurs vivants et cadavériques respectivement. Cet aspect révèle entre autre le net avantage d'obtenir un greffon rénal n'ayant pas subi d'épisodes d'ischémie associés à l'arrêt de la perfusion sanguine du donneur (19).

Chapitre 2 - Les différents types de rejet

*“ Homo transplants differ not only in the **strength** of rejection, but also in the **nature** and the **location** of the phenomena induced by rejection. This conclusion must not be regarded as a cause of discouragement. On the contrary, it should spur further research.”*

- Jean Hamburger

D'un point de vue strictement immunologique et selon le modèle de la reconnaissance des molécules du non soi, la vision actuelle du rejet repose sur une intégration de différents scénarios utilisés par le système immunitaire afin d'endommager le greffon. Robert B. Colvin a introduit de manière élégante l'une de ses nombreuses publications en positionnant le rejet à partir d'une citation de Jean Hamburger, un médecin français ayant contribué remarquablement à la néphrologie et à titre de pionnier dans le domaine de la transplantation en France (20). La '**force**' (**strength**) avec laquelle le greffon est endommagé fait référence à la rapidité/l'efficacité avec laquelle les cellules du système immunitaire endommagent les composantes du greffon démarquant le rejet aigu du rejet chronique. La '**nature**' fait référence au type de médiateurs effectuant le dommage au greffon soit les cellules T et les macrophages dans la réponse dite cellulaire et des anticorps préformés dirigés contre les alloantigènes du greffon dans la réponse dite humorale. Finalement, la '**location**' fait référence aux cibles privilégiées de ces différents médiateurs inactivant le greffon rénal. La réponse humorale affecte préférentiellement les capillaires glomérulaires et péri-tubulaires tandis que dans un contexte de réponse cellulaire, l'endothélium des artères et les tubules du greffon rénal sont davantage ciblés (20).

La classification des différents types de rejet rénal repose davantage sur des critères immunologiques participant au rejet compte tenu que leurs actions sont traduites par des manifestations histologiques présentes au sein du greffon rénal. À la lumière des résultats obtenus chez des modèles animaux et chez l'humain, un schéma référentiel issu d'une compilation dynamique d'observations cliniques et moléculaires associées au rejet aigu et chronique a pris naissance : la classification de Banff.

La classification de Banff

Différentes manifestations histologiques associées au rejet prennent place simultanément au sein des glomérules du greffon et au niveau de son lit vasculaire. L'outil de référence actuel utilisé afin d'évaluer l'état du greffon rénal repose ultimement sur l'analyse d'échantillons biopsiques. Les

manifestations histologiques présentes au sein du spécimen biopsique sont catégorisées selon une standardisation issue d'un consortium international communément appelé 'Banff Classification'. La classification de Banff a débuté en 1991 suite au premier congrès réalisé dans la ville de Banff en Alberta, Canada (21-28). Ce consortium fait appel, à tous les 2 ans, à un groupe multidisciplinaire et international de cliniciens, pathologistes, chirurgiens et chercheurs fondamentaux qui modifient cette standardisation à la lumière de plusieurs débats entourant les plus récentes observations reliées à la compréhension globale du greffon rénal.

Les 6 différentes catégories diagnostiques de cette classification sont représentées dans l'Annexe 1 (28). Chaque catégorie est basée sur les différents aspects lésionnels du spécimen biopsique : tubulite, endartérite, glomérulite, inflammation interstitielle, fibrose interstitielle, atrophie tubulaire, glomérulopathie de l'allogreffe, épaissement intimal vasculaire et l'aspect de la matrice mésangiale. La présence et la sévérité de ces lésions sont quantifiées sur une échelle variant de 0 à 3. Il est à noter que plusieurs caractéristiques lésionnelles peuvent se retrouver dans plus d'une catégorie et certaines catégories peuvent coexister au sein d'un même échantillon biopsique, démontrant la complexité de la pathophysiologie associée au rejet du greffon rénal.

Sommairement, cette classification est basée sur 2 mécanismes d'insultes immunologiques initiés 1) par une réponse humorale (Antibody mediated rejection, AMR) associée à la présence d'anticorps s'attaquant à l'endothélium et l'épithélium du greffon; 2) ou par une réponse cellulaire (T cell mediated rejection, TCMR), impliquant la participation de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et de macrophages injuriant aussi l'épithélium et l'endothélium du greffon. Ces deux mécanismes sont maintenant reconnus à titre de déterminants à la fois dans le rejet aigu et le rejet chronique. À l'aide d'échantillon biopsique du greffon rénal et de certaines analyses sériques, les différentes caractéristiques histologiques associées au TCMR et AMR peuvent aider à classifier le type de rejet.

Le rejet aigu associé à la réponse humorale (AMR)

Par définition, le rejet aigu se manifeste par une perte rapide de la fonction rénale durant les jours ou les semaines suivants la transplantation. En ce qui a trait au rejet aigu de type ARM, l'histologie est peut être variable. En général, les capillaires péri tubulaires sont dilatés, la membrane basale peut être multi lamellée et on peut y détecter la présence de neutrophiles et de macrophages (20, 29). Afin d'évaluer la participation de la réponse humorale, des analyses de cross-match permettent de confirmer la présence d'anticorps circulants de l'hôte dirigés contre des antigènes du

greffon dans un contexte de pré et/ou post-transplantation (30). La procédure actuelle du cross-match consiste à incuber le sérum du patient avec un répertoire d'antigènes HLA recombinants purifiés et couplés individuellement avec des billes. Afin de détecter la formation d'un complexe anticorps-antigène, l'ajout d'un anticorps secondaire couplé à un conjugué fluorescent permet de détecter et quantifier les complexes à l'aide de la cytométrie en flux (31). La documentation reliée à la présence d'anticorps anti-HLA chez le patient permet entre autre de catégoriser l'histologie rénale dans la catégorie AMR.

D'un point de vue biochimique, les complexes formés d'anticorps et d'antigènes à la surface de l'endothélium initient l'activation du système du complément générant une multitude de réponses allant de l'activation de l'endothélium, en passant par des épisodes d'accommodation et la mort cellulaire apoptotique. Or, compte tenu que la voie classique du complément est activée suivant la formation de complexes anticorps-antigène à la surface des CE du greffon, Feucht et al proposèrent que les produits terminaux, dont C4d, de la voie classique et la voie lectine du complément pourraient servir de marqueur d'insulte humorale (32, 33). L'attrait de C4d à titre de marqueur du AMR repose sur sa localisation tissulaire près du site d'activation du complément et sur sa liaison covalente avec l'endothélium, lui attribuant ainsi une stabilité permettant de le détecter par immunohistochimie, immunofluorescence et microscopie électronique dans des spécimens biopsiques (34). La déposition de C4d dans les capillaires péri-tubulaires est corrélée avec la présence sérique d'anticorps dirigés contre les antigènes HLA de classe I et II du donneur et sert maintenant de critère de sélection permettant de différencier le AMR du TCMR (35-37).

Le fait qu'un greffon transplanté entre frère et sœur ayant un profil HLA identique puisse développer un rejet aigu de type AMR suggère que des antigènes de type non-HLA exprimés par l'endothélium du donneur puissent participer au AMR (38, 39). Jusqu'à maintenant, cette classe d'antigènes inclut les antigènes ABO des groupes sanguins et les gènes MHC class I-related chain A (MICA) et B (MICB). MICA et MICB correspondent à des glycoprotéines de surface et la localisation de ces gènes est à proximité avec le locus HLA-B. Finalement, parmi les antigènes non-HLA, des auto-anticorps dirigés contre des auto-antigènes incluant la vimentin, le récepteur angiotensine II type 1 (AT1), les protéines "heat shock" ainsi que des phospholipides semblent aussi participer au rejet associé au AMR. Le manque d'outils spécifiques permettant de détecter la contribution de ces auto-anticorps limite actuellement notre compréhension de ce phénomène.

Le rejet aigu associé à la réponse cellulaire (TCMR)

Le rejet dit aigu associé au TCMR peut se présenter cliniquement par une augmentation rapide de la créatinine sérique et une rétention de liquide parfois accompagnée de fièvre dans les jours ou les semaines suivant la transplantation. Ces manifestations cliniques ne sont pas nécessairement spécifiques et une biopsie du greffon rénale est indispensable afin de confirmer un diagnostic de rejet aigu.

Histologiquement, le rejet aigu TCMR se caractérise par différents degrés d'infiltration de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ et de macrophages au niveau des cellules épithéliales des tubules, pathologie référée sous le nom de tubulite. Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) expriment le ligand Fas (FasL) ou contiennent des granules cytotoxiques dans lesquels se retrouvent la perforine et les granzymes A et B, localisant ainsi la machinerie nécessaire afin d'injurier l'épithélium via le mécanisme d'apoptose (40-43). Le degré d'apoptose des cellules épithéliales corrèle avec le nombre de CTL et de macrophages présents au sein de l'infiltrat. (29, 42, 44). Ajoutons que ce type d'insulte peut se manifester en absence de lymphocyte B et d'anticorps, suggérant que cette manifestation est dépendante de l'action des lymphocytes T (45).

Les cellules épithéliales des tubules ne sont pas les seules victimes des CTL et des macrophages ; ceux-ci s'affairent à infiltrer le lit vasculaire du greffon sous l'endothélium au niveau de l'intima, pathologie référée sous le nom d'endartérite. L'endartérite accompagne 25 à 40% des biopsies rénales associées au rejet aigu TCMR et affecte focalement les petites et les grosses artères, à l'intérieur et à l'extérieur du parenchyme rénal (46, 47). L'apoptose des cellules endothéliales est présente et est aussi dépendante du système perforine granzyme véhiculé par les CTL (48). Tout comme dans le cas de la tubulite, l'endartérite se manifeste sans la participation d'anticorps tel que démontré chez les souris déficientes de lymphocytes B (49).

Le rejet chronique

Le rejet chronique fait allusion à la perte structurale et fonctionnelle du greffon résultant en une altération irréversible de l'organe des mois ou des années suivant la transplantation. Les mécanismes AMR et TCMR participent à différents niveaux et leur contribution respective demeure délicate à déterminer. Généralement, l'aspect lésionnel de l'échantillon biopsique montre des évidences morphologiques de dommage tissulaire chronique reflété au niveau des glomérules, des vaisseaux sanguins, des tubules et de l'espace interstitiel. Histologiquement, les différentes caractéristiques associées au rejet chronique sont 1) la glomérulopathie du greffon, 2) la

capillaropathie péri-tubulaire, 3) la vasculopathie du greffon et de manière moins spécifique, la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire (29).

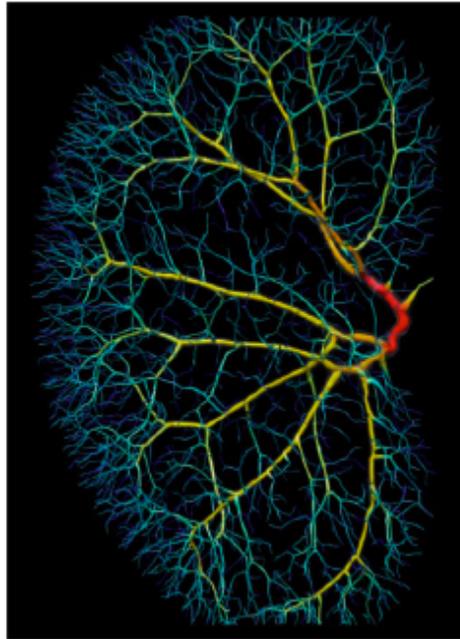
Lorsqu'il y a évidence sérique d'anticorps anti-HLA accompagnée d'une déposition de C4d dans l'échantillon biopsique, les changements associés sont fortement attribuables au AMR. Des épisodes répétés de dommage endothélial générés par les anticorps incitent l'endothélium à dupliquer la membrane basale démontrant un processus de réparation actif. Par exemple, dans le cas de la glomérulopathie du greffon, on observe une duplication ou une multi-lamellée de la membrane basale des glomérules et/ou des capillaires péri-tubulaires qui est corrélée à la fois avec la présence sérique d'anticorps dirigés contre les HLA de classe II et la déposition de C4d dans les capillaires péri-tubulaires (20, 26, 50).

La vasculopathie du greffon (VG) représente un type de lésion caractérisé par un épaissement néo-intimal affectant négativement la lumière des vaisseaux irrigant le greffon. L'arbre vasculaire du rein est composé d'une microcirculation incluant des capillaires et des artérioles ayant des diamètres beaucoup plus petits que ceux des veines et des artères (Figure 3). Par conséquent, des changements minimes associés à la réduction de la lumière de ces vaisseaux ont un impact important sur la fonctionnalité du greffon rénal (51). Selon la classification de Banff, cette manifestation histologique est davantage associée au TCMR compte tenu de la présence de macrophages et de cellules T au sein de l'échantillon biopsique. Cette pathologie est accompagnée de fibrose interstitielle et d'atrophie tubulaire pouvant être ou non associées à la déposition de C4d. Certaines évidences suggèrent que le processus de fibrose pourrait être attribuable à la transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) des cellules tubulaires en myofibroblastes qui migrent dans l'espace interstitiel. Ce phénomène pourrait, du moins en partie, être dépendant d'une signalisation TGF- β . Des études *in vivo* ont démontré la présence de cellules épithéliales exprimant un marqueur spécifique aux fibroblastes dans les tubules à proximité de cellules T CD8⁺ illustrant la contribution du TCMR dans l'atrophie tubulaire et la fibrose interstitielle (29, 52).

En résumé, l'étiologie du rejet qu'il soit aigu ou chronique, associé au AMR ou au TCMR représente un ensemble de phénomènes complexes pouvant former un continuum menant indubitablement à long terme à une perte fonctionnelle totale du greffon. Or, la vasculopathie du greffon dans le contexte de transplantation d'organes solides représente une condition inévitable: par exemple, 30% à 60% des greffons cardiaques présentent cette histopathologie 5 ans post-transplantation

(53). Cette situation est analogue dans le cas des greffons rénaux (29). Par conséquent, cette pathologie fait présentement figure d'investigation intense autant dans les milieux académiques que pharmaceutiques.

Figure 3 : Vascularisation rénale en trois dimensions. Reproduit de (54) avec la permission de The American physiological Society, copyright 2006.



Chapitre 3 – La vasculopathie du greffon: l’ultime combat du greffon

Nonobstant la nette amélioration de la survie du greffon à court terme, le typage HLA, le cross-match, l’introduction des protocoles cliniques d’immunosuppression ainsi que l’effet bénéfique attribuables aux donneurs vivants, la demi-vie du greffon à long terme demeure relativement stable, soit d’environ 10 ans (55). Ces données sont étonnantes compte tenu que la stratégie entourant l’utilisation d’immunosuppresseurs n’ait pas produit l’effet escompté, i.e. d’augmenter significativement la demi-vie du greffon à long terme et de diminuer l’incidence du rejet chronique. De plus, l’immunosuppression engendre des effets secondaires importants chez les receveurs impliquant entre autre une prédisposition 2 à 3 fois plus élevée de développer un cancer 3 ans post-greffe comparativement à la population en général (56). Le risque de développer différents types d’infection est aussi plus important ainsi que la cytotoxicité associée à la prise d’immunosuppresseurs (57). Par conséquent, il n’est pas étonnant que la réussite de la transplantation rénale (et autre organe solide) à long terme avec une médication minimale d’immunosuppresseurs représentent actuellement le but ultime de la transplantation (29).

Tel que discuté dans le chapitre précédent, le rejet chronique est étroitement associé à un type de pathologie vasculaire référé sous le nom de la vasculopathie du greffon (VG). Différentes nomenclatures relatives à la VG ont été décrites dans la littérature scientifique, faute d’un consensus qui a été rétabli (chronic allograft arteriopathy) avec la classification de Banff en 2009. La VG est caractérisée par un rétrécissement progressif et concentrique de la lumière de la microcirculation du greffon, le tout accompagné de fibrose interstitielle. Ce type de remodelage vasculaire pathologique est apparenté à une forme accélérée d’athérosclérose dite ‘native’ avec laquelle la VG partage plusieurs caractéristiques pathophysiologiques (Figure 4).

La VG localisée dans la microcirculation du greffon s’arrête aux lignes de suture avec les vaisseaux du receveur, suggérant que le système immunitaire de l’hôte s’insurge seulement contre les cellules endothéliales arborant des alloantigènes (51). En plus de l’évidente participation du système immunitaire dans la détérioration vasculaire du greffon, plusieurs facteurs non-immunologiques et péri-opératoires participent au développement de la maladie en générant des épisodes dommageables à l’endothélium contribuant ainsi à activer des processus de réparation vasculaire. La vision actuelle de la pathophysiologie de la VG repose davantage sur un processus de guérison chronique des vaisseaux stressés (immunologiquement ou non) compte tenu que la VG peut se

manifester en absence d'une allo-réponse et que l'ischémie reperfusion dans des isogreffes permet aussi le développement de la VG (51, 58). La conception actuelle de la VG découle directement des travaux de Russell Ross.

L'hypothèse de réponse à l'Insulte de Russell Ross

Notre compréhension actuelle des mécanismes pathophysiologiques de la VG et des maladies athérosclérotiques résulte des travaux de Russell Ross, un pionnier du 20^{ème} siècle dans le domaine des maladies cardiovasculaires (Figure 5). En s'inspirant des travaux de Rudolph Virchow publiés aussi loin qu'en 1856, Russell Ross proposa l'hypothèse de 'réponse à l'insulte' afin d'expliquer les différentes manifestations présentes au sein des lésions athérosclérotiques.

Cette hypothèse proposée en 1977 postule que ces lésions sont issues d'une réponse de réparation chronique de l'endothélium suivant des épisodes répétés d'insulte vasculaire menant à la dénudation de l'endothélium (59).

Avant de détailler les changements attribuables à la formation de lésions athérosclérotiques, une description de la paroi vasculaire s'impose. L'archétype de la paroi vasculaire comprend 3 tuniques composées de différents types cellulaires (Figure 4): l'intima, constituée d'une monocouche de cellules endothéliales ayant l'aspect d'un épithélium pavimenteux simple reposant sur de la matrice extracellulaire (MEC); la média constituée de cellules musculaires lisses et l'adventice constituée principalement de fibroblastes (60).



Figure 5 : Russell Ross, Ph.D
Reproduit de (1) avec permission
de Wolters Kluwer Health.

Cela dit, les principaux évènements reliés à la formation des lésions athérosclérotiques connus au moment du postulat de Russell Ross sont : 1) la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) issues de l'intima; 2) la production, par l'entremise de ces cellules, d'une quantité importante de composantes de la MEC incluant le collagène, des protéoglycans ainsi que des protéines fibreuses élastiques; 3) la déposition intracellulaire et extracellulaire de lipides et de débris cellulaires qui éventuellement résulte en des lésions d'histologie plus complexe.

Dans son postulat, Russell Ross décrit que l'insulte initiale peut être subtile et que les agents dommageables peuvent être de nature immunologique ou non immunologique. De plus, il décrit que ces agents peuvent altérer la relation entre l'endothélium et les cellules sous-jacentes permettant d'augmenter les forces hémodynamiques et subséquemment le détachement des cellules stressées de l'endothélium, soit une manifestation référée sous le nom de dénudation endothéliale. Il propose ce concept dont l'origine repose sur des expériences *in vivo* où il observa que lorsque l'endothélium est endommagé mécaniquement, les lipides issus d'une diète riche en lipides favorisent le développement d'athérosclérose. Plus tard, la dénudation endothéliale sera redéfinie comme étant subséquente à la fois à l'apoptose des CE et à la dysfonction endothéliale, toutes deux conséquentes à un stress endothélial (61). Dr Ross suggère aussi que les sites d'insultes endothéliaux favorisent l'exposition de collagène permettant aux plaquettes d'y adhérer. Suivant cette adhésion, les facteurs dérivés des plaquettes activées ainsi que des protéines plasmatiques, telles que les lipoprotéines ainsi que des hormones, permettraient la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses aux sites d'insultes. Cette hypothèse suggère aussi que différents facteurs puissent exercer ces effets localement contribuant à la formation de tissu cicatriciel ainsi qu'à la déposition de lipides intra et extracellulaire. Finalement, il explique qu'initialement, ce processus de réparation permettrait de restaurer l'endothélium endommagé seulement si l'insulte initiale est limitée. Par contre, des cycles répétés de dommage endothélial, de prolifération et de réparation sur une longue période (des années) résultent en une prolifération progressive des CML sous l'endothélium caractérisant ainsi le remodelage vasculaire pathologique contribuant à la réduction de la lumière des vaisseaux sanguins (59).

Pathophysiologie de la VG

Les travaux de Russell Ross sont à ce jour plus pertinents que jamais. Ils ont servi de prémisses dans la compréhension de la pathophysiologie de la VG. La progression de la VG est maintenant définie selon 5 manifestations et est illustrée dans la figure 6 (62):

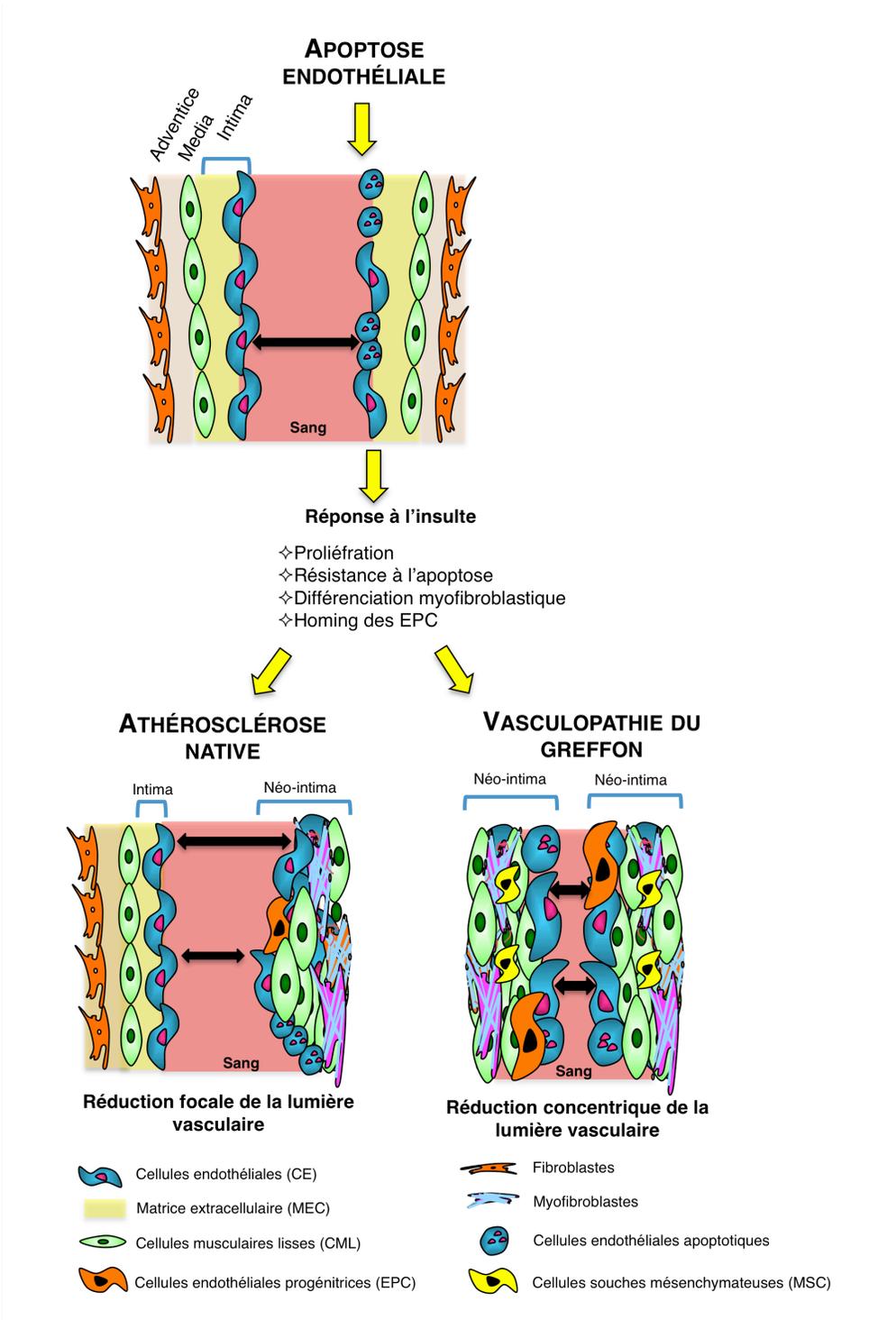
- 1) Acquisition d'un phénotype inflammatoire des CE. Les CE activées favorisent l'infiltration leucocytaire, la coagulation, l'agrégation plaquettaire participant à la thrombose, le tout associé à une diminution de la vasorelaxation. L'apoptose endothéliale est présente et résulte en une exposition de la MEC contribuant à exacerber l'état inflammatoire.
- 2) Altération de la prolifération des CML. Les CML acquièrent un état plutôt synthétique que contractile. L'hyper prolifération des CML est accompagnée d'une production importante de MEC contribuant ainsi à l'épaississement myo-intimal.

- 3) L'épaississement myo-intimal est accentué par l'inhibition de l'apoptose des CML potentialisant ainsi le processus de prolifération des CML.
- 4) Dérégulation des interactions cellules-cellules et cellules-MEC. La MEC régule le phénotype et le comportement des cellules adjacentes. La sécrétion de MMP (métalloprotéinases matricielles) par les CE est augmentée suivant le dommage cellulaire et participe à la dégradation de la MEC afin de générer des fragments bioactifs ayant des propriétés pro-prolifératives chez les CML.
- 5) Recrutement de cellules souches progénitrices endothéliales (EPC) du donneur aux sites d'insulte vasculaire du greffon.

L'hypothèse de réponse à l'insulte ainsi que le développement de la VG ont beaucoup de similitudes ainsi que des différences nous permettant de mieux comprendre le remodelage vasculaire pathologique.

Dans le cas de la VG, la réduction du diamètre du vaisseau est dite concentrique, et cet épaississement de formant une néo-intima est uniformisée dans la microcirculation du greffon. Cette manifestation est analogue à une strangulation intérieure de la lumière du vaisseau se manifestant dans tout l'arbre vasculaire du greffon. Dans le cas de l'athérosclérose classique, l'épaississement de la néo-intima est plutôt focal et excentrique affectant généralement davantage les artères proximales et rarement les veines (63). Dans les deux cas, l'épaississement néo-intimal résulte d'une migration et d'une prolifération de CML, de fibroblastes et de cellules souches mésenchymateuses (MSC) exprimant des fibres contractiles dont l'alpha-smooth muscle actin (α -SMA). Parallèlement, les EPC seraient aussi recrutées et participeraient au phénomène de ré-endothélialisation suite à la dénudation créée par la délétion cellulaire apoptotique aux sites d'insulte. Cette colonisation cellulaire est accompagnée d'une accumulation aberrante de MEC contribuant à l'aspect fibrotique de ce type de lésion (64-69).

Figure 5 - Illustration de l'hypothèse de réponse à l'insulte caractérisant l'athérosclérose native et la vasculopathie du greffon. Se référer au texte pour la description de ce schéma. Générée par I.S.

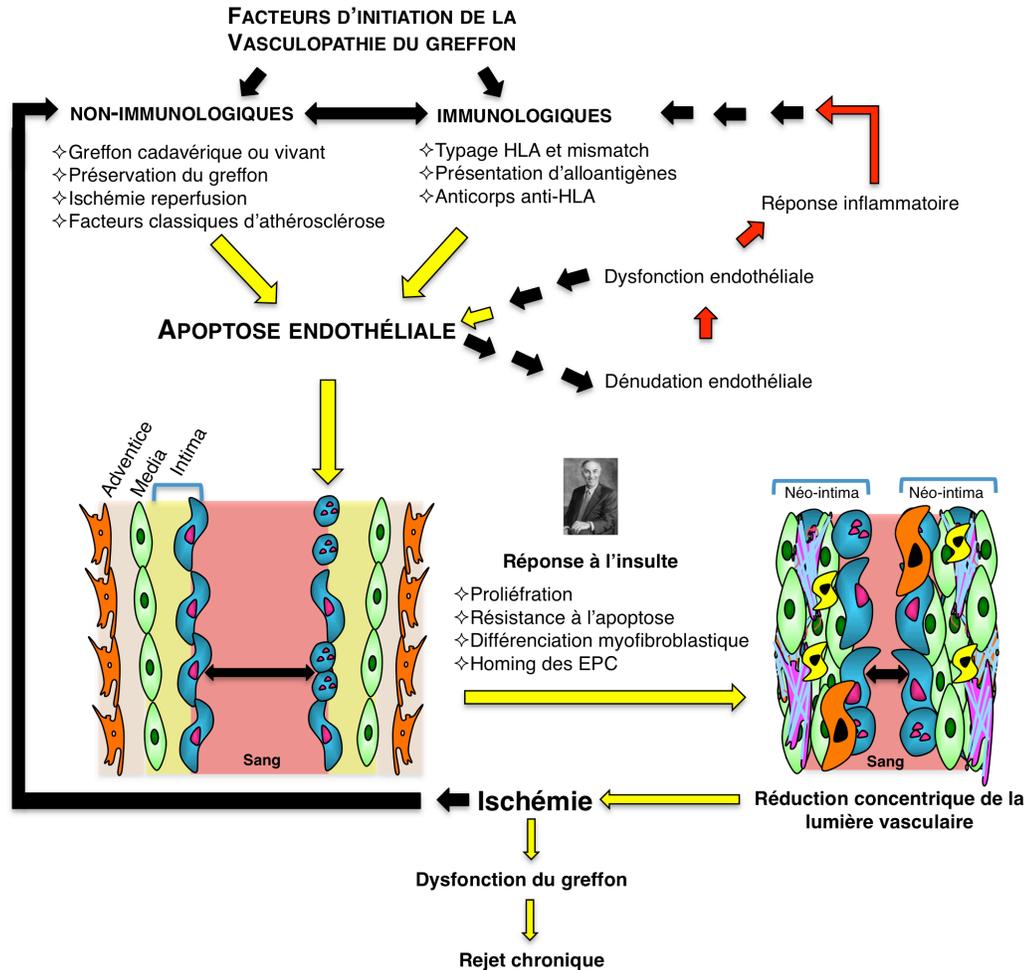


Importance de l'apoptose endothéliale et le remodelage vasculaire pathologique

Un autre aspect important et commun aux 2 pathologies est que l'on observe un taux anormalement élevé d'apoptose des cellules endothéliales contrairement à un état de résistance à l'apoptose des CML, fibroblastes et des EPC malgré l'environnement hostile créé par les cellules du système immunitaire recrutées aux sites d'insultes. L'endothélium est la cible de plusieurs facteurs pro-apoptotiques tel qu'illustré dans la figure 7 (70). Or, le point le plus crucial concernant le développement de la VG est associé à l'apoptose endothéliale de la paroi vasculaire initiée par des insultes immunologique et/ou non immunologiques (71). Par exemple, dans un modèle hétérotopique de transplantation cardiaque, l'apoptose est présente précocement suivant la transplantation et précède le développement de la néo-intima (48). L'importance de l'apoptose dans le développement de la VG dans ce modèle a été démontrée à l'aide d'une souris invalidée pour l'expression de la perforine, soit une enzyme importante exprimée par les CTL permettant d'induire l'apoptose endothéliale. Malgré que ces souris arborent de l'infiltration lymphocytaire, il y a moins d'apoptose endothéliale et moins de changements fibroprolifératifs associés à la VG comparativement aux souris contrôles. De façon similaire, des souris invalidées pour l'expression de la granzyme B, soit une autre protéine impliquée dans l'apoptose endothéliale induite par les CTL, recevant un segment d'allogreffe cardiaque démontraient les mêmes observations (72). Parallèlement, dans un modèle d'induction de rejet vasculaire aigu suivi du développement de la VG chez des porcs miniatures, l'apoptose endothéliale soutenue était corrélée avec le développement de la VG (73, 74). Finalement, il a été proposé que l'apoptose endothéliale induite par un rejet cellulaire ou humoral soit un déterminant clé dans le développement de la VG (73-76).

Concrètement, les événements suivant l'apoptose endothéliale sont associés à un état anti-apoptotique et pro-prolifératif des CML et des myofibroblastes retrouvés au sein de la néo-intima. Par exemple, les CML de la néo-intima sur-expriment Bcl-xL leur conférant une résistance à l'apoptose et l'inactivation de ce gène diminue le développement de la néo-intima *in vivo* (77-79). Finalement, l'apoptose endothéliale initie des mécanismes impliqués dans le développement de la VG via 1) l'augmentation d'un état endothélial hyperadhésif et thrombogénique, 2) via la production de TGF- β par les macrophages phagocytant les corps apoptotiques et 3) via la dégradation de la MEC permettant la production de facteurs fibrogéniques (71).

Figure 6: Illustration de la pathophysiologie de la vasculopathie du greffon. Se référer au texte pour la description de cette figure. Générée par I.S.



Les facteurs initiaux impliqués dans le développement de la VG et de l'athérosclérose native sont pour la plupart des facteurs pro-apoptotiques contribuant au dommage endothélial et sont prédictifs de l'évolution de ces 2 pathologies. Ce type de réponse peut être initialement bénéfique afin de réparer les vaisseaux endommagés. Par contre, tel que postulé dans l'hypothèse de réponse à l'insulte, lorsque les facteurs initiaux sont chroniquement présents, la réponse initialement physiologique devient pathologique (63). Somme toute, compte tenu que la VG représente un modèle accéléré de l'athérosclérose native, la compréhension des mécanismes pathophysiologiques de la VG permettraient aussi d'envisager des voies thérapeutiques pour les maladies vasculaires classiques.

Figure 7 : Facteurs pro et anti-apoptotiques pour l'endothélium. Reproduit de (70) avec la permission de American College Of Chest Physicians, copyright 2000.

Table 2—Some Pro- and Antiapoptotic Stimuli for Endothelial Cells*

Proapoptotic	Antiapoptotic
(Extracellular) adenosine and ATP ^{47,48}	Adrenomedullin ⁸⁶
Age ⁴⁸	Albumin ⁸⁷
Angiostatin ⁴⁹	Angiopoietin-1 ⁸⁸
Angiotensin II ⁵⁰	Antioxidants ⁵⁷
Antiendothelial cell antibodies ⁵¹	Apolipoprotein (apo) A ⁷⁶
Anti-dsDNA ⁵²	Calcium buffer or chelator ^{58,75}
Calcium, increased intracellular concentration ⁴⁸	Calcium channel blockers ⁷⁵
Cocaine ⁵³	Cyclosporin A ⁵⁰
Endostatin ⁵⁴	Endothelin-1 ^{70,89}
Homocysteine/adenosine ⁴⁷	Erythropoietin ⁶⁶
Hyperglycemia ^{55,56}	Estradiol ⁷
Hypothermia/rewarming ⁵⁷	Extracellular matrix components ⁶⁴
Hypertonic stress ^{58,59}	FGF ^{69,90}
Hypotonic stress ⁵⁸	Forskolin ⁶⁹
Hypoxia ⁶⁰	Glutamine ⁵⁹
Interleukin-1 β ⁴⁸	Hepatocyte growth factor ⁹⁰
Interferon- α , ⁶¹ interferon- γ ⁶²	HDL ⁷⁶
Intracellular acidosis ⁴⁷	Insulin-like growth factor ⁶⁹
Ischemia/reperfusion ⁶³	Integrins ⁶⁴
LPS ^{37,38,64-67}	Interleukin-10 ⁷⁹
Lupus anticoagulant ⁶⁸	Iron chelators ⁵¹
2-Methoxyestradiol ⁶⁹	Monocytes, in direct contact ⁵¹
Natriuretic peptides ⁷⁰	N-acetylcysteine ⁶⁷
Neutrophil proteases ⁷¹	NO, endogenous via eNOS ⁷²
NO, exogenous in high doses ^{70,72}	NO exogenous (low concentrations) ^{65,72}
NOS inhibition, in confluent cells ⁷³	NO, via iNOS activity, after >96 h ⁶⁵
Oxidized cholesterol ⁷⁴	Prostacyclin ⁹⁰
Oxidized LDL ^{50,75,76}	Shear stress ^{72,85}
Peroxynitrite ⁷⁷	VEGF ⁸⁴
Proinsulin ⁵⁶	Vitamin C ⁶⁷
Protein synthesis inhibitors ⁷⁸	Vitamin E ⁶⁷
Radiation ⁷⁹	
Serum starvation ^{80,81}	
Solid tumor cells, in direct contact ⁸²	
(Intracellular) <i>Staphylococcus aureus</i> ⁸³	
TGF- β 1 ⁴⁹	
TNF, soluble ^{37,49,50,72,78,84,85}	
TNF, transmembrane ⁷⁹	

*ATP = adenosine triphosphate; anti-dsDNA = anti-double-stranded DNA; HDL = high-density lipoprotein; iNOS = inducible nitric oxide synthase; TGF = transforming growth factor.

Facteurs initiaux impliqués dans le développement de la VG

Le greffon subit différents types d'insultes affectant de manière synchrone l'intégrité de son endothélium tapissant la microcirculation. Indépendamment du type d'insulte, i.e. immunologique ou non immunologique, l'impact du dommage endothélial est déterminant et prédictif de l'évolution de la VG. Les événements péri-opératoires associés à la transplantation ainsi que l'histoire médicale du greffon contribuent de manière importante à initier une réponse au stress suivi par l'induction de l'apoptose endothéliale et l'activation précoce des mécanismes de réparation vasculaire. De plus, le stress non physiologique associé à la transplantation recrute plusieurs régiments cellulaires de l'immunité innée et acquise incluant les cellules T, les macrophages et les anticorps. Finalement, afin de rendre le tout encore plus complexe, les facteurs non-immunologiques contribuent non seulement à endommager l'endothélium; ils participent aussi à amplifier la réponse immunitaire formant ainsi une boucle d'amplification autonome résultant en un dommage chronique et au rejet du greffon.

Facteurs non immunologiques

Avant même de rencontrer le système immunitaire de l'hôte, le greffon subit d'importants stress d'origines non immunologiques. De ce fait, l'origine du greffon (vivant ou cadavérique), la santé métabolique du donneur ainsi que celle du receveur sont des facteurs déterminants pour la survie du greffon et le développement de la VG. Ces différents facteurs ont pour effet de créer un environnement où l'endothélium expérimente des épisodes de stress oxydatif, de stress métabolique et de stress associé au réticulum endoplasmique (RE). Tous ces stress contribuent à induire l'apoptose endothéliale et le développement de la VG.

1) Préservation des greffons

Un aspect peu documenté concernant les différents stress que le greffon expérimente avant la transplantation a trait à sa préservation dans différentes solutions incluant la solution de Belzer (80). Mis à part la présence d'insuline, cette solution permet de conserver une osmolarité adéquate mais contient peu de facteur de croissance. Par conséquent, le greffon subit déjà un type de stress associé à la déprivation de facteur de croissance pouvant ainsi initier l'activation de ses mécanismes de réponse au stress.

2) *L'ischémie reperfusion*

La présence initiale de maladies vasculaires chez le donneur ainsi que la diminution du nombre de néphrons associée à l'âge (65 ans et plus) ont un impact significatif sur la survie à long terme du greffon (16). Parallèlement, il est désormais évident que les greffons provenant de donneurs vivants comparativement aux greffons d'origine cadavérique avec ou sans mort cérébrale représentent un bénéfice net pour la survie du greffon à court et long terme. Par exemple, les catécholamines libérées dans un contexte de mort cérébrale ainsi que l'utilisation de vasopresseurs contribuant au maintien mécanique de la circulation sanguine contribuent significativement à l'ischémie résultant en un stress oxydatif pour le greffon et le développement de la VG (81). Ajoutons aussi que la mort cérébrale initie l'expression de médiateurs inflammatoires dans les organes périphériques induisant une réponse immunitaire plus intense et accélérée comparativement à des donneurs vivants sous anesthésie générale (82).

Dans un contexte de transplantation, le greffon expérimente trois étapes séquentielles d'ischémie; 1) ischémie dite 'chaude' lorsque le greffon est retiré chirurgicalement du donneur; 2) l'ischémie 'froide' durant l'intervalle associé au transport et la préservation de l'organe; 3) ischémie 'chaude' lors de la greffe (83). Gaudin et al. ont démontré par le biais de biopsies humaines que le dommage associé à l'ischémie reperfusion durant les périodes péri-opératoires prédit le développement de la VG (84). De plus, il a été démontré que l'ischémie reperfusion à elle seule induit la VG dans des modèles murins d'isogreffe démontrant ainsi que ce facteur peut être indépendant de la réponse allogénique (58, 85). Finalement, les travaux de Scarabelli et al. ont démontré dans un modèle d'ischémie reperfusion que l'apoptose endothéliale précède le recrutement de CML aux sites d'insultes endothéliales démontrant son rôle clé dans l'initiation des changements cellulaires associés à la VG (86).

3) *Facteurs classiques d'athérosclérose*

Étant donné la grande similitude entre la VG et l'athérosclérose native, il n'est pas surprenant que plusieurs des facteurs classiques et prédictifs de l'athérosclérose assument le même rôle dans la VG. Un argument favorable à cette idée repose sur le fait que ces facteurs induisent la VG dans des modèles animaux indépendamment de la participation du système immunitaire (modèles d'isogreffes ou modèles animaux n'ayant pas d'immunité acquise) (16, 53).

Hyperlipidémie

Dans un modèle hétérotopique de transplantation cardiaque chez le lapin soumis à une diète riche en cholestérol, l'hypercholestérolémie est directement associée à la VG et les artères coronaires transplantées sont davantage affectées que les artères natives (87). De plus, de nombreuses études ont démontré l'importance des LDL oxydés dans l'induction de l'apoptose endothéliale et son rôle prédictif dans le développement de l'athérosclérose et de la VG (88-92). Chez l'humain, des études randomisées ont démontré que les patients traités avec des statines (agents pharmacologiques classiquement prescrits pour traiter la dyslipidémie associée aux maladies athérosclérotiques) rapidement après la transplantation diminue significativement l'incidence et la sévérité de la VG (93). Finalement, une étude récente a démontré que l'utilisation d'un autre agent pharmacologique (diosgenin) permettrait de diminuer l'hypercholestérolémie chez des rats soumis à une diète riche en cholestérol. Ils ont démontré *in vitro* que le sérum des rats traités avec le diosgenin avait une activité enzymatique anti-oxydante augmentée et une incidence diminuée de lipides peroxydés. Parallèlement, ils ont démontré que le diosgenin inhibe l'apoptose endothéliale induite par le peroxyde d'hydrogène, soit un modèle classique d'induction de l'apoptose endothéliale induite par un stress oxydatif (94). Malgré que l'effet bénéfique des statines puisse être relié à un effet immunomodulateur, il n'est pas exclu qu'une thérapie prophylactique à l'aide d'inhibiteurs de HMG-CoA réductase chez les patients transplantés puisse diminuer l'incidence de la VG.

Hypertension

Tout comme pour l'athérosclérose native, l'hypertension est un facteur de risque prédictif de la VG et très commun chez les patients ayant un greffon rénal. Plusieurs facteurs contribuent à l'hypertension post-greffe; histoire d'hypertension chez le donneur, des épisodes de rejet aigu récurrents et l'utilisation d'immunosuppresseurs (95).

Le rein est un organe participant à la régulation de la pression sanguine via le système rénine angiotensine (95). Par conséquent, l'hypertension peut être le résultat d'une perte fonctionnelle et progressive du greffon ne pouvant plus assurer aussi efficacement son travail. Inversement, l'hypertension peut être initiée par la prise d'immunosuppresseurs, dont la cyclosporine, affectant directement l'intégrité du greffon et contribuant à la VG. Un exemple d'augmentation significative d'apoptose endothéliale au niveau de la microcirculation (artérioles, capillaires et veinules) induite

par l'hypertension est documenté dans un modèle de rats hypertendus via l'administration de la desaméthasone, un glucocorticoïde synthétique (96). Récemment, plusieurs études ont décrit le rôle du système rénine angiotensine à titre de déterminant dans la pathophysiologie de la VG. L'activation soutenue de ce système semble participer à la fibrose parenchymateuse du greffon de manière TGF- β dépendante. L'utilisation d'agents bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine ou des inhibiteurs de l'enzyme ACE (Angiotensin converting enzyme) a pour effet de diminuer les taux sériques de TGF- β ainsi que la VG dans un modèle de rat (97).

Autres facteurs

Le sexe du donneur (masculin dans ce cas-ci), l'obésité (98) et le tabagisme sont aussi des facteurs associés à la VG. Les produits toxiques retrouvés dans le tabac sont aussi des facteurs pro-apoptotiques capables d'induire l'apoptose endothéliale via l'activation de la caspase-3 (99) (100).

Facteurs immunologiques

La classification de Banff repose sur la participation de différents acteurs biologiques i.e. les cellules T et macrophages (TCMR) et les anticorps (AMR), répertoriant ainsi les facteurs immunologiques les mieux décrits jusqu'à maintenant. En plus de ces médiateurs, le système du complément de la réponse immunitaire innée participe aussi à créer un environnement hostile en réponse aux dommages cellulaires péri-opératoires entourant la greffe, contribuant subséquemment au développement de la VG.

1) Typage HLA et mismatch

Tel que mentionné précédemment, le typage HLA dresse un profil immunologique permettant d'évaluer le degré de compatibilité avec un greffon donné. Des études ont démontré l'utilité incontournable du typage HLA; chaque HLA-mismatch réduit individuellement la survie du greffon de 5%; 6 HLA-mismatch combinés ont pour effet de projeter un taux de survie de 20 ans à seulement 13% (101-103). Parallèlement, le nombre d'épisodes de rejet aigu est aussi un facteur de risque important prédicteur de la VG (104-106). Par conséquent, le typage HLA représente un facteur immunologique important.

2) Présentation d'allo antigènes aux cellules immunitaires de l'hôte

Ce qui rend le typage HLA si important repose sur les propriétés des lymphocytes T de détecter justement la présence intacte ou fragmentaires d'alloantigènes via le complexe CMH présenté par des cellules présentatrices d'antigènes (APC). Ces APC sont représentés par les cellules dendritiques (CD) et les macrophages ainsi que par des APC non professionnels telles que les cellules endothéliales et les épithéliales. Les greffons contribuent à l'activation des lymphocytes via 3 mécanismes (51) :

- 1) La reconnaissance directe où les récepteurs des lymphocytes T de l'hôte se lient avec un CMH allogénique intact provenant du greffon. Ce type de présentation est plutôt associé aux stades précoces du rejet et induit une réponse cytotoxique via les lymphocytes CD8⁺;
- 2) La reconnaissance indirecte où les récepteurs des lymphocytes T de l'hôte se lient avec des fragments polymorphiques allogéniques CMH présentés par les APC de l'hôte. Cette situation découle des dommages occasionnés par les procédures péri-opératoires incluant l'ischémie reperfusion ou via la présentation directe. Ce dommage permet l'endocytose de fragments membranaires permettant de charger les allopeptides CMH sur le complexe CMH de classe II de l'hôte. Les lymphocytes CD4⁺ sont principalement interpellés et initie une large production de cytokines.
- 3) La reconnaissance semi directe fait appel aux APC professionnels de l'hôte présentant des allopeptides allogéniques intacts ou fragmentaires aux lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ respectivement.

Les reconnaissances d'alloantigènes indirecte et semi directe sont les mécanismes principaux impliqués dans le développement de la VG. Une fois le complexe ligand récepteur engagé, une molécule co-stimulatrice est requise afin de compléter l'activation des lymphocytes T avec la cellule cible. Ce 2^{ème} signal est souvent représenté par des paires de récepteurs-ligands (CTLA4/CD86; CD40/CD154, ICOS/ICOSL, OX40/OX40L et CD27/CD70). L'inhibition d'une seule de ces combinaisons (génétiquement ou via des récepteurs solubles) est suffisante pour diminuer le rejet aigu mais il faut invalider au moins 2 types de molécules co-stimulatrices afin d'avoir une diminution du rejet chronique. Une fois activé, les lymphocytes T s'attaquent à l'endothélium et induisent du dommage cellulaire via l'induction de l'apoptose. Le tout est accompagné d'une vague de sécrétion de chemokines, de cytokines et l'expression de molécules de surface (ICAM-1 et VCAM-1) recrutant ainsi davantage de lymphocytes et de macrophages aux sites d'insultes. En plus de stimuler le système immunitaire, le dommage endothélial favorise l'adhésion plaquettaire et l'activation de la cascade de coagulation (29).

3) *Les anticorps anti-HLA*

Tel que discuté précédemment, la participation des anticorps à titre de déterminants immunologiques dans le développement de la VG prend de plus en plus d'ampleur dans notre compréhension actuelle du rejet. En fait, les anticorps se liant à des alloantigènes de type HLA ont à la fois un effet direct sur les fonctions endothéliales et un effet indirect sur le recrutement des macrophages et des leucocytes.

A) *Exocytose, agrégation plaquettaire et recrutement cellulaire*

Le complexe formé entre les anticorps et les alloantigènes du CMH de classe I initie l'exocytose rapide de molécules d'adhésion incluant le von Willebrand factor (VWF) et P-selectin entreposés dans les granules de Weibel-Palade (WPBs) des cellules endothéliales (107). De plus, ce complexe favorise l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 favorisant davantage l'adhésion leucocytaire (108). En retour, le VWF contribue à l'agrégation plaquettaire et le recrutement de monocytes en favorisant leur ancrage au niveau de l'endothélium tandis que la P-selectin sert de molécule co-stimulatrice pour la production de médiateurs inflammatoires dont MCP-1(109). MCP-1 sécrété par l'endothélium permet de recruter les monocytes et les macrophages qui possèdent un récepteur compatible (FcR) avec la portion Fc de l'anticorps fixé à l'endothélium. Cette interaction permet une activation des macrophages et des leucocytes, soient des acteurs clés dans le développement de la VG (110).

B) *Effets proliférateurs des anticorps fixés à l'endothélium*

À bas titres, les anti-HLA initient plusieurs réponses favorisant la réorganisation du cytosquelette afin d'assurer la migration, la prolifération cellulaire ainsi qu'une signalisation de survie (111). La fixation des anticorps anti-HLA de classe I initie la formation de fibres de stress via la famille de protéines Rho. L'activité de Rho-GTP induit la phosphorylation de ROK et stimule la réorganisation et l'assemblage des fibres de stress. Une exposition à long terme des inhibiteurs de ROK diminue le développement de la VG chez les greffons cardiaques de souris (112).

De plus, les anticorps anti-HLA induisent une signalisation intracellulaire pro-proliférative chez CML et les CE, des événements clés dans le développement de l'épaississement myo-intimal caractérisant la VG (39). L'effet proliférateur des anticorps anti-HLA chez les CE et les SMC

implique le complexe de signalisation mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) permettant d'activer la prolifération cellulaire via une augmentation de la traduction/synthèse protéique. À forte concentration d'anticorps, la signalisation intracellulaire coopère avec les récepteurs du FGF permettant d'activer la voie MAPK et influencer la prolifération cellulaire. Finalement, les anticorps peuvent induire une signalisation de survie via le complexe mTORC2 et AKT en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 et Bcl-xL conférant transitoirement un état de résistance aux CE (111).

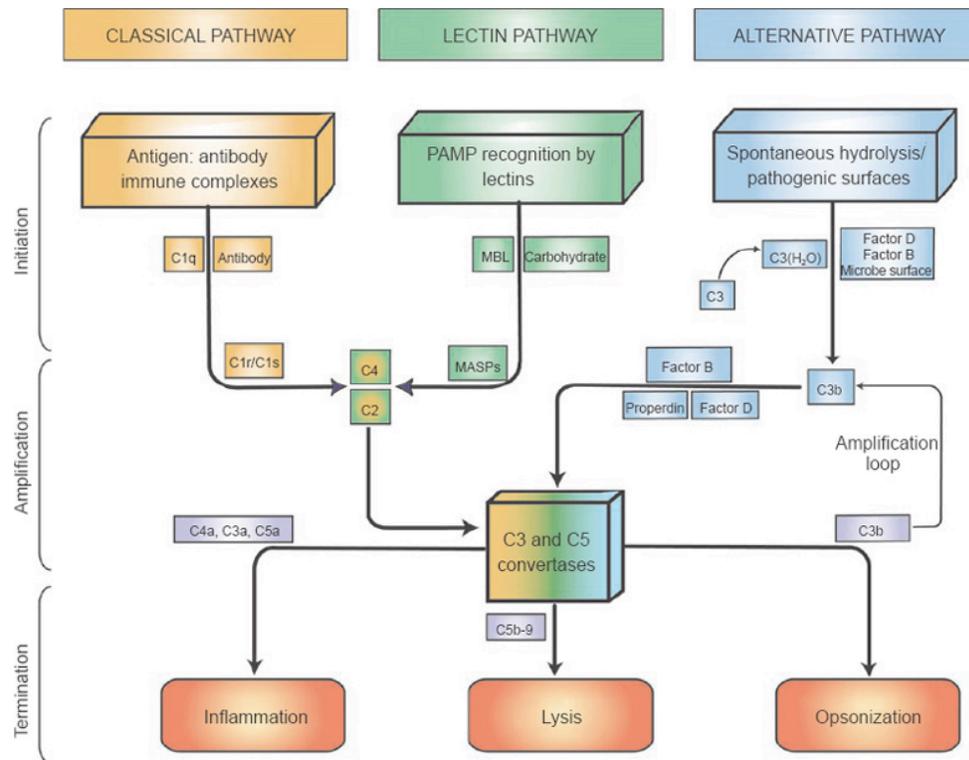
C) Effet synergique des anticorps sur l'activation du système du complément.

En plus de ses effets sur l'endothélium et le recrutement des cellules immunitaires, le complexe anticorps-alloantigène peut altérer les fonctions endothéliales et leucocytaires via l'activation du système du complément. Le potentiel pathogénique du système du complément repose sur sa capacité à amplifier les réponses immunitaires innée et acquise. En fait, les anticorps fixés à l'endothélium servent de sites d'ancrage pour différents facteurs d'initiation de la cascade du complément. Les produits générés des réactions enzymatiques de la cascade du complément deviennent des ligands à la surface de l'endothélium pour les récepteurs présents à la surface des neutrophiles, monocytes, macrophages, lymphocytes T et B ainsi que les cellules NK. Le système du complément peut être activé via 3 mécanismes qui convergent vers la production de C3 (Figure 8) (113) :

- 1) La voie classique initiée par des complexes antigènes-anticorps et C1q permettant d'activer les convertases C3 et C5.
- 2) La voie lectine implique l'interaction de récepteurs (pattern recognition receptors (PRR)), tel que le MBL (mannose-binding lectin) interagissant avec les structures d'oligosaccharide présentes à la surface de plusieurs agents pathogènes d'où leur nom : pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Les PRR reconnaissent les structures d'oligosaccharides PAMP ce qui induit le recrutement de MASPs, (MBL associated serine protease) ayant des fonctions et des structures similaires au C1q de la voie classique. Cette voie mène aussi à l'activation des convertases C3 et C5.
- 3) La voie alternative implique une hydrolyse spontanée de C3 et forme un complexe avec les facteurs B, D et la properdine (stabilise le complexe) afin de former la C3 convertase. Cette

voie est activée constitutivement et contient un potentiel d'amplification important via c3b et elle fait office de plusieurs niveaux de régulation.

Figure 8 : Le système du complément. Reproduit de (113) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Cell Research ; copyright 2010.



Légende: La voie du complément. Le complément peut être activé via 3 voies : la voie classique, la voie lectine et la voie alternative. La voie classique du complément est activée lorsque C1q se lie à un anticorps attaché à un antigène permettant l'activation de C1r et C1s. C1s clive C4 et C2. La voie lectine est activée lorsque des motifs 'mannose-binding lectin' (MBL) rencontrent des motifs conservés et formés de carbohydrates pathogéniques permettant d'activer des protéases associées aux MBL (MASPs) qui clivent à leur tour C4 et C2. Les produits de clivage C4 et C2 forment la convertase C3, (C4bC2a), qui clive C3 en C3b et C3a. Une deuxième molécule de C3b peut s'associer avec C4bC2a afin de former la convertase C5 (C4bC2aC3b) de la voie classique et la voie lectine. La voie alternative (AP) est activée lorsque C3 subit une hydrolyse spontanée et forme la convertase C3 de la voie AP (C3(H₂O)Bb) en présence des Facteurs B et D, menant à un clivage additionnel de C3 et la formation éventuelle des convertases C3 (C3bBb) et C5 (C3bBbC3b) de la voie AP. Properdine facilite l'activation de la voie AP en stabilisant les convertases de la voie AP. Ces trois voies convergent communément à la formation de convertases qui en retour génère les effecteurs principaux du système du complément : anaphylatoxines (C4a/C3a/C5a), le complexe membranaire

d'attaque (Membrane attack complex, (MAC)), et les opsonines (i.e. C3b). Les anaphylatoxines sont de puissantes molécules pro inflammatoires dérivées des clivages de C4, C3 et C5. Le MAC est l'assemblage terminal des composants du complément dont C5b via C9 qui peut directement induire la lyse de surfaces cibles. C3b induit la phagocytose des cibles opsonisées et sert aussi à amplifier l'activation du complément via AP.

Dans un contexte de transplantation, les anticorps fixés à l'endothélium servent de site d'ancrage pour le substrat initial C1q de la voie classique initiant ainsi une série de réactions enzymatiques permettant de générer le C3. Une fois généré, C3 ainsi que C5 sont clivés en produits biologiquement actifs ayant des propriétés chemo-attractives pour les leucocytes et les monocytes exprimant des récepteurs compatibles, i.e. C3aR et C5aR. Ces interactions favorisent la production de cytokines pro-inflammatoires incluant IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- α . Finalement, les composantes terminales de l'activation du complément (C5b-C9) forment une structure tubulaire appelée membrane attack complex (MAC). La formation du MAC favorise l'exocytose du facteur VWF et de la p-selectin représentant ainsi un 2^{ème} mécanisme d'initiation favorisant l'agrégation plaquettaire et le recrutement des leucocytes et des macrophages tel que discuté précédemment (114). Finalement, le MAC peut aussi induire l'apoptose de manière caspase-dépendante probablement de manière analogue à la voie d'induction par le système perforine-granzyme (115). Il est intéressant d'observer que la fixation des anticorps au niveau de l'endothélium peut favoriser un phénotype de résistance et peut aussi induire l'apoptose via le recrutement du système du complément.

Facteurs non-immunologiques + facteurs immunologiques : Formation d'une boucle d'insulte autonome

L'ischémie reperfusion a un effet amplificateur sur le recrutement de facteurs immunologiques impliqués dans le développement de la VG. L'activation du système du complément est une caractéristique importante de la réponse inflammatoire générée par l'ischémie reperfusion et les traitements d'hémodialyse (116, 117). L'endothélium ischémique sécrète d'importantes chemokines dont le TNF- α et IL-1 et favorisent l'expression des molécules du CMH à sa surface. En retour, cette stimulation a pour effet d'induire une seconde vague de sécrétion de cytokines telles que IL-8, Gro- α , MIP-2 et MCP-1 permettant de recruter les neutrophiles et les macrophages au site d'insulte (98, 118). Mis à part ces molécules, le C-reactive protein (CRP) et le MBL sont sécrétés suivant l'ischémie reperfusion et activent les voies classique et MBL du système du complément

respectivement. Le CRP est une protéine sécrétée dans le sang par le foie en réponse à des traumatismes, chirurgies ou infections. Sa concentration plasmatique est rapidement augmentée par un facteur de 1000 des heures à des jours suivants les traumatismes (119). De ce fait, des niveaux élevés de CRP sériques ont été documentés plusieurs jours suivant une greffe rénale ou cardiaque (120, 121).

CRP peut interagir avec différents ligands. Par exemple, il interagit avec la membrane plasmique des cellules stressées via la phosphatidylcholine et la sphingomyéline ainsi qu'avec la chromatine exposée sur les cellules nécrotiques. De plus, il peut lier des composantes de la MEC incluant la laminine et la fibronectine. Lorsque le CRP est complexé avec l'un de ces ligands, il peut activer la voie classique du complément en interagissant avec la région collagen-like de C1q. De façon analogue à la portion Fc des anticorps anti-HLA de classe I décrit précédemment, le CRP peut aussi recruter les leucocytes et les macrophages suivant une interaction avec les récepteurs Fc (FcR) présents à leur surface (114). Finalement, la colocalisation du CRP et du complément a été démontrée *in vivo* au niveau de lésions athérosclérotiques et dans les infarctus aigus du myocarde suivant un dommage ischémique (122).

En plus du CRP, la colocalisation du MBL et de la déposition du complément sur l'endothélium vasculaire suivant un stress oxydatif a été démontrée *in vitro*. Ce même phénomène a été observé *in vivo* suivant l'arrêt de circulation sanguine temporaire d'une artère coronaire irrigant des cœurs de rat (123). Finalement, tout comme le CRP, le MBL peut aussi servir de ligand pour les récepteurs des macrophages, permettant ainsi de générer une boucle d'amplification menant à une activation massive de ces cellules (124).

En résumé, dans un contexte de transplantation, les facteurs non-immunologiques sont des paramètres contribuant à la sévérité du rejet et à la survie du greffon (125-127). Ils sont d'autant plus importants compte tenu qu'ils forment une 1^{ère} vague de stress pour l'endothélium permettant de générer la production de médiateurs impliqués dans le recrutement de la première ligne de défense innée du système immunitaire, le système du complément. En retour, le système du complément participe à l'activation et à la mobilisation des types cellulaires associés au système immunitaire et impliqués dans le développement de la VG.

Chapitre 4 - Endothélium, réponse au stress et mort cellulaire

"Life is pleasant. Death is peaceful. It's the transition that's troublesome."

- Isaac Asimov

Ce chapitre expose les différentes fonctions de l'endothélium afin de comprendre comment la perte de son intégrité affecte ses mécanismes de réponse au stress et l'induction de la mort cellulaire apoptotique, soit un événement clé dans le développement de la VG.

Fonctions endothéliales

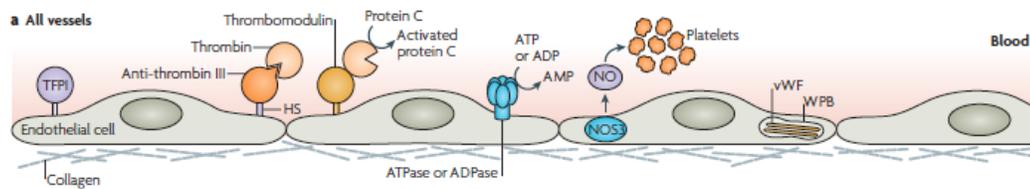
L'endothélium forme la 1^{ère} barrière physique entre le sang et les tissus de l'arbre vasculaire et couvre approximativement une surface de 1000 m² par l'entremise d'un trillion de cellules endothéliales (128). Il assure avec efficacité différentes fonctions lui permettant de s'adapter rapidement aux changements de son environnement. À l'état basal, l'endothélium maintient une homéostasie circulatoire et anti-inflammatoire via des fonctions faisant appel entre autres à ses capacités de sécrétion et de séquestration. Ces fonctions garantissent une fluidité sanguine, un échange minimal contrôlé de molécules et de fluides entre le sang et les tissus, un tonus vasculaire souple, un état inflammatoire quiescent et une participation à l'immunosurveillance.

Coagulation

Parmi les fonctions de l'endothélium, on dénote sa capacité à réguler la fluidité du sang. Pour y parvenir, l'endothélium séquestre et régule l'expression de différents facteurs de coagulation impliqués dans la formation d'un thrombus. Les différents mécanismes d'inhibition sont impliqués durant l'initiation et la terminaison du processus de coagulation. Parmi ces mécanismes, l'endothélium inhibe l'activation de la cascade de coagulation en séquestrant des groupements phosphatidylserine (PS) dans la membrane cytoplasmique interne. Par contre, lorsque l'endothélium est stressé ou blessé, l'exposition extracellulaire du PS permet de créer un site favorable au recrutement des facteurs de coagulation (129). De plus, l'endothélium exprime à l'état basal des facteurs permettant d'inhiber le processus de coagulation incluant 1) la thrombomoduline (TM) qui permet d'activer la protéine C qui détruit certains facteurs de coagulation inhibant ainsi des étapes de la coagulation, 2) des protéoglycans héparan sulfate (HS) qui permettent de lier

l'antithrombine III (ATIII) qui séquestre et inhibe la thrombine, 3) annexin V qui permet de prévenir la liaison des facteurs de coagulation, et 4) le tissue factor pathway inhibitor (TFPI) qui inhibe le complexe VIIa-TF-factor Xa (Figure 9) (130). La fonction sécrétoire de l'endothélium joue aussi un rôle dans le processus de terminaison de la coagulation. Par exemple, l'endothélium au repos inhibe l'adhésion et l'agrégation des plaquettes en sécrétant l'oxyde d'azote (NO) et la prostaglandine I₂ (131).

Figure 9 : Inhibition de la cascade de coagulation par l'endothélium au repos. Reproduit de (129) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nat Rev Immunol ; copyright 2007.



Légende: Fonctions des CE au repos. A. Toutes les CE inhibent la coagulation sanguine. Les CE lient et présentent à leur surface des inhibiteurs (Tissue factor pathway inhibitors) prévenant ainsi l'initiation de la coagulation en bloquant l'action du complexe factor-VIIa-Tissue-factor. Les CE synthétisent et présentent des protéoglycans héparan sulfate (HS) à leur surface ayant des propriétés anticoagulantes qui permettent à l'antithrombine III d'être capable d'inhiber les molécules de thrombines générées par la cascade de coagulation. Les CE synthétisent et présentent la protéine thrombomoduline, qui lie la thrombine et converti la spécificité de son substrat de clivage du fibrinogène (étape clé dans la formation d'un caillot) en un clivage et l'activation de la protéine C. Cette dernière est une enzyme qui détruit certains facteurs de coagulation qui inhibent la coagulation. Les processus clés afin de prévenir l'activation plaquettaire (et par conséquent, la coagulation) inclut l'inactivation de la thrombine, la conversion de l'ATP en AMP inerte via l'action d'ATPases et de ADPases, et l'inhibition de l'interaction physique entre les plaquettes et le collagène qui peut activer les plaquettes. Les CE séquestrent aussi le von Willebrand factor (vWF), une protéine qui renforce l'interaction des plaquettes avec la membrane basale, en le séquestrant à l'intérieur de granules de sécrétion connus sous le nom de Weibel-Palade bodies (WPB). L'oxyde d'azote (NO), généré par la nitric-oxide synthase 3 (NOS3) via la conversion de l'arginine, permet de surcroît d'inhiber l'activation plaquettaire.

Trafic protéique et tonus musculaire

L'endothélium est sélectivement perméable pour le passage de molécules et de fluides vers les tissus et sa structure varie en fonction de sa localisation dépendamment du rôle physiologique qu'il

doit assumer. Par exemple, l'endothélium des capillaires forme des jonctions adhérentes via la cadherine vasculaire endothéliale (VE-Cadherin) et serrées via claudin 5 distribuées de manière entremêlée entre les cellules endothéliales empêchant le passage protéique. Ces jonctions sont connectées à l'actine et la tubuline du cytosquelette à l'aide de protéines intracellulaires dont les cadhérines, permettant ainsi au cytosquelette de se réorganiser afin de contrôler le passage paracellulaire. Ces jonctions servent aussi de plates-formes de signalisation permettant de réguler la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales. En plus des jonctions serrées et adhérentes, les cellules endothéliales des capillaires continus ou discontinus peuvent former des pores transendothéliaux référés sous le nom de 'fenestrae'. Ces fenestrae peuvent être complètement ouverts ou bien recouverts d'un diaphragme protéique favorisant la filtration de l'insudat sanguin tel qu'illustré dans le cas des capillaires des glomérules rénaux (132).

Par contre, dans la plupart des tissus, le trafic protéique au niveau des capillaires est activement régulé par des systèmes vésiculaires spécialisés permettant à la fois de favoriser le passage de protéines à travers la barrière endothéliale en plus de réguler leur redistribution à l'intérieur même de la cellule (133). Par exemple, des invaginations de la membrane référées sous le nom de cavéoles peuvent se détacher de la membrane luminale et transporter des protéines du côté abluminale de l'endothélium. Ces cavéoles sont riches en cholestérol et en glycosphingolipides et sont organisées au sein de radeaux lipidiques (lipid rafts), soit des agrégations lipidiques concentrées de récepteurs et de systèmes de signalisation. Finalement, l'endothélium recouvrant les veinules contient des structures complexes dénommées vesicular-vacuolar organelles (VVOs) apparentées aux cavéolines et localisées à proximité des jonctions cellulaires. Ce système pourrait participer à la transcytose de protéines plasmatiques durant l'inflammation et l'angiogénèse (134).

L'endothélium sécrète aussi des médiateurs permettant d'assurer un maintien du tonus vasculaire par les CML. Les CE sont électriquement couplées avec les CML via des jonctions GAP. Les 2 principaux agents vasodilatateurs sécrétés par les CE affectant le potentiel membranaire des CML sont le NO et le 'endothelium-derived relaxing factor'. Les CE produisent aussi des agents vasoconstricteurs dont endothéline-1. L'équilibre du flux sanguin est régulé par les CE qui intègrent et coordonnent les signaux mécanique et neuronal permettant de s'adapter à différentes conditions (129, 135).

État inflammatoire quiescent et immunosurveillance

À l'état basal, l'endothélium séquestre et supprime l'expression de protéines impliquées dans l'interaction entre les leucocytes et l'endothélium, soit l'une des étapes initiales du processus d'inflammation. Pour conserver cet état non inflammatoire, les chemokines IL-8, l'eotaxin, P-selectin et α 1,3-fucosyltransferase-VI sont confinées dans les WPBs (136). Un mécanisme de régulation additionnel à leur séquestration dans les WPBs repose sur leur régulation transcriptionnelle. Par exemple, il a été démontré que la régulation de l'expression génique de IL-8 peut être régulée par une stimulation au TNF- α qui induit simultanément une liaison coopérative entre des facteurs de transcription de la famille C/EBP et NF- κ B aux régions du promoteur du gène IL-8 (137). Finalement, l'endothélium inhibe aussi l'expression transcriptionnelle de différentes molécules d'adhésion telles que E-Selectin, VCAM 1 et ICAM1 impliquées dans l'interaction avec les leucocytes (129, 135).

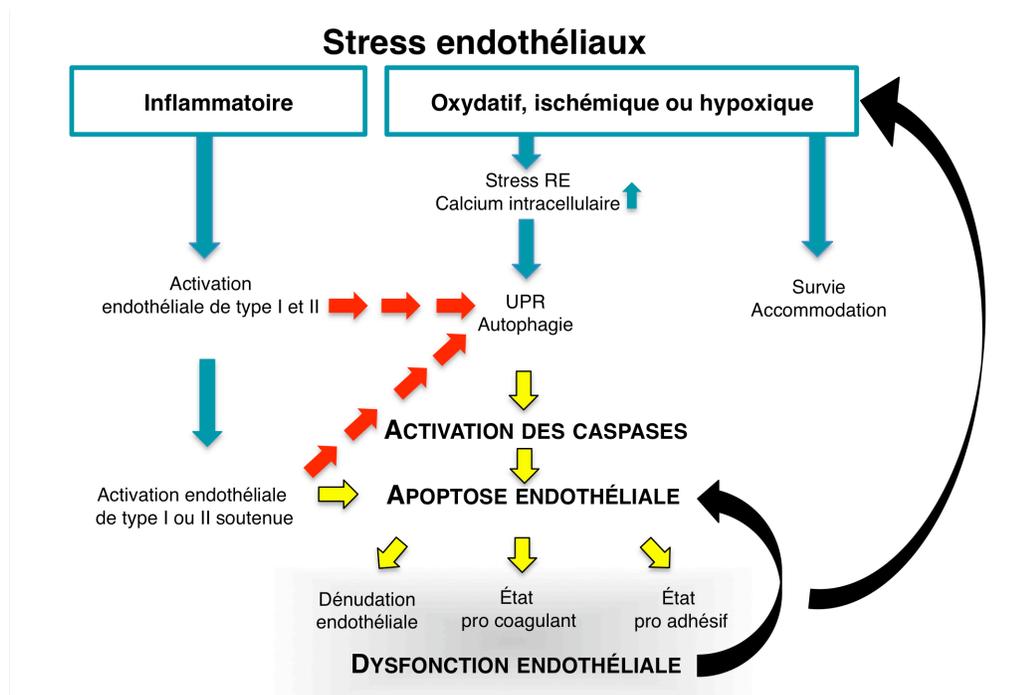
Finalement, on reconnaît maintenant que l'endothélium joue un rôle dans l'immunosurveillance, le positionnant ainsi à titre de déterminant dans la vasculopathie du greffon. Par exemple, les interactions réversibles entre les CD et l'endothélium pourraient augmenter la capture et la présentation d'antigène aux sites d'inflammation et dans le système lymphatique. Ces interactions via les E- et P- selectin avec l'endothélium permettraient aux CD d'évaluer localement la présence de signaux activateurs (chemokines) et faire l'extravasation vers les tissus enflammés (138). Les lymphocytes T circulant dans le sang forment aussi des interactions transitoires avec l'endothélium. Dans le cas des capillaires, la grosseur des lymphocytes T est pratiquement similaire à la lumière des capillaires générant forcément des points de contact avec l'endothélium. De plus, les CE des capillaires et des veinules de la microvascularisation expriment des molécules du MHC de classes I et II présentant des peptides étrangers pouvant générer réponse cellulaire T. Le concept d'immunosurveillance prédit que les lymphocytes T devraient être capables d'accéder à tous les tissus, un principe qui peut être élargi en incluant la possibilité que lorsqu'un antigène fonctionnel est absent pour une présentation efficace, les lymphocytes T peuvent repartir ou mourir sur place (139).

L'endothélium en réponse au stress

L'endothélium dispose de plusieurs mécanismes lui permettant de s'adapter transitoirement ou chroniquement aux changements reliés à son environnement. Dépendamment du type d'insulte initial, l'endothélium peut s'activer. Ce processus inflammatoire est provisoirement bénéfique et permet de recruter différentes populations cellulaires du système immunitaire. Parallèlement, l'endothélium peut adopter un phénotype de résistance en plus de favoriser l'autophagie et le UPR

(unfolding protein response), lui permettant ainsi de survivre temporairement au type de stress qu'il expérimente (Figure 10). Toutefois, lorsque l'adaptation et la résistance ne suffisent plus aux tensions environnementales, les mécanismes de réponse au stress déplacent l'équilibre vers l'induction de la mort cellulaire apoptotique créant ainsi un dommage cellulaire irréversible. Lorsque l'accumulation du dommage endothélial est suffisamment importante pour menacer les fonctions de base de l'endothélium, cet état est référé à titre de dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale est un marqueur corrélant avec le développement de la VG et de l'athérosclérose native.

Figure 10 : Schématisation de l'endothélium en réponse à différents stress. Se référer au texte pour la description de la figure. Générée par I.S.



Légende : L'endothélium dispose de plusieurs mécanismes afin de répondre aux tensions environnementales. Suivant un stress inflammatoire, l'activation endothéliale de type I et II permettent de recruter différentes populations cellulaires du système immunitaire. Les stress oxydatifs, ischemiques et hypoxiques contribuent à générer un stress du RE et une augmentation du calcium intracellulaire permettant d'activer des mécanismes cytoprotecteurs (flèches bleues) incluant le UPR (unfolding protein response) et l'autophagie. L'endothélium peut aussi transitoirement adopter des phénotypes de résistance à l'apoptose et d'accommodation. Lorsque les stress initiaux sont maintenus, les mécanismes de réponse aux stress déplacent l'équilibre vers l'activation des caspases et par conséquent l'apoptose endothéliale (flèches jaunes). De plus, une activation endothéliale

soutenue contribue à augmenter les niveaux calciques intracellulaires et surcharger le UPR et l'autophagie, favorisant aussi l'activation des caspases et l'apoptose endothéliale (flèches rouges). L'apoptose endothéliale modifie les fonctions de base de l'endothélium en des états pro coagulant et pro adhésif et génère une dénudation endothéliale consécutive à l'apoptose des CE. Ces changements ont pour effet de rendre l'endothélium dysfonctionnel par rapport à ses fonctions de base. Des boucles d'amplification (flèches noires) sont générées par la dysfonction endothéliale qui en retour favorise l'apoptose endothéliale et génère des stress cellulaires qui participent initialement à produire différentes réponses au stress.

Activation endothéliale

Suivant une infection, un trauma ou une chirurgie, les neutrophiles sont recrutés au site d'insulte et initient un processus d'inflammation. L'endothélium s'adapte à ce changement environnemental via un processus d'activation défini par l'acquisition de nouvelles fonctions permettant de bénéficier l'hôte (129). L'activation endothéliale peut être rapide et indépendante de l'expression de nouveaux gènes (activation de type I) ou plus lente et dépendante de l'expression de gènes (activation de type II). Dans les 2 cas, 3 éléments participent à générer les 4 points cardinaux associés à l'inflammation : 1) augmentation locale du débit sanguin donnant l'aspect 'rouge' et 'chaud'; 2) la fuite de protéines plasmatiques de la circulation sanguine vers les tissus associée à 'l'enflure'; 3) le recrutement et l'activation de leucocytes circulants au site d'insulte où ils sécrètent des médiateurs et transmigrent dans les tissus endommagés. La 'douleur' est générée par les médiateurs sécrétés par les leucocytes et sont perçus par les fibres nerveuses sensorielles de type C (129).

Durant l'activation de type I, des ligands formant un complexe avec les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) permettent de moduler la concentration calcique intracellulaire ainsi que l'activation de RHO (RAS homologue) en RHO-GTP catalysé par RHO-GEF. Ces 2 aspects caractérisent les actions générées par l'activation de type I (140). Brièvement, suite à l'activation des GPCR, l'augmentation du débit sanguin au site d'insulte est générée par une élévation intracellulaire calcique qui permet d'engendrer une série de réactions enzymatiques afin de générer le PGI_2 , un agent vasodilatateur impliqué dans la relaxation du tonus musculaire (141). L'oscillation des concentrations calciques intracellulaires ainsi que l'activation de RHO-GTP participent aussi à la fuite de protéines plasmatiques vers les tissus en générant une réorganisation du cytosquelette favorisant l'ouverture des jonctions gap entre les cellules adjacentes (142). De plus, l'augmentation de calcium intracellulaire favorise l'exocytose de la p-selectin confinée dans les

corps WPBs ainsi que la génération de PAF (platelet-activating factor) ayant un effet juxtacrine sur le tâtonnement des neutrophiles ainsi que leur extravasation à travers l'endothélium.

L'activation endothéliale de type II représente une réponse inflammatoire soutenue sur une longue période dont les médiateurs classiques sont le TNF- α et interleukine-1 (IL-1) sécrétés par les leucocytes (140). Suivant la liaison du TNF- α et de son récepteur (TNFR1), il y a génération d'un complexe protéique appelé signalosome (TNF/TNFR1/TRADD/RIP/TRAF2) initiant une cascade de signalisation menant à l'activation de facteurs de transcription dont NF- κ B. L'effet de IL-1 est similaire à celui du TNF- α sur la régulation de NF- κ B et implique la formation d'un complexe de signalisation formé de IL-1/IL-1R1/TIRAP/MYD88/IRAK1/IRAK4/TRAF6. NF- κ B migre vers le noyau où il active la transcription de molécules d'adhésion impliquées dans le recrutement des neutrophiles via l'expression de E-selectin, et le recrutement leucocytaire via l'expression de VCAM1 et ICAM1. Par conséquent, l'activation de type II est davantage efficace que le type I pour le recrutement des leucocytes.

Acquisition transitoire d'un phénotype de résistance

Parallèlement à l'activation endothéliale, l'endothélium est programmé pour réguler la transcription de gènes permettant de résister à l'insulte initiale. Par exemple, suivant une stimulation soutenue avec TNF- α , le signalosome (TNF/TNFR1/TRADD/RIP/TRAF2) active, via la voie NF- κ B, l'expression de gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, incluant Bcl-2 et Bcl-xL, ainsi que c-Flip, un inhibiteur de la pro-caspase 8 (62). Ces protéines régulent des étapes limitantes dans l'initiation de l'apoptose et sont très pertinentes dans la compréhension de la VG. Par exemple, dans un contexte où, malgré une évidence sérique d'anticorps spécifiques dirigés contre l'endothélium du greffon, celui-ci fonctionne sans démontrer d'évidence de rejet. La régulation de ces gènes cytoprotecteurs à titre de déterminants dans le phénotype de résistance endothéliale a été proposé afin d'expliquer cet état d'accommodation du greffon (143).

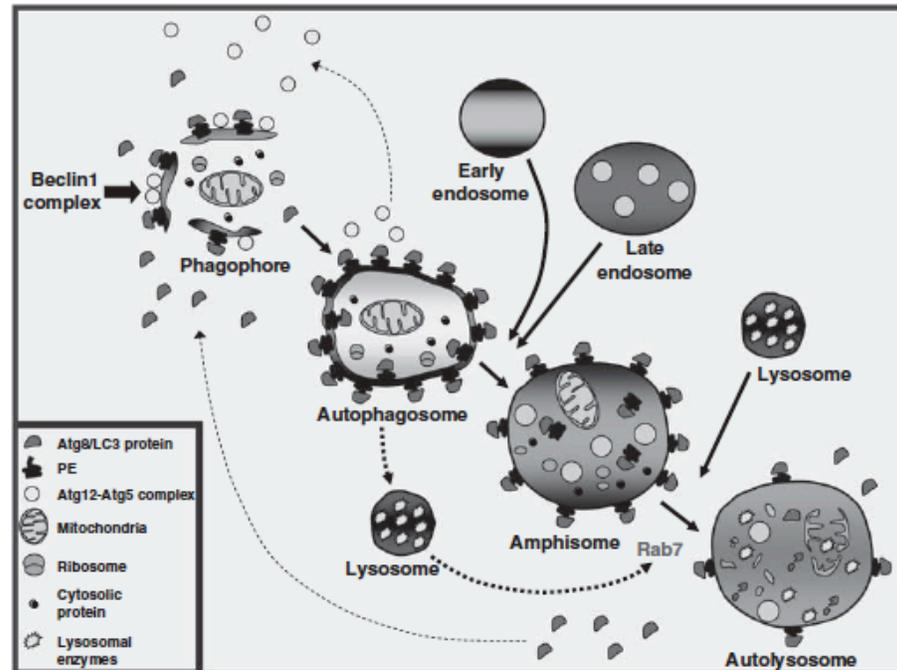
Autophagie

Par opposition à la voie de dégradation des protéines de 'courte vie' (short-lived) régulée par la voie du protéasome, l'autophagie fait référence à un mécanisme cellulaire favorisant la dégradation de matériel cytoplasmique incluant des organelles et des protéines de 'longue vie' (long-lived). Les 3 fonctions de l'autophagie connues à ce jour sont : 1) élimination des protéines et des organelles défectueuses; 2) prévention de l'accumulation d'agrégats protéiques; 3) élimination de pathogènes

intracellulaires et 4) et la présentation croisée (cross-presentation). L'autophagie a une activité basale permettant d'assurer le 'turnover' des protéines et des organelles. Ce bas niveau d'autophagie est maintenu par une kinase (mTOR : mammalian Target of Rapamycin) dont l'activité est inhibée en présence suffisante de facteurs de croissance et de nutriments cellulaires. Toutefois, l'activité autophagique est augmentée dans différents contextes afin d'assurer une demande énergétique soutenue ou afin d'éliminer des composants cytoplasmiques dommageables pour l'homéostasie cellulaire. À titre d'exemple, on dénote le jeûne et la déprivation de facteur de croissance, l'ischémie, le stress oxydatif, les infections et le stress du RE associé à l'accumulation d'agrégats protéiques (144-147).

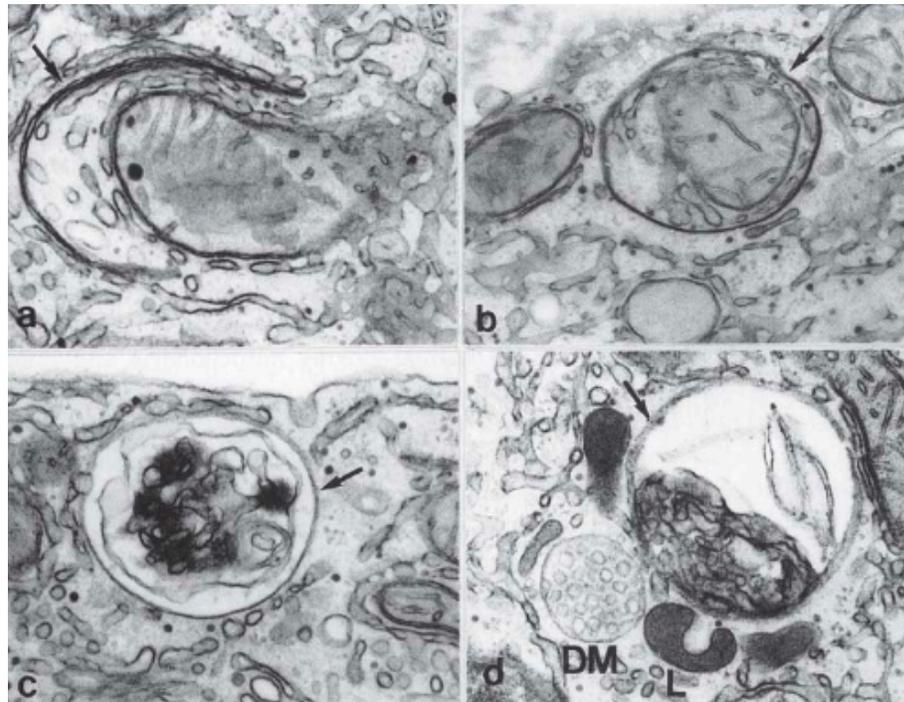
L'autophagie est initiée par la séquestration de cargo cytoplasmiques via la formation et l'expansion d'une vésicule en formation référée sous le nom de phagophore et régulée par la famille protéique *ATG* (Autophagy-related genes). Lorsque les 2 extrémités du phagophore fusionnent, cette vésicule est nommée autophagosome et est caractérisée par une double-membrane appréciable par microscopie électronique. Les autophagosomes peuvent fusionner avec différentes populations d'endosomes ainsi que les multivesicular bodies (MVB) (148). En fait, il semblerait que les autophagosomes fusionnent préférentiellement avec les MVB afin de former des amphisomes. Finalement, la dernière étape de l'autophagie implique la formation d'autolysosomes suivant la fusion des autophagosomes et des amphisomes avec les lysosomes au sein desquels le processus de dégradation se termine (Figures 11 et 12) (149).

Figure 11 : L'autophagie. Reproduit de (148) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Cell Death and Differentiation; copyright 2009.



Légende: La voie autophagique. La production de PI3K par le complexe Beclin 1 est un événement précoce dans la formation d'autophagosome qui est nécessaire pour le recrutement de certaines protéines ATG au phagophore ou pour l'isolation de matériel membranaire. Subséquemment, le recrutement séquentiel du complexe Atg-12-Atg-5 et de la protéine Atg8-LC3 au phagophore prend place. La forme cytosolique de LC3, LC3-I, est liée de manière covalente à la phosphatidyléthanolamine (PE), générant LC3-II, qui lie la membrane autophagosomale. Le phagophore, soit une structure en forme de 'cup-shape' encapsule des protéines cytosoliques et des organelles, formant une structure à double membrane nommée autophagosome. À ce point, la plupart des protéines Atg, excepté LC3-II, sont recyclées de la membrane autophagosomale au cytosol. Ensuite, les autophagosomes peuvent fusionner avec des compartiments endosomaux générant ainsi des amphisomes. Le matériel séquestré est finalement dégradé suivant la fusion de l'amphisome avec un compartiment lysosomal, formant ainsi un autolysosome. La fusion d'autophagosome et d'autolysosome avec le compartiment lysosomal est dépendante de la protéine Rab7 activée.

Figure 12 : La voie autophagique visible par microscopie électronique. Reproduit de (150) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Cell Research; copyright 1999.

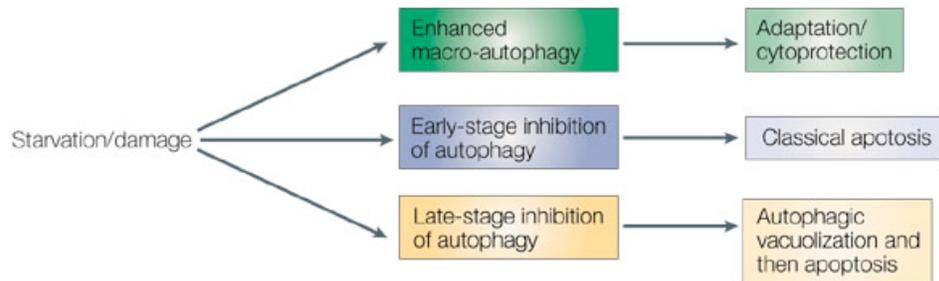


Légende: Photographies illustrant des images des différents stages de l'autophagie (A) pré-autophagosome, 5000 x; (b) autophagosome précoce, 40000x; et (c) autophagosome tardif, 40000x; (d), un autophagosome tardif (flèche) à proximité d'un MVB dense (DM) et d'un lysosome (L), 40000x.

Les acides aminés générés durant l'autophagie servent simultanément de substrats nécessaires à la synthèse protéique afin d'assurer la traduction de protéines impliquées dans la survie cellulaire ainsi qu'à alimenter le cycle tricarboxylique permettant de générer de l'ATP (151, 152). Un exemple concret permettant d'attribuer à l'autophagie un rôle protecteur en réponse au stress est illustré dans les modèles de souris où les souriceaux nouveau-nés expriment de hauts niveaux d'autophagie dans le foie, le cœur, les poumons, le pancréas et les muscles afin de générer des substrats oxydables suivant l'interruption rapide de l'apport nutritionnel placentaire de la mère suivant la naissance (153). Finalement, l'autophagie représenterait un mécanisme d'adaptation suivant un stress du RE qui est particulièrement pertinent dans le contexte de la pathophysiologie rénale. Le stress du RE est conséquent, entre autre, à des épisodes d'ischémie reperfusion, soit un facteur clé impliqué dans la pathophysiologie de la VG. L'autophagie en réponse à ce stress

représenterait un phénomène d'adaptation permettant d'assurer une homéostasie cellulaire transitoire des cellules rénales et vasculaires (154-156, 157; Pallet, 2009 #1380, 158).

Figure 13 : L'autophagie à titre de mécanisme cytoprotecteur. Reproduit de (159) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer, copyright 2005.

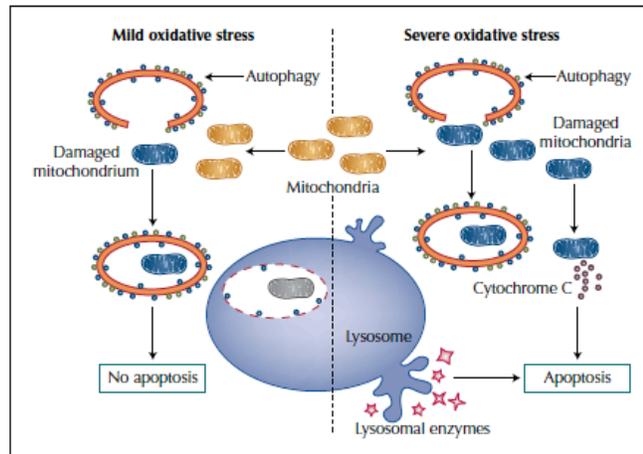


Légende : Sous des conditions d'inanition ou de dommage sub-létal associés aux organelles cytoplasmiques, une augmentation de l'autophagie pourrait constituer un mécanisme pour cataboliser le réservoir énergétique cellulaire et/ou éliminer des organelles défectueuses. Lorsque l'autophagie est bloquée au niveau de la formation des autophagosomes, l'apoptose classique est induite. Par contre, lorsque l'autophagie est bloquée à des stades tardifs – par exemple, au niveau de la fusion autophagosome-lysosome – les cellules accumulent d'abord des vacuoles autophagiques et ensuite meurent via des caractéristiques classiques d'apoptose, tel que la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et l'activation des caspases.

Dans ce même ordre d'idée, plusieurs auteurs suggèrent que dans différents contextes de stress cellulaires, l'autophagie est un mécanisme d'adaptation permettant initialement de protéger la cellule mais qu'à un certain point, dépendamment de la nature et de l'intensité du stress initial, elle favorise l'induction de la mort cellulaire apoptotique (149, 159, 160) (Figure 13). Cette hypothèse a été proposée dans des modèles d'athérosclérose et d'ischémie chronique du myocarde. Le stress oxydatif associé à ces conditions peut être transitoirement tamponné par des processus autophagiques (via la dégradation de mitochondries endommagées). Toutefois, lorsque la cellule ne peut plus assumer son rôle antioxydant, l'autophagie ne suffit plus laissant libre cours aux mitochondries endommagées de libérer des facteurs pro-apoptotiques dont le cytochrome C permettant d'activer la mort cellulaire apoptotique (161, 162) (Figure 14).

Figure 14: Stress oxydatif, autophagie et apoptose.

Reproduit de (162) avec la permission de Springer Science+Business Media ; copyright 2008.



Légende: Modèle pour les effets anti-apoptotiques de l'autophagie durant le stress oxydatif associé à l'athérosclérose. Le stress oxydatif initié par la production d'espèces oxygénées réactives ou par la formation de lipides oxydés (i.e. 7-ketocholestérol) est une caractéristique clé des plaques d'athérosclérose avancées. Un stress oxydatif léger active l'autophagie afin de faciliter l'élimination d'organelles (i.e. des mitochondries dépolarisées). La dégradation autophagique efficace des composants endommagés contribue au recouvrement cellulaire. Si l'autophagie n'est pas assez efficace pour éliminer le dommage cellulaire, une fuite de composants intra mitochondriaux tel que le cytochrome C peut induire l'apoptose via l'activation des caspases. De plus, le dommage oxydatif de la membrane lysosomiale résulte souvent en une fuite cytosolique d'hydrolases puissantes qui pourraient causer des dommages cytosoliques substantiels, même à un pH cytosolique neutre, suivi d'apoptose.

Apoptose endothéliale

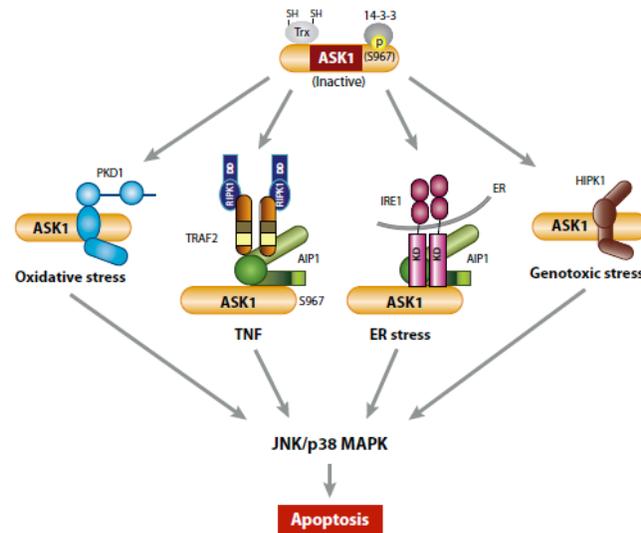
En réponse aux changements environnementaux, des mécanismes permettent de réduire le stress oxydatif résultant d'épisodes ischémiques en favorisant l'équilibre vers l'expression de molécules antioxydantes. Il peut aussi instaurer transitoirement une halte à la synthèse protéique afin d'empêcher l'accumulation de protéines n'ayant pas terminé leur maturation tertiaire et quaternaire (unfolding protein response, UPR). La cellule peut aussi instaurer une pause dans la réplication de l'ADN et induire des processus de réparation générés d'un stress génotoxique (163, 164). Toutefois, dépendamment de la source de stress et de son intensité, la cellule possède des programmes génétiquement régulés lui permettant de survivre ou de mourir, via un processus décisionnel encore non résolu, et de favoriser l'équilibre littéralement vers un suicide cellulaire. Dans un contexte

relatif à la transplantation, l'endothélium expérimente des épisodes de stress oxydatif et d'ischémie reperfusion et des perturbations métaboliques mettant au défi les mécanismes de compensation cellulaire.

Au niveau de l'endothélium, la kinase ASK1 (Apoptosis-signaling kinase 1) joue un rôle central dans l'activation intrinsèque de l'apoptose en réponse excessive au stress oxydatif, au stress associé au réticulum endoplasmique, au stress génotoxique et à une activation endothéliale soutenue (Figure 15). La participation quaternaire de ASK1 dans la signalisation initiale de l'induction de l'apoptose endothéliale offre un bel exemple où les voies d'activation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose sont sollicitées dans un contexte de réponse au stress.

À l'état basal, ASK1 est inactif et demeure complexé avec une protéine (14-3-3) se liant à ses sites sérines phosphorylés. Les signaux de stress induisent une dissociation entre ASK1 et ses inhibiteurs, lui permettant ainsi de former 4 complexes de manière stress-spécifique : 1) Durant l'ischémie, le stress oxydatif induit le complexe PKD1-ASK1; 2) durant une stimulation soutenue de TNF, formation du complexe TRAF2-AIP1-ASK1, 3) durant le stress du réticulum endoplasmique induit par la cytotoxicité associée à des immunosuppresseurs, le complexe IRE1-AIP1-ASK1 au niveau du RE et 4) durant un stress génotoxique, HIPK1-ASK1. Tous ces complexes convergent vers l'activation de la voie JNK-p38MAPK. Via un mécanisme et une protéase non décrits, JNK initie le clivage de Bid, une protéine clé dans la perte d'intégrité mitochondriale membranaire durant l'apoptose. Cette dernière étape de signalisation est limitante dans l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose (135).

Figure 15 : ASK1 et l'apoptose endothéliale initiée par différents stress cellulaires. Reproduit de (135) avec la permission de Annual Reviews, Copyright 2009.



Légende: ASK1 joue un rôle central dans l'apoptose induite par un stress dans les CE. Dans les CE au repos, la protéine intracellulaire thiorédoxine (Trx) dans sa forme réduite ainsi que la protéine liante phosphosérine 14-3-3, s'associe avec ASK1, permettant de maintenir ASK1 dans un état inactif. Les signaux de stress induisent l'activation de ASK1 via la dissociation de ASK1 de ses inhibiteurs, i.e. Trx et 14-3-3. Plusieurs protéines sont impliquées dans la dissociation des complexes ASK1 Trx/14-3-3 de manière stress spécifique. PKD1, TRAF2-RIPK1-AIP1, IRE1-AIP1 et HIPK1 forment un complexe avec ASK1 en réponse au stress oxydatif, au TNF, au stress du réticulum endoplasmique et au stress génotoxique, respectivement, afin de dissocier Trx et 14-3-3 de ASK1, menant à l'activation de la signalisation ASK1-JNK. Cette voie peut aussi activer p38 MAPK.

En plus des mécanismes internes de la cellule permettant de favoriser une réponse apoptotique, les récepteurs membranaires peuvent aussi converger des signaux de stress extracellulaire vers l'activation de l'apoptose via la voie extrinsèque. Par exemple, les cellules endothéliales expriment des récepteurs de mort (Death receptors, DRs) appartenant à une sous-famille des récepteurs du TNF- α . 3 types de complexes initiés par la ligation du TNF- α et du TNFR1 prennent place dans le cytoplasme et la balance de la formation de ces complexes permet de favoriser les mécanismes de survie ou d'apoptose. En plus des différents stress mentionnés ci-haut, lorsque l'activation endothéliale de type II est soutenue, la production de TNF- α ainsi que de IFN-gamma coopèrent afin d'induire l'apoptose des CE. En présence du TNF, le signalosome (TNF/TNFR1/TRADD/RIP/TRAF2) peut recruter la protéine d'échafaudage FADD contenant des

domaines DED (Dead effector domain) favorisant le recrutement des pro-caspases initiateuses 8 et 10 transformant ainsi ce signalosome en complexe d'induction de mort (DISC, Death-inducing signaling complex) (165, 166). L'effet synergique pro-apoptotique de IFN-gamma repose sur sa capacité d'augmenter le niveau d'expression de la pro-caspase-8 dans les CE (167).

En résumé, l'endothélium est programmé afin de répondre au stress et influence le destin cellulaire via l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.

Domage tissulaire et dysfonction endothéliale

La mort cellulaire endothéliale en réponse au stress crée un dommage cellulaire qui, à un certain point, interfère avec les fonctions de base de l'endothélium. Ce phénomène référé sous le nom de dysfonction endothéliale est associé à une diminution de la production de NO par l'endothélium artériel. Compte tenu que NO est un médiateur important contribuant à la vasodilatation ainsi qu'à maintenir un état anticoagulant, la diminution de sa production a un effet très néfaste sur la santé endothéliale (168). Par exemple, l'apoptose endothéliale et le dommage cellulaire favorisent l'endothélium vers un état pro-coagulant. Les CE apoptotiques perdent leur fonction anticoagulante via le 'dépouillement' à la surface membranaire de HS et en exposant à leur surface la PS ainsi que sur les microparticules issus de ces cellules, favorisant ainsi un lit favorable pour le recrutement des facteurs de coagulation. Finalement, les CE apoptotiques permettraient de décrypter le TF normalement séquestrés dans les CE. Durant l'apoptose, les microparticules dépouillées de la membrane plasmique permettraient d'exposer le tissu factor (TF) à la circulation sanguine catalysant ainsi l'activation de la cascade de coagulation (169). Somme toute, la coopération de tous ces facteurs générés durant l'apoptose endothéliale favorise la formation de thrombi ayant le potentiel d'obstruer davantage les vaisseaux et favoriser l'incidence d'ischémie, formant ainsi une réparation chronique en réponse à l'insulte initiale.

Tel que discuté au long de cet ouvrage, l'apoptose endothéliale est un facteur clé impliqué dans le développement de la VG. Par conséquent, compte tenu que l'apoptose endothéliale et la dysfonction endothéliale sont intimement reliées et favorisent un état chronique d'insulte et de réparation vasculaire, il n'est donc pas surprenant que la dysfonction endothéliale soit un facteur de prédiction des maladies athérosclérotiques et de la VG (170, 171).

Entre la vie et la mort, il y a le développement

Historique associé au concept de la mort cellulaire

La contribution des embryologistes entourant la découverte des phénomènes associés à la mort cellulaire est significative. La mort cellulaire dite physiologique a été reconnue initialement par C. Vogt en 1842. Celui-ci observa des cellules mortes dans le système neuronal d'embryon de crapaud. Par la suite, A. Glücksmann en 1951 publia un premier article dans lequel il exposa que la mort cellulaire représentait un processus normal impliqué dans le développement (172). De là, différents noms ont été prêtés à la mort cellulaire physiologique basé sur le rôle et la localisation des lysosomes (173). En fait, tous les termes associés à ces différents types de mort cellulaire sont regroupés dans un terme global nommé 'mort cellulaire programmée' (174) originalement décrit en une série d'évènements génétiquement programmés menant à la mort cellulaire. Kerr, Wyllie et Currie ont décrété le mot 'apoptose' lorsqu'ils observèrent par microscopie électronique que les hépatocytes issus d'un dommage ischémique apparaissaient différents des cellules exposées à des toxines qui généraient plutôt une mort cellulaire nécrotique (175, 176).

La première description des gènes et des mécanismes impliqués dans la mort cellulaire physiologique en 1982 fût conduite par Horvitz à l'aide d'un modèle simple, le nématode *C. elegans*, un type de ver rond. Dans ce modèle, il observa que 131 cellules (sur un total de 1090, précisément) meurent par apoptose à un point spécifique du développement du nématode en processus de devenir adulte, démontrant que ce processus est finement et génétiquement régulé (177). Depuis, différents types de mort cellulaire programmée ou non, physiologiques ou pathologiques ont été décrits.

Le foisonnement de l'apoptose dans les processus physiologiques et pathologiques est éloquent : l'apoptose gouverne autant le développement embryonnaire incluant le façonnement des doigts et des orteils, la sélection des lymphocytes dans le thymus, le cancer jusqu'aux répercussions paracrines de l'apoptose sur la réparation vasculaire chronique (71).

Exemples de la mort cellulaire physiologique apoptotique

- Homéostasie et développement

Physiologiquement, l'apoptose contribue à l'homéostasie en permettant de maintenir un décompte cellulaire viable via l'élimination des cellules en excès ou potentiellement dangereuses. Dans ce contexte, on parle de suicide cellulaire car la cellule s'affaire elle-même à activer les mécanismes impliqués dans la cascade de signalisation menant à l'apoptose. Un autre exemple de suicide cellulaire physiologique fait référence aux différentes étapes du développement embryonnaire pendant lesquelles l'apoptose permet de façonner structurellement et cellulièrement l'organisme multicellulaire en devenir. L'apoptose est essentielle à la digitalisation des doigts et des orteils, à la formation des tubes, dans le remodelage des os et dans l'involution des glandes mammaires (178, 179).

- Protection contre l'envahissement viral

Les virus ont obligatoirement besoin d'infecter une cellule vivante afin de se répliquer et survivre. Par conséquent, la mort cellulaire permet à la cellule infectée de rapidement se 'suicider' afin de limiter la propagation virale. De façon intéressante, les organismes multicellulaires ont acquis et perfectionné leurs mécanismes de mort cellulaire afin de résister à l'envahissement viral, contrairement aux virus qui ont nettement amélioré leurs stratégies de survie (176). Par exemple, les virus ont acquis l'expression d'inhibiteurs effectifs à plusieurs étapes reliées à l'induction de l'apoptose incluant des homologues à la famille protéique Bcl-2, des inhibiteurs directs des caspases activées ou des molécules qui préviennent l'activation des caspases et finalement des inhibiteurs de p53.

L'intérêt pour l'étude des différents types de mort cellulaire durant le développement a perdu un peu d'élan au profit de son implication dans différents contextes pathologiques. Toutefois, plusieurs études apparentées au développement ont récemment démontré que des cellules peuvent afficher des différences morphologiques extrêmes durant la mort cellulaire mais qu'à la fin, elles utilisent des mécanismes communs de destruction incluant l'autophagie et l'apoptose. Par conséquent, la régulation de la mort cellulaire pathologique à l'aide d'agents thérapeutiques pourrait interférer avec le processus physiologique de la mort cellulaire 'naturelle' et nous devons absolument continuer à comprendre ses implications dans un contexte physiologique afin de ne pas générer des effets secondaires indésirables.

Schéma référentiel de la mort cellulaire

Durant les dernières 60 années, l'étude de la mort cellulaire fût un sujet très ardent qui a permis de générer une quantité mirobolante de données expérimentales. Toutefois, différentes manifestations morphologiques et biochimiques apparentées à différents types de mort cellulaire peuvent brouiller notre interprétation dans un contexte donné. Afin de mettre de l'ordre dans toutes ces observations scientifiques, un groupe de chercheurs pionniers rayonnant dans l'étude de la caractérisation des différents types de mort cellulaire ont adopté une nomenclature référentielle: *Classification of cell death : recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 (NCCD)* (180). Suite à cette nomenclature (Annexe 2), il n'est plus permis d'utiliser l'expression '% of apoptosis' afin de référer l'apoptose. Nous devons plutôt spécifier le paramètre observé et discuter par la suite de l'incidence de l'apoptose en fonction de plusieurs critères spécifiques présents au sein de la cellule.

Selon ce schéma, une cellule peut être considérée 'morte' lorsque l'un des critères suivants est rempli: 1) perte d'intégrité membranaire, tel que visible par coloration au propidium iodide *in vitro*; 2) fragmentation de la cellule en noyaux discrets, référés sous le nom de corps apoptotiques; 3) phagocytose du cadavre cellulaire résiduel (ou des fragments) par des cellules adjacentes *in vivo*. Parallèlement, certaines caractéristiques biochimiques pourraient représenter un état où la cellule n'est pas encore morte mais a toutefois atteint un point de non retour irréversible. Par exemple, cet état concorderait avec une activation massive des caspases, la perméabilisation des membranes mitochondriales et l'exposition de la PS à la surface de la cellule. Ces caractéristiques ne représentent pas nécessairement la mort directement car plusieurs exemples font mention de ces événements dans des contextes non-létal et de différenciation (181-184). Par conséquent, ces critères permettent de distinguer entre une authentique cellule morte et une cellule 'en train' de mourir qui n'a pas terminé son suicide cellulaire.

En lien avec cette nomenclature et selon différentes caractéristiques morphologiques et biochimiques, 2 types de mort cellulaire sont bien définis : l'apoptose ainsi que la nécrose. La mort cellulaire autophagique a été proposée dans des cas très spécifiques mais ne figure plus à titre de mort cellulaire classique. De plus, la nomenclature concernant d'autres types de mort cellulaires est plutôt spéculative. Compte tenu que le présent travail repose pratiquement exclusivement sur les répercussions de l'apoptose, ce type de mort cellulaire sera largement détaillé dans le prochain chapitre tandis qu'un bref aperçu des autres types de mort cellulaire sera abordé.

Aperçu général de la mort cellulaire

1) L'apoptose

Selon la NCCD, le terme apoptose devrait être exclusivement utilisé dans un contexte où les différents aspects morphologiques suivants sont présents : un arrondissement de la cellule, une rétraction des pseudopodes, une réduction du volume cellulaire, la condensation de la chromatine (pyknosis), la fragmentation nucléaire (karyorrhexis), le bourgeonnement de la membrane plasmique (blebbing) et l'engouffrement par les phagocytes résidents *in vivo*. Ces changements morphologiques peuvent être détectés par microscopie (à fluorescence ou électronique) à l'aide de colorants vitaux incluant l'iodure de propidium, (PI) et le Hoescht (HO)). Une augmentation de l'intensité de la coloration au HO (bleu foncé et brillant) en combinaison avec la morphologie fragmentée du noyau est indicatif de l'apoptose. La coloration avec le propidium iodide (PI) permet d'évaluer la perte d'intégrité de la membrane cytoplasmique, traduite par une coloration rouge de la cellule. Par conséquent, les cellules apoptotiques auront une coloration intense au HO et une coloration négative du PI (Figure 16). Les cellules ayant perdu leur intégrité membranaire auront une coloration positive pour le PI (185). La microscopie électronique, quant à elle, est l'outil étalon permettant de visualiser directement les modifications structurales de la cellule.

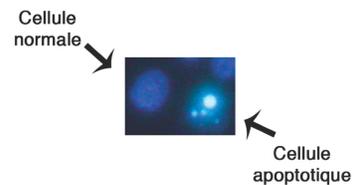


Figure 16: Microscopie à fluorescence et coloration HOPI de cellules endothéliales (HUVEC). Images générées par I. Sirois dans le laboratoire du Dre Marie-Josée Hébert, 2007.

Conjointement, il est possible d'effectuer des analyses plutôt biochimiques afin d'investiguer différentes manifestations sous-jacentes à l'apoptose. Par exemple, on peut évaluer l'activation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, l'activation des caspases, la perte d'intégrité membranaire mitochondriale, la fragmentation de l'ADN en oligonucleosomes d'environ 200 pb, le clivage de substrats spécifiques des caspases effectrices (PARP) et l'exposition extracellulaire de la phosphatidylserine (PS). Toutefois, l'utilisation unique de l'une de ces caractéristiques n'indique pas par défaut que nous observons un phénomène apoptotique; toutefois, ces analyses permettent de mieux définir les événements associés aux changements morphologiques réservés à l'apoptose (180, 186-188).

2) La nécrose

Morphologiquement, la nécrose est caractérisée par un gain du volume cellulaire (oncosis), un gonflement des organelles, la rupture de la membrane plasmique et la décharge de matériel intracellulaire dans son environnement immédiat. Cette décharge de matériel intracellulaire peut être accidentelle suite à des traumatismes ou le résultat d'une infection microbienne et permet par la suite d'initier une réponse inflammatoire. De façon analogue à la classification de l'apoptose, certains marqueurs biochimiques peuvent appuyer les changements morphologiques observés dans un contexte nécrotique. Par exemple, la perte d'intégrité de la membrane cytoplasmique est évaluée à l'aide de la coloration au PI couplée à la microscopie à fluorescence (Mettre photo figure 17) Afin d'estimer le déversement extracellulaire de protéines cytoplasmiques, on peut mesurer l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant des cellules en culture par essai enzymatique et colorimétrique à l'aide de substrats de la LDH (180).

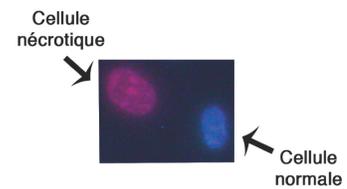


Figure 17 : Microscopie à fluorescence et coloration HOPI de cellules endothéliales (HUVEC). Images générées par I. Sirois dans le laboratoire du Dre Marie-Josée Hébert, 2007.

Malgré le fait que la nécrose fût longtemps appréciée à titre de mort accidentelle et non régulée, des évidences récentes suggèrent une certaine forme de signalisation via les récepteurs de mort (TNFR1, Fas et TRAIL-R), les Toll-like récepteurs (TLR3 et TLR4) et la kinase RIP1 en présence d'inhibiteurs de caspases (189, 190). Ce type de nécrose fût dénommée 'necroptose' afin d'indiquer un type de nécrose régulé. Ajoutons aussi que plusieurs études rapportent différents changements aux niveaux des organelles qui peuvent être aussi observés dans d'autres types de mort cellulaire. Faute d'un consensus sur l'utilisation d'un marqueur biochimique strictement réservé à la nécrose, ce type de mort cellulaire est défini par un processus d'exclusion, i.e. par l'absence de marqueurs apoptotique ou autophagique (180).

3) Mort cellulaire autophagique

L'autophagie, telle qu'introduit à la page 48, se distingue morphologiquement par une absence de condensation de la chromatine, une conservation de la perméabilité de la membrane cellulaire et une vacuolisation massive du cytoplasme consécutive à l'augmentation de la formation d'autophagosomes. Un guide d'utilisation a été généré en 2008 et sert maintenant de repère pour l'interprétation de l'autophagie dans les cellules eucaryotes (191). D'après ce consensus, il est

possible d'évaluer l'induction ou l'inhibition de la formation d'autophagosomes à un temps donné et fixe ('steady state methods') ou le flux autophagique qui reflète le processus complet d'autophagie incluant la dégradation lysosomiale et le recyclage des composants dégradés. Afin d'évaluer l'autophagie à un temps donné, la microscopie électronique et la quantification morphométrique des vacuoles autophagiques s'avèrent les plus pertinentes. La localisation de la forme lipidée de ATG8/LC3 (LC3II) dans les autophagosomes peut être évaluée par microscopie à fluorescence mais cette approche demeure moins précise pour la quantification. En ce qui a trait à la mesure du flux autophagique, la procédure générale implique l'utilisation d'acide aminé radioactif (par exemple, ^{14}C -leucine ou ^{14}C -valine) afin de marquer les protéines de longue vie et de quantifier les formes radioactives solubles générées. Cette approche couplée à l'évaluation du ratio d'abondance du LC3-II/LC3-I quantifiable par immunobuvardage et par des analyses de densitométrie s'avèrent plus précises que la quantité totale de LC3-II présente dans un extrait donné. Somme toute, il demeure important d'utiliser plusieurs approches expérimentales afin de bien évaluer l'autophagie dans un système (191).

La mort cellulaire autophagique serait en fait une faute langagière invitant à croire que la cellule peut mourir strictement par un processus autophagique (144, 146, 149, 160, 180, 192). En fait, il est maintenant reconnu que plusieurs caractéristiques autophagiques puissent accompagner d'autres types de mort cellulaire suggérant ainsi que l'autophagie ne représente pas *de facto* un type de mort cellulaire. À ce jour, l'involution des glandes salivaires chez la *Drosophila Melanogaster* semble être le seul exemple *in vivo* où la cellule meurt vraiment par autophagie conséquemment à une digestion massive du contenu cytoplasmique menant ainsi à l'atrophie cellulaire (193). De plus, plusieurs évidences suggèrent que l'autophagie précède l'induction de l'apoptose ou la nécrose et servirait à titre de complice plutôt que d'auteur dans l'induction de la mort cellulaire (144, 146, 149, 160, 192, 194). Par conséquent, faute de consensus sur la mort cellulaire autophagique, l'utilisation de ce terme doit être solidement démontré en absence de la machinerie apoptotique afin d'être utilisé à titre mort cellulaire distincte.

Chapitre 5 - L'apoptose endothéliale: la mort cellulaire programmée au cœur de la vasculopathie du greffon

"Death is not the greatest of evils : it is worse to want to die, and not be able to"

- Sophocle

Ce chapitre traite de la mort cellulaire programmée apoptotique et dépendante de l'activation de protéases, i.e. les caspases, orchestrant magistralement le démantèlement cellulaire. Afin de faciliter l'intégration des concepts entourant l'apoptose endothéliale et le développement de la VG, des exemples pertinents au sujet sont décrits tout au long de la description des mécanismes régulant l'apoptose.

Sommairement, l'apoptose est initiée par des changements environnants à la cellule dont leurs effets sont traduits intracellulairement suivant 3 phases distinctes (195):

- 1) **la phase d'initiation** qui peut être hétérogène et dépendante de la nature des stimuli mortels (i.e. intrinsèque, extrinsèque ou le système perforine-granzyme);
- 2) **la phase d'intégration-décision** durant laquelle une activation pratiquement simultanée des caspases-8-9-10 initiatrices et d'effecteurs mitochondriaux pro-apoptotiques dont la résultante de leurs actions mutuelles permettent à la cellule de prendre la décision de 'mourir' et d'enfreindre 'un point de non retour';
- 3) **la phase effectrice** emprunte une voie commune de destruction via les caspases 3-6-7 effectrices qui s'affairent à coordonner une démolition cellulaire organisée. Cette phase effectrice est activée indépendamment du type d'insulte initiale et du type d'initiation apoptotique.

Les différentes voies d'initiation de l'apoptose

1) La voie intrinsèque et les mitochondries

La voie intrinsèque fait appel à la participation des mitochondries, à la famille de protéines Bcl-2 et à des facteurs issus de l'espace intermembranaire des mitochondries (protéines IMS). Ces protéines IMS sont relocalisées dans le cytoplasme suivant la phase initiatrice de l'apoptose où elles adoptent des fonctions apoptotiques permettant d'activer la famille responsable du démantèlement cellulaire, les caspases.

Cette voie d'activation peut être initiée par un signal négatif ou positif reflétant un changement du milieu environnant de la cellule. Par exemple, l'absence (signal négatif) de facteur de croissance, d'hormone et de cytokine initie l'activation de l'apoptose en défavorisant ses mécanismes d'inhibition. Par contre, des signaux dits positifs incluant les radicaux libres, la radiation, les toxines, l'hypoxie et les infections virales, activent directement les étapes menant à la perte d'intégrité membranaire mitochondriale. Le fait que des cellules énucléées soient capables d'apoptose suggère que la régulation de l'apoptose soit spatialement contrôlée dans le cytoplasme (196). Chez les mammifères, la mitochondrie joue un rôle crucial dans l'initiation de l'apoptose. Lorsque son intégrité membranaire est compromise suite à différentes interactions protéiques de la famille Bcl-2 (B cell lymphoma 2), des protéines mitochondriales sont libérées dans le cytoplasme et acquièrent de nouvelles fonctions pro-apoptotiques. Par conséquent, la voie d'induction mitochondriale régule la ségrégation et la proximité de protéines clés impliquées dans l'activation des caspases (Figure 18) (197).

La famille Bcl-2 : Gardienne de l'intégrité membranaire mitochondriale

Une famille importante de protéines assure la garde du contenu signalétique spatialement mortel que la mitochondrie peut déverser dans le cytoplasme. La famille Bcl-2 représente 25 gènes dont certains sont pro-apoptotiques (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bik, Blk, puma, Noxa) d'autres anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, Mcl-1, Bag) dépendant de leur effet sur la perte d'intégrité mitochondriale et le relargage du cytochrome c (198). Ces protéines peuvent contenir jusqu'à 4 régions conservées nommées BH (Bcl-2 homology domains). Bcl-2 et Bcl-XL contiennent ces 4 régions BH et protègent l'intégrité mitochondriale en interagissant directement avec les protéines Bcl-2 pro-apoptotiques. Les membres pro-apoptotiques de cette famille, incluant Bax et

Bak, peuvent contenir plusieurs régions BH impliquées dans l'hétérodimérisation tandis que d'autres contiennent seulement la région BH3 (Bnip3, Bim, Bik, Bid, Bad, Puma, Noxa). Ce dernier groupe agit à titre de protéines sentinelles de la mort et joue un rôle important dans la signalisation issue de la membrane jusqu'à la mitochondrie. En fait, les protéines BH3-only sont régulées transcriptionnellement et post-traductionnellement et s'activent de manière stress-spécifique. (199). Par exemple, Noxa et Puma sont sous le contrôle transcriptionnel de p53 et leur transcription est augmentée en réponse au dommage à l'ADN. En présence de facteurs de croissance, les récepteurs tyrosine kinase favorisent un état phosphorylé de Bad via la voie PI3K-AKT. Cette phosphorylation séquestre Bad dans un complexe assuré par la protéine 14-3-3. Par contre, durant la déprivation de facteur de croissance, Bad est déphosphorylé et devient disponible pour interagir directement avec le complexe Bak-Bad pro-apoptotique à la membrane mitochondriale (200).

Tel que démontré à l'aide de souris transgénique, l'activation de Bax et Bak est essentielle à l'apoptose induite par la voie intrinsèque et leur participation est fonctionnellement redondante (201). Suivant un stress apoptotique, Bax subit un changement conformationnel lui permettant de migrer du cytoplasme à la mitochondrie. Bak quant à lui est un résident permanent de la mitochondrie où sa conformation demeure inactive dû à une séquestration par Bcl-xL et Mcl-1, 2 protéines Bcl-2 anti-apoptotiques. (202). Au niveau de la membrane mitochondriale, Bax et Bak forment des complexes d'oligomères permettant le relargage de protéines IMS.

Le recrutement des protéines de la famille Bcl-2 au niveau de la membrane mitochondriale permet de créer un terrain décisionnel fondé sur la présence de signaux pro-mort et pro-survie. Lorsque la balance favorise la présence de protéines Bcl-2 pro-apoptotiques (pro-mort) au niveau des membranes mitochondriales, on observe un phénomène de perméabilisation des membranes interne et externe référencé sous le nom de "Mitochondrial Membrane Permeabilization (MMP)" (195).

Malgré que le mécanisme exact impliqué dans la perméabilisation de la membrane mitochondriale demeure encore un mystère, différents modèles ont été proposés. Parmi ces modèles, on dénote la formation de pores multiprotéiques (PTP) aux sites de contact entre la membrane externe et interne de la mitochondrie dont l'ouverture permettrait la relâche non sélective des protéines. Par contre, ce modèle semble plutôt être une résultante de l'apoptose plutôt qu'un événement initial compte tenu que différentes études génétiques ont démontré que la suppression des différentes protéines impliquées dans la formation des PTP ne sont pas essentielles à la relâche des protéines mitochondriales (197). En retour, la structure tridimensionnelle de la famille Bcl-2 s'apparente à

une toxine bactérienne dont les protéines peuvent former des trous membranaires afin de tuer les cellules cibles. Similairement, Bax, Bid et certains lipides coopèrent afin de former de larges ouvertures pouvant être inhibées par Bcl-xL (203). Finalement, un 3^{ème} modèle a été proposé et suggère la formation de canaux mitochondriaux (Mitochondrial Apoptosis-Induced Channel, MAC) contenant Bax et Bak permettant le relargage de protéines (204). Nonobstant notre pauvre compréhension des mécanismes permettant la ségrégation des protéines mitochondriales IMS dans le cytoplasme, il demeure indéniable que ces protéines sont spatialement, temporellement et mécaniquement impliquées dans l'activation de l'apoptose.

Les médiateurs pro-apoptotiques séquestrés dans la mitochondrie

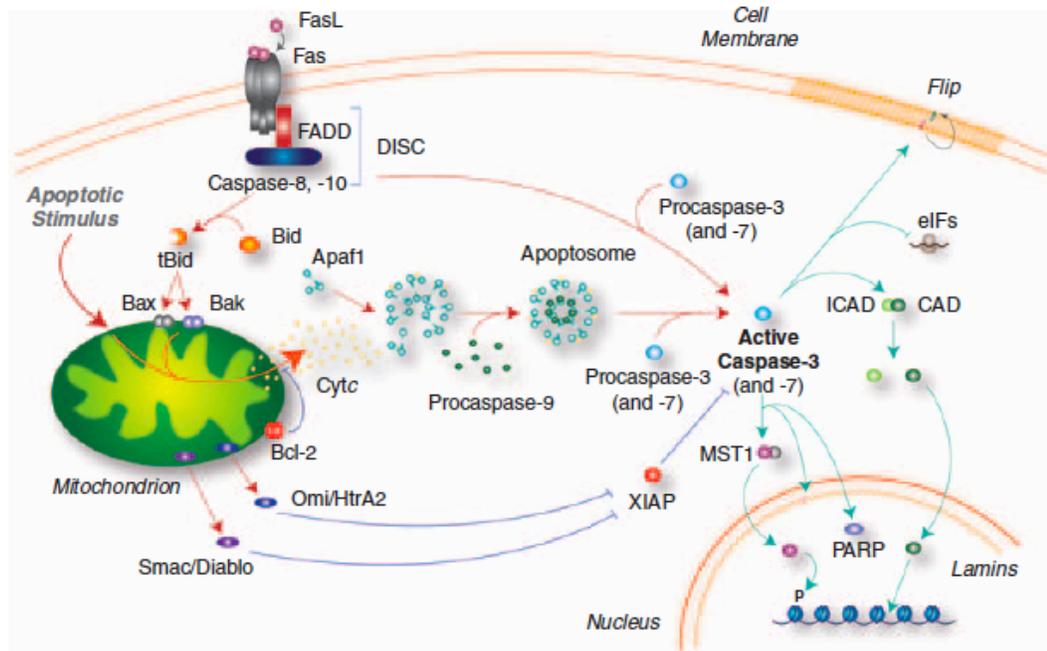
Mis à part son rôle crucial dans la production d'énergie, la mitochondrie fait office d'organelle de confinement où elle séquestre 2 types de médiateurs impliqués initialement et tardivement durant l'exécution de l'apoptose.

Le 1^{er} groupe comprend 1) le cytochrome c, impliqué dans l'activation de la caspase-9 initiatrice via la formation de l'apoptosome, 2) SMAC-Diablo (Second messenger of apoptotic cell death) et 3) HtrA2-Omi qui inhibent des inhibiteurs de l'apoptose (IAP, inhibitor of apoptosis protein) favorisant l'équilibre vers l'activation massive de la caspase 3 effectrice (197). Le 2^{ème} groupe de médiateurs séquestrés dans les mitochondries a pour but de participer à la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, une caractéristique associée aux événements tardifs de l'apoptose caspase-dépendante et indépendante. Il comprend 1) AIF (Apoptosis Inducing Factor) impliqué dans l'apoptose induite par la cathepsin B et indépendante de l'activation des caspases; et 2) l'endonucléase G, elle aussi activée indépendamment de l'activation des caspases (205).

Conséquences de la perte d'intégrité mitochondriale : l'activation des caspases

Les fameuses caspases auxquelles le présent ouvrage fait référence représentent une famille de cystéines protéases catalysant le clivage de substrat suivant un résidu aspartate. Classiquement, la spécificité de ces protéases reposait sur l'origine des 4 résidus d'acides aminés positionnés du côté N-terminal du site de clivage (206). Toutefois, tel que discuté dans le chapitre 6, ce concept a été revisité et suggère que le motif DEVD correspondant au site de clivage de la caspase-3 soit en fait très peu représenté (207). À ce jour, une dizaine de caspases ont été identifiées et sont regroupées en trois groupes : les caspases initiatrices 2,8,9,10; les caspases effectrices 3,6,7; et les caspases impliquées dans le processus d'inflammation, soit les caspases 1,4 et 5 (181)

Figure 18: Les voies d'initiation intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose. Reproduit de (208) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Cell Death and Differentiation; copyright 2010.



Légende : Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'activation des caspases chez les mammifères. L'activation des caspases-3 et -7 effectrices est un événement clé dans l'apoptose chez les mammifères, et 2 mécanismes majeurs existent afin d'induire cette tâche. La voie intrinsèque implique la mitochondrie qui agit à titre de récepteur intracellulaire de mort recevant une variété de signaux pro-apoptotiques qui induit l'oligomérisation des protéines pro-apoptotique (Bcl-2-associated protéine, Bax, et Bcl-2 antagoniste, Bak) afin d'induire la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (MOMP). Cela mène à la relâche du cytochrome c qui active Apaf1, l'induction de la formation de l'apoptosome, le recrutement et l'activation de la pro-caspase-9 et le traitement-activation des pro-caspases-3 et -7. Dans la voie extrinsèque, le ligand du récepteur Fas (FasL) induit la formation du complexe membranaire DISC (Death-inducing signaling complex) qui recrute la pro-caspase-8 et active directement la caspase-3. Dans certains types cellulaires, la caspase-8 peut aussi cliver Bid afin de former tBid qui interagit avec Bax/Bak afin d'initier la MOMP, la relâche du cytochrome C et la formation de l'apoptosome. L'activation des caspase-3 et -7 est inhibée par les IAPs, qui en retour peuvent être inhibés par Smac/Diablo et Omi/HtrA2. L'activation des caspase-3 et -7 orchestre la démolition cellulaire via le clivage de substrats spécifiques tels que ICAD, Rho effector ROCK1, la kinase MST1, PARP et des facteurs d'initiation de la traduction.

(209). D'autres caspases ont été identifiées dans des contextes spécifiques : la caspase 11 régule la production de cytokine durant le choc septique (210), la caspase 12 est impliquée dans l'apoptose initiée par le stress du réticulum endoplasmique (211) et la caspase 14 est fortement exprimée durant le développement mais absente dans les tissus adultes (212).

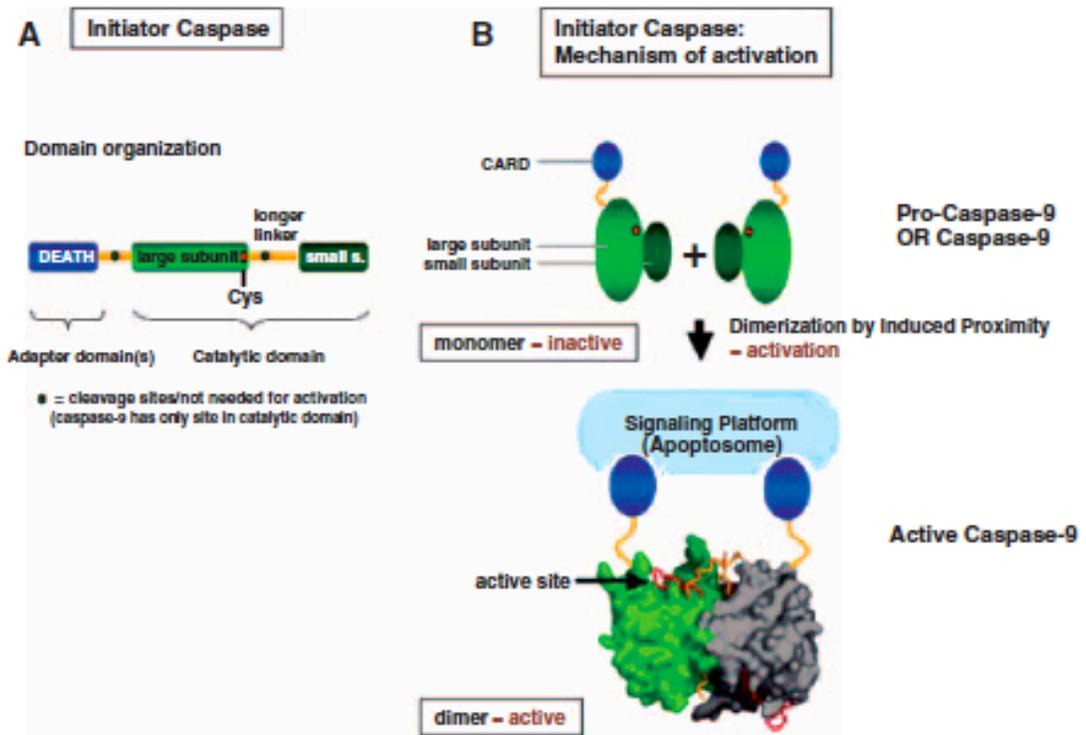
Mécanismes d'activation des caspases

Jusqu'au début de ce nouveau millénaire, la vision classique concernant l'activation des caspases reposait sur trois mécanismes potentiels: 1) l'activation suivant le clivage d'une portion de la forme zymogène des caspases effectrices; 2) l'activation induite par proximité via un complexe d'échafaudage et une activité minimale de la pro-caspase 8 initiatrice; et 3) via la formation d'un holoenzyme permettant de stabiliser la caspase 9 initiatrice au sein de l'apoptosome (213).

Durant les 5 dernières années, la vision classique des mécanismes d'activation des caspases fût annotée par de nouvelles évidences biochimiques et cristallographiques (214-216). Initialement, la protéolyse des caspases semblait être un des seuls facteurs permettant de les activer. Par conséquent, l'activation des caspases initiatrices et effectrices reposait sur la détection de formes clivées.

Or, de nouvelles évidences suggèrent que ce ne soit pas une caractéristique sine qua none. En fait, la régulation des caspases serait davantage associée à leur état de dimérisation (215, 217). Dans le cas des caspases initiatrices, lorsque non activée, celles-ci seraient présentes sous une forme monomérique dans le cytosol. Dans le cas de la caspase-8, sa dimérisation au complexe DISC permettrait de favoriser son activation. Le clivage des 'inter-région' serait conséquent à la dimérisation (Figure 19) et non responsable de son activation directe. Parallèlement, la pro-caspase 9 formerait aussi des monomères et la 'dimerization by induced proximity' lui permettrait de rendre disponible son seul site actif via une interaction avec les facteurs de l'apoptosome initialement décrits (218).

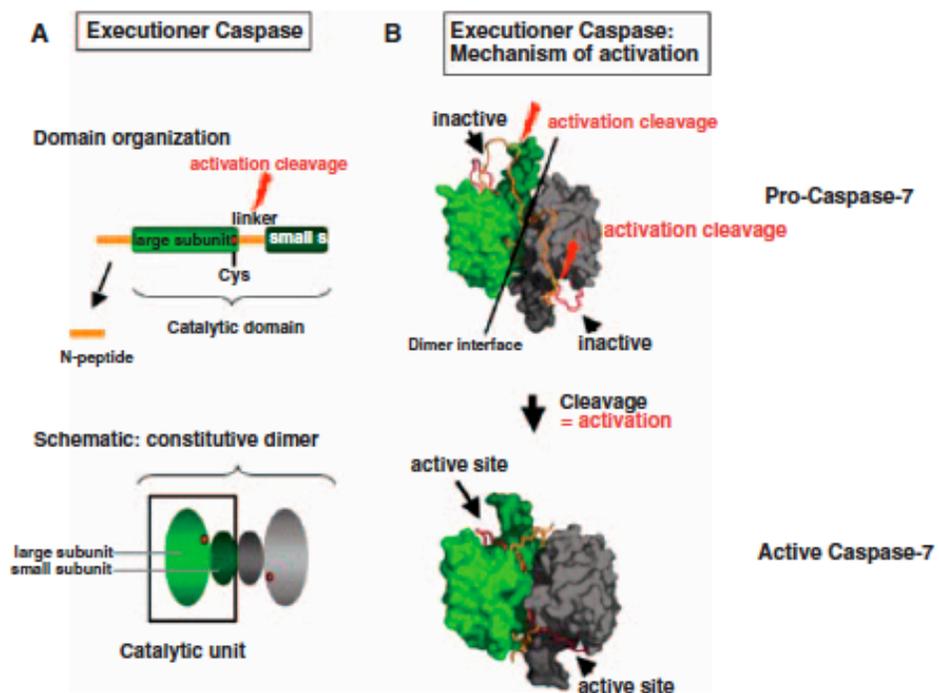
Figure 19: Mécanisme d'activation des caspases initiatrices. Reproduit de (216) avec la permission de Springer.



Légende : Caspases initiatrices : architecture et activation. (A) Les caspases initiatrices sont exprimées à titre de chaînes simples, comprenant un ou deux domaines appartenant à la famille 'DEATH domain' à leur portion N-terminale suivi d'un domaine catalytique qui peut être divisé en une grosse et une petite sous-unité et une boucle relativement longue entre les sous-unités. Malgré qu'elles peuvent être clivées (tel que révélé dans leur structure cristalline), les caspases initiatrices, telle que la caspase-9, démontre une activité complète dans leur forme non clivée, qui peut être conséquent à la longue boucle de connexion entre les sous-unités. (B) Leur activité est régulée par dimérisation et non par clivage. Les caspases initiatrices existent sous une forme inactive monomérique (haut). La liaison à une plateforme oligomérique, tel que l'apoptosome dans le cas de la caspase-9, a lieu via des domaines adaptateurs (tel que CARD, caspase recruitment domain) et résulte en une proximité induite des domaines catalytiques des caspases initiatrices. Des résultats récents suggèrent que cela mène à la dimérisation qui permet la formation d'un site actif tel que démontré ici dans la structure clivée et dimérique de la caspase-9 (bas). De manière intéressante, seulement l'un des 2 sites adopte une forme active dans la structure cristalline de la caspase-9.

En ce qui a trait aux caspases effectrices, celles-ci forment des dimères lorsqu'elles sont inactives et ce complexe dimérique serait requis pour la protéolyse des 'interdomain linker' permettant de rendre accessible les 2 sites actifs retrouvés au sein des dimères. Ce mécanisme est illustré entre autre pour la caspase 7 (Figure 20) (219, 220). Ce mécanisme suggérant que l'état de dimérisation participe initialement à l'activation diffère de celui proposé initialement stipulant que ce soit le clivage des pro-formes des caspases qui véhicule leur activation. De plus, il n'est pas exclu que leur forme monomérique corresponde à une forme active non décrite à ce jour.

Figure 20: Mécanisme d'activation des caspases effectrices. Reproduit de (216) avec la permission de Springer.



Légende : Caspases effectrices : architecture et activation. (A) Activation des caspases effectrices. Les caspases sont initialement exprimées à titre de protéine à chaîne unique qui s'active suivant un clivage. Une caspase effectrice est typiquement clivée 2 fois, menant ultimement à la libération d'un petit peptide N-terminal. Le clivage d'activation divise l'unité catalytique en une grosse et une petite sous-unité. La position du résidu cystéine au sein du site actif est indiquée en rouge. Bas : schéma illustrant que les caspases effectrices forment de manière constitutive des dimères composés de deux unités catalytiques. (B) Interprétation de la surface d'une caspase effectrice (caspase-7) suivant le clivage de pré activation et de post activation. Le même code de couleur de (A) est utilisé et les régions affichant les boucles sont présentées

sous forme de rubans. Le clivage induit une relâche des contraintes des boucles de surface (rouge et orange) et les chaînes se réarrangent. Les nouvelles portions terminales formées d'une grosse et d'une petite sous-unité (orange) interagissent entre elles à travers l'autre unité catalytique, et avec les boucles rouges afin de joliment aligner les pochettes de liaisons des substrats au bas de la fourche du site actif. Cela résulte en une caspase très active (bas).

Une explication proposée afin de justifier l'état basal dimérique des caspases effectrices comparativement à la forme monomérique des caspases initiatrices repose sur leur constante de dissociation (Kd). Les régions hydrophobiques des caspase 3 et 7 favorisent la dimérisation à l'état basale et est 1000 fois plus petite que celle pour la caspase-8 (50 nM vs 50 uM pour les caspases 3 et 8 respectivement) (214, 217, 221) .

Somme toute, ces nouvelles observations nous amènent à redéfinir nos méthodes d'évaluation de l'activation des caspases. Il sera intéressant de voir si les formes monomériques et dimériques non actives des caspases ont d'autres rôles fonctionnels que ceux associés à la dégradation des substrats associés à la démolition cellulaire apoptotique. De plus, il sera intéressant de voir si les formes clivées des caspases corrèlent avec l'incidence de dimérisation des caspases initiatrices associée à leur activation.

Les inhibiteurs de l'apoptose et l'activation des caspases

En absence de stress initial, plusieurs inhibiteurs cytosoliques s'affairent à inhiber les caspases afin d'empêcher l'induction accidentelle de l'apoptose. Parmi ces inhibiteurs, on dénote la famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins). Des études de cristallographie ont permis de révéler les interactions directes de ces inhibiteurs avec les caspases via les domaines BIR (Baculoviral IAP repeat) (222). Par conséquent, les caspases demeurent séquestrées dans des complexes avec les IAP en absence de signaux de stress. Un point intéressant avec l'hypothèse de dimérisation nécessaire à l'activation des caspases initiatrices reposent sur la liaison du domaine BIR3 qui lie la caspase-9 via un interface dimérique de celle-ci et non le site actif de l'enzyme (223).

Les acteurs libérés de la mitochondrie ont pour but de réguler l'activation des caspases initiatrices et effectrices. Le cytochrome C participe à la formation de l'apoptosome soit une plateforme moléculaire nécessaire pour l'activation de la caspase-9 initiatrice impliquant aussi un facteur

cytosolique, APAF-1. Suivant la formation de ce complexe, la caspase-9 deviendrait active et participerait à une série d'interactions et de réactions enzymatique permettant d'activer les caspases-3, 6, 7 effectrices. Afin de lever l'inhibition complète des caspases, Smac-Diablo est relargé des mitochondries vers le cytoplasme et compétitionne à la fois avec XIAP afin de favoriser l'activation de la caspase-9 et ainsi que les IAP complexé avec les caspases effectrices 3 et 7 (224, 225).

Exemples d'apoptose initiée par la voie intrinsèque

- *L'ischémie reperfusion*

L'interruption de la circulation sanguine prive l'endothélium d'oxygène et cause l'accumulation de produits oxydatifs. Les changements biochimiques associés à cet état transitoire inclus 1) diminution du métabolisme oxydatif ayant pour effet de générer des ROS (reactive oxygen species), 2) la diminution de la production d'ATP, 3) augmentation de la glycolyse anaérobie, 4) l'inhibition des pompes Na-K ATPase et 5) l'inhibition de l'expression de gènes cytoprotecteurs (105). La reperfusion de l'organe suite à la greffe contribue lui aussi à générer la production de molécules oxydantes surchargeant ainsi les mécanismes antioxydants intrinsèques à la cellule résultant en une mort cellulaire apoptotique (226).

Plusieurs études ont démontrés le rôle des mitochondries dans l'initiation de l'apoptose durant l'ischémie reperfusion. En plus de la surproduction d'agents oxydants pouvant endommager les membranes mitochondriales ainsi que l'ADN, ces études ont aussi été corrélées avec la relâche du cytochrome c suivant le recrutement de Bax aux mitochondries, la relocalisation de Smac-Diablo ainsi que l'activation des caspases 3 et 9 (227-229). Par exemple, l'apoptose endothéliale est détectée dans plusieurs modèles *in vivo* d'ischémie reperfusion où, l'on observe concomitamment la caspase-3 activée et la fragmentation de l'ADN visible par la technique TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labelling) (86, 230-232). De plus, la sur-expression de Bcl-xL par transfert adénoviral dans des cellules endothéliales pulmonaires protège contre l'apoptose induite par l'ischémie reperfusion (233). En résumé, l'ischémie reperfusion augmente l'incidence d'apoptose endothéliale qui est un évènement clé dans le développement de la VG.

- *Résistance à l'apoptose des CML dans le développement de la VG*

Par opposition à la participation de l'apoptose endothéliale dans le développement de la VG, les CML participant à l'épaississement néo-intimal suivant l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique leur permet de résister à l'environnement inamical créé par les insultes immunologiques.

L'importance de la voie intrinsèque de l'apoptose est reflétée par la participation des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, dont Bcl-xL dans l'acquisition de ce phénotype. Les études de Suzuki et al. ainsi que de Pollman et al. ont démontré qu'en ciblant négativement l'expression de Bcl-xL à l'aide d'oligonucléotides antisens dans un modèle de transplantation cardiaque murin ou dans des lésions athérosclérotiques, l'incidence de l'épaississement myo-intimal était significativement diminuée démontrant ainsi l'importance de la régulation de la voie intrinsèque de l'apoptose dans le développement de la VG (77, 78).

2) La voie extrinsèque

Par opposition à la mort venant 'de l'intérieur' (du latin *intrinsicus*), l'apoptose peut être préméditée et être initiée 'du dehors' (du latin *extrinsecus*). Les cellules avoisinantes peuvent influencer le destin cellulaire des autres cellules en exprimant à leur surface membranaire des ligands (FasL, TNF- α , Apo3L, et Apo2L) compatibles avec des récepteurs (FasR, TNFR1, DR3, DR4 et DR5) présents sur la cellule cible. Par la suite, une cascade de signalisation est initiée dans le cytoplasme incluant le recrutement de protéines d'échafaudage permettant le recrutement de la caspase-8 initiatrice ayant pour but ultime d'activer la caspase-3 effectrice (Figure 18).

Ce cas est illustré lorsque les récepteurs des CTL reconnaissent des cellules présentant des peptides antigènes n'appartenant pas à l'hôte via leurs CMH. Les CTL expriment le FasL à leur surface membranaire et active la voie extrinsèque de l'apoptose suivant la trimérisation du récepteur Fas présent à la surface des cellules cibles. Par la suite, un complexe de signalisation pro-apoptotique, DISC, est initié. Ce complexe recrute des protéines d'échafaudage dont FADD contenant à la fois une portion death domain (DD) se liant au récepteur Fas trimérisé et un 'death effector domain' (DED) permettant de recruter la pro-caspase-8 initiatrice (198, 213). Tel que discuté précédemment, l'activation de la caspase-8 serait un mécanisme de 'dimerization induced by proximity'.

L'activation de la caspase-8 mène à une exécution très efficace de l'apoptose et représente un bel exemple d'interconnexion entre les voies d'initiation intrinsèque et la voie extrinsèque de l'apoptose. Lorsqu'activée, la caspase-8 peut amplifier la signalisation de l'apoptose via la protéolyse de Bid, qui lorsque tronqué (tBid) migre vers la mitochondrie afin de compromettre son intégrité assurée par les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Cette relocalisation de tBid vers les mitochondries favorise le relargage du cytochrome C permettant la formation de l'apoptosome et

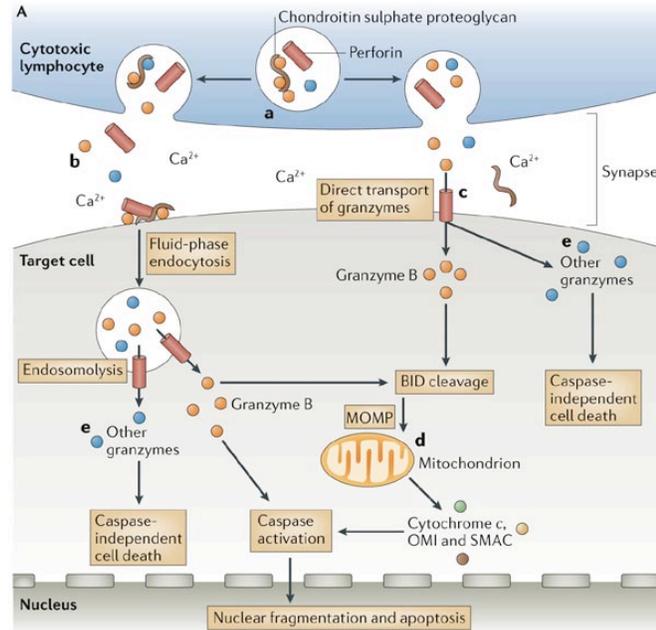
l'activation subséquente de la caspase initiateur-9. De plus, la caspase-8 activée peut directement activer la pro-caspase 3 effectrice et peut cliver directement différents substrats compromettant davantage l'intégrité cellulaire (198, 213). En conclusion, l'induction extrinsèque de l'apoptose des cellules endothéliales par les CTL est un phénomène précoce associé au développement de la VG.

3) La voie Perforine et Granzyme

L'action meurtrière des CTL et les NK n'est pas pathologique en soi et la réponse à un allogène n'est qu'un mécanisme physiologique développé afin d'éviter l'envahissement par des organismes pathogènes ainsi que par les cellules tumorales. Par contre, dans un contexte de transplantation, ces types cellulaires s'attaquent aux cellules du greffon présentant des peptides allogènes de manière majestueusement efficace (234): en plus de s'attaquer aux pourtours de la cellule permettant d'induire la voie extrinsèque de l'apoptose, les CTL possèdent une autre arme dangereuse : le système perforine et granzyme (A et B) (235-237). Ils possèdent des granules cytotoxiques contenant la perforine, une protéine transmembranaire qui forme des pores ainsi que des sérines protéases nommées granzymes capables d'induire l'apoptose via des mécanismes dépendant et indépendant des caspases. La granzyme B possède le potentiel pro-apoptotique le plus puissant et partage son habileté à cliver différents substrats suivant un résidu aspartate de manière analogue aux caspases (238).

Lorsque les CTL reconnaissent une cellule étrangère ou infectée, le contenu de leurs granules toxiques est rapidement libéré dans l'espace synaptique entre le CTL et la cellule cible. La perforine facilite l'entrée des granzymes dans le cytoplasme de la cellule cible (238). Par la suite, 2 mécanismes ont été décrits concernant l'entrée intracellulaire de la perforine et de granzyme. D'une part, ces protéines pourraient être endocytosées et redistribuées dans le cytoplasme. D'autre part, en présence de calcium extracellulaire, la perforine peut polymériser et former des pores membranaires de 10 à 20 nm de diamètre analogue complexe MAC du système du complément permettant ainsi à granzyme B de diffuser à l'intérieur du cytoplasme. Lorsque présente dans le cytosol, la granzyme B induit l'apoptose préférentiellement via l'activation de la voie intrinsèque (Figure 21) (239-242).

Figure 21 : La voie d'initiation Perforine et Granzyme B. Reproduit de (238) avec la permission de avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Review Immunology; copyright 2006.



Légende : Modèles synergiques de perforine et de granzyme durant la mort cellulaire ciblée. Comment les lymphocytes cytotoxiques tuent les cellules cibles ? Lorsqu'appliqué individuellement à la cellule cible, la perforine purifiée cause la mort via la lyse, soit une forme de nécrose. Toutefois, la plupart des investigateurs soutiennent que l'induction de l'apoptose est le mécanisme de mort cellulaire qui est induit par les lymphocytes cytotoxiques in vivo, compte tenu que la perforine est habituellement empaquetée et sécrétée avec les granzymes (**Aa**). Les granzymes actifs (protéines basiques) sont emmagasinés en association avec les protéoglycans chondroïtine sulphate négativement chargés, desquels ils se dissocient lorsqu'ils sont relâchés dans la pochette synaptique où le pH est neutre. Les domaines cationiques conservés à la surface de granzyme B semblent réguler à la fois ses liaisons aux membranes négativement chargées ainsi que son chargement dans des vésicules endocytaires (**Ab**). Après avoir rencontré du Ca²⁺ extracellulaire, perforine lie des moitiés lipidiques de la membrane de la cellule cible via son C2 domaine (**Ab,c**). Si elle est délivrée à une concentration suffisamment élevée, perforine peut polymériser sous forme de pores transmembranaires (similaires à ceux du système du complément) qui ont un diamètre de 10-20 nm (**Ac,B**), à l'intérieur desquels granzymes peut diffuser à l'intérieur de la cellule. Alternativement, de faibles concentrations de perforine facilitent l'entrée sélective et l'accumulation de granzymes. Une deuxième hypothèse propose que la perforine perturbe le trafic endosomal dans la cellule cible (via un processus nommé endosomolyse), qui de cette façon permet à granzyme B de sortir dans le cytosol là où il peut accéder à ses substrats. Lorsque granzyme B atteint le cytosol, cela induit l'apoptose dans la plupart des cellules en activant de manière préférentielle la voie

mitochondriale ('intrinsèque'). **(Ad)**. Granzyme B clive Bid et le fragment C-terminal de Bid induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la relâche subséquente du cytochrome c et OMI. L'activation des caspases s'ensuit et induit les manifestations associées à l'apoptose. D'autres granzymes pourraient aussi induire des mécanismes de mort cellulaire caspase-indépendant **(Ae)**.

La phase effectrice de l'apoptose orchestre une démolition cellulaire contrôlée

Rebecca C. Taylor, Sean P. Cullen et Seamus J. Martin ont écrit un excellent article de revue relié à la démolition cellulaire apoptotique associée à la phase effectrice de l'apoptose (243). Ils comparent le processus apoptotique à un acte de démolition contrôlé et basé sur une première étape de fragilisation cellulaire et une étape de démolition dirigée vers des structures et des organelles clés. Durant les étapes de fragilisation, les caspases effectrices clivent une série de protéines reliées au microfilament d'actine (myosin, spectrin, α -actinin, gelsolin et filamin) et aux protéines associées aux microtubules (tubuline, tau, dynein) (244-246). Cette fragilisation du cytosquelette participerait aux changements morphologiques initiaux de l'apoptose dont l'arrondissement et la rétraction des cellules. Finalement, la protéine ROCK1 participerait au bourgeonnement membranaire (blebbing) durant cette phase (247, 248). À ce jour, ROCK1 est l'un des seuls substrats des caspases dont la protéolyse a été démontrée à titre d'événement important dans les changements morphologiques associés à l'apoptose. La désintégration de l'enveloppe nucléaire via la protéolyse des lamins A,B et C la fragmentation nucléaire et le détachement des cellules de la matrice extracellulaire sont aussi des événements associés à l'activation des caspases effectrices (249). Ces changements sont accompagnés d'une rétraction de la cellule et d'un détachement de la MEC (250).

Suivant l'étape de fragilisation, les caspases effectrices s'affairent à stopper les mécanismes essentiels au bon fonctionnement de la cellule. Par conséquent, l'ADN est condensé et dégradé mais la nécessité et la signification réelle de ce processus durant l'apoptose demeurent débattues. La transcription et la traduction sont ciblées afin de réduire leur activité via le clivage de plusieurs substrats impliqués dans ces mécanismes. De plus, les réseaux associés au golgi, au RE et aux mitochondries sont fragmentés diminuant entre autre l'activité sécrétoire classique via le clivage de la syntaxine 5 nécessaire au processus d'exocytose l'apoptose (251-254).

Finalement, l'apoptose semble être programmée afin de faciliter l'élimination des résidus cellulaires apoptotiques par les macrophages (255). En fait, la disposition du matériel cellulaire dans des corps apoptotiques membranaires empêche ainsi de déverser le contenu intracellulaire dans le milieu extracellulaire qui peut créer une réponse inflammatoire robuste. Les macrophages impliqués dans la disposition des corps apoptotiques se comportent différemment de ceux impliqués dans la phagocytose des bactéries en minimisant l'expression de cytokines, dont le TNF- α (256-258).

Chapitre 6 - Technologies associées aux 'Omics'

Omic research offers context, it offers data of time-capsule utility and it offers broad hypothesis generation. In an imperfect world, that is a lot.
- John N Weinstein (259)

John N Weinstein a élégamment positionné les nouveaux tournants scientifiques relatifs aux percées technologiques associées à l'étude des systèmes biologiques. Il décrit que traditionnellement, la biologie moléculaire était basée sur l'étude d'un seul gène ou d'une seule protéine, une expérience à la fois. De plus, la plupart du temps, l'étude protéique ou génique monogamique représentait la carrière complète d'un chercheur. J.N. Weinstein décrit que désormais, la biologie est une opération industrialisée basée sur un processus de 'high-throughput' générant une multitude de résultats révélant de manière insoupçonnée la complexité des organismes vivants (259). Ces nouveaux développements technologiques sont nommés 'omics' et sont associés à l'étude globale de systèmes biologiques. Cette nouvelle ère des 'omics' a débuté avec le séquençage du génome humain (260, 261). Il est intéressant de mentionner que cette approche n'était pas basée sur une hypothèse dirigée (hypothesis-driven) mais plutôt sur la compilation et la génération d'informations globales permettant par la suite de générer des hypothèses (hypothesis-generating). Ce nouveau type de raisonnement initié par les 'omics' démontre l'importance d'une nouvelle synergie entre le concept classique de proposer une hypothèse et de la démontrer à l'aide d'un système simple comparativement à générer des résultats à large spectre dans des conditions données et de proposer de nouvelles hypothèses suivant la génération de ces résultats. Il demeure toutefois primordial qu'un contexte donné et déterminé préalablement soit le moteur de toute approche scientifique de type 'omic'. Finalement, la génération et l'accès publique à d'importantes banques de données relatives à l'identification de différents contextes 'omics' permettent maintenant de profiter non seulement à l'expérimentateur générant les données, mais aussi à la communauté scientifique qui en retour peut faire différents liens avec leurs domaines d'études respectifs. De plus, les approches 'omics' permettent de générer des résultats inattendus qui n'auraient pu être anticipés par l'approche classique d'hypothèse dirigée (262).

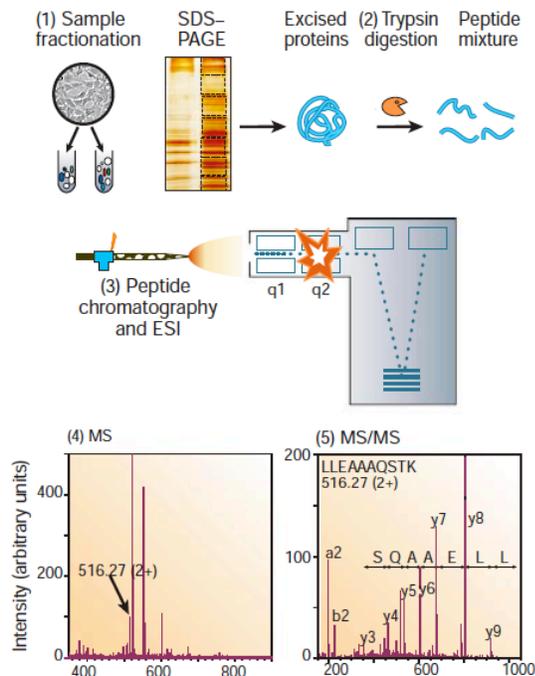
Une terminologie exhaustive est présentement utilisée afin de caractériser l'ensemble des informations issues de différents systèmes biologiques par des approches 'omics' : génomique, protéomique, lipidomique, immunomique, métabolomique kinomique, et la dégradomique en sont quelques exemples. Initialement, la génomique a connu un intérêt particulier compte tenu notre

croissance que toutes informations pertinentes relatives à la biologie est inscrite dans les gènes. Cette approche peut s'avérer très utile, par exemple en cancérologie, afin de comprendre la modulation de différents gènes exprimés et mutés dans la progression tumorale. Cependant, la génomique n'est pas un outil rationnellement pertinent et favorable à tous les systèmes biologiques étudiés. Compte tenu que la protéine est le produit du gène exerçant la fonction initialement établie, celle-ci peut être modifiée post traductionnellement dans des contextes pathologiques donnés. Or, ces informations ne sont pas nécessairement inscrites dans le génome. Par exemple, la génomique n'est pas particulièrement appropriée pour étudier les mécanismes de régulation post traductionnelle associés à la mort cellulaire apoptotique qui est principalement régulée de cette façon. Les étapes de régulation post traductionnelles régulant l'apoptose en général sont: 1) la localisation des protéines; 2) des mécanismes de séquestration et 3) une importante activité protéolytique. Alternativement aux outils associés à l'étude génomique, ceux de la protéomique offrent l'avantage d'étudier directement les substrats, les catalyseurs et les produits de ces étapes de transformations post traductionnelles. Ainsi, la protéomique offre un aperçu moléculaire dans un temps donné et s'avère très utile pour comprendre les mécanismes de régulation associés à un contexte apoptotique.

Techniquement, un protéome est une population de protéines associées à un type cellulaire donné et caractérisé en termes de localisation, de modifications post-traductionnelles, d'interactions, et de 'turnover' dans un temps donné (263). La protéomique est principalement associée à la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MSMS) permettant d'obtenir la séquence primaire des protéines avec une rapidité, une sensibilité et une spécificité largement plus efficaces que l'approche classique de la dégradation d'Edman. L'instrumentalisation associée au LC-MSMS a pris un essor important lorsque les techniques d'ionisation de peptides ont été découvertes et développées par les nobélisés de chimie en 2002, John B. Fenn, Koichi Tanaka, Kurt Wüthrich (264). L'avènement de cette nouvelle technologie permet d'identifier des quantités infimes de protéines de l'ordre des femtomoles (1×10^{-12} mol). De manière simplifiée, l'approche expérimentale associée au spectromètre de masse incorpore une source d'ions (ESI ou MALDI), un analyseur de masse qui mesure le rapport masse/charge (m/z) des analytes ionisés et un détecteur qui enregistre le nombre d'ions correspondants à chaque valeurs m/z détectées (Figure 22) (265). Les échantillons protéiques sont préalablement fractionnés soit par gel SDS-PAGE, soit par chromatographie liquide, soit purifiés par des techniques de captures immunologiques. De plus, dans une perspective de quantification, les échantillons protéiques peuvent être générés différemment *in vitro* avec différents isotopes dont les différentes masses sont distinguables par

la spectrométrie de masse en tandem. Des étapes de réduction et d'alkylation précèdent la digestion des échantillons avec la trypsine qui clive les protéines suivant un résidu lysine, générant ainsi des peptides avec un C-terminal protonné, facilitant ainsi le processus d'ionisation.

Figure 22: Aperçu général de l'approche de spectrométrie de masse en tandem. Reproduit de (265) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature; copyright 2000.



Légende : les expériences typiques de protéomique consistent en 5 étapes. Durant l'étape 1, les protéines à être analysées sont isolées des lysats cellulaires ou des tissus par fractionnement biochimique ou par sélection d'affinité. Cela nécessite généralement une étape finale de séparation en une dimension sur gel d'électrophorèse, et définit ainsi le subprotéome à être analysé. La spectrométrie de masse des protéines entières est moins sensible que la spectrométrie de masse de peptides et la masse d'une protéine intacte n'est pas suffisante pour l'identification. Par conséquent, les protéines sont dégradées enzymatiquement en peptides à l'étape 2, habituellement à l'aide de la trypsine, générant des peptides dont le dernier acide aminé de la portion C-terminale est protonné, générant ainsi un avantage pour le séquençage peptidique subséquent. À l'étape 3, les peptides sont séparés à l'aide d'une ou plusieurs étapes de chromatographie liquide dans des capillaires très fins et élués dans une source ionique en 'spray' (electrospray) où ils sont nébulisés en petites gouttelettes hautement chargées. Après évaporation, les peptides multi-protonnés entrent dans le spectromètre de masse et, à l'étape 4, un spectre de masse des peptides élués au temps donné est effectué (spectre MS1, ou spectre normal de masse). L'ordinateur génère une liste prioritaire de ces peptides pour une fragmentation supplémentaire et une série de spectrométrie de masse en tandem ou des expériences 'MS/MS' se

poursuivent (étape 5). Ces dernières comportent une isolation d'un peptide ionisé donné, suivi de fragmentation par des collisions énergétiques avec un gaz et l'enregistrement des spectres tandem ou MS/MS. Les spectres MS et MS/MS sont typiquement enregistrés à chaque seconde pour appariement avec une banque de séquences protéiques. Le résultat final de l'expérience est l'identification des peptides et par conséquent les protéines constituant la population de protéines initialement purifiées.

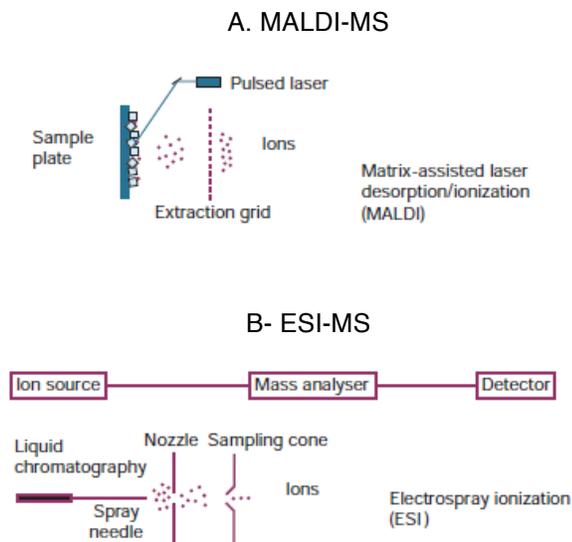
L'approche MALDI-MS (Matrix-assisted laser desorption-ionization) est habituellement utilisée afin de générer une mappe peptidique d'un échantillon protéique donné (Figure 23 A). Le processus d'ionisation est associé à la sublimation et l'ionisation d'échantillons concentrés sur une plateforme solide où l'utilisation d'un laser permet aux ions peptidiques de 'voler' dans une trappe à ions. Par la suite, le 'time of flight' des ions peptidiques est comptabilisé et détecté par différents analyseurs de masse permettant de générer une liste de peptides ayant des m/z distincts. Dans ce contexte, les protéines sont identifiées via un appariement des masses correspondantes aux peptides expérimentaux avec une liste de peptides dont les masses ont été théoriquement calculées et comptabilisées dans des banques de données (266).

Parallèlement, les échantillons fractionnés peuvent être directement ionisés et analysés en phase liquide avec une source ionisable nommée Electrospray Ionization (ESI)-MS (Figure 23 B). Le concept est le suivant : les peptides générés suivant la digestion trypsique sont élués par chromatographie liquide dans des capillaires très fins où ils sont soumis à une ionisation en 'spray' les réduisant ainsi en de fines gouttelettes chargées. Suivant un processus d'évaporation, les peptides protonés entrent dans le spectromètre de masse et les spectres de ces peptides (MS) élués sont enregistrés à un temps donné. L'ordinateur génère une liste de peptides priorisés pour un second tour de fragmentation à l'aide de collisions énergétiques avec un gaz permettant de fragmenter les ions peptidiques entre chacun des acides aminés, permettant ainsi d'obtenir les séquences primaires peptidiques (MS-MS). Par la suite, ces peptides sont associés spécifiquement à des protéines données à l'aide des banques de données disponibles pour différentes espèces.

L'un des défis techniques de l'identification de protéines par spectrométrie de masse en tandem (LC-MSMS) est relié à la complexité des échantillons protéiques analysés plutôt qu'à la limite de détection de l'appareil analytique. De plus, la sur abondance de certaines protéines diminuent les probabilités d'identifier les protéines moins abondantes mais non moins pertinentes dans un contexte donné. Une certaine compétition existe durant le processus d'ionisation faisant en sorte

que les peptides les plus abondants ont plus de chance d'être ionisés et par conséquent, identifiés. Par contre, une protéine fonctionnellement importante peut être transitoirement présente à plus bas niveau d'expression que les protéines très importantes mais demeure fonctionnellement plus importante. Afin d'augmenter l'identification de protéines moins abondantes par LC-MSMS, différentes techniques biochimiques ont été développées à partir des propriétés chimico-physiques des protéines. Par conséquent, dépendamment de la complexité quantitative et qualitative des protéomes étudiés, il est possible de les fractionner et les purifier. Par la suite, l'analyse LC-MSMS permet d'évaluer individuellement plusieurs fractions protéiques d'un protéome donné. Ces techniques de séparation incluent 1) la séparation de protéines sur gel en 1 ou 2 dimensions ; 2) séparation par chromatographie liquide (LC); 3) purification par immunoaffinité ; 4) étiquetage radioactif et/ou isotopique permettant d'identifier et quantifier un même peptide présent dans 2 protéomes comparés. La combinaison de ces différentes approches permet d'augmenter les probabilités d'identification protéique.

Figure 23: Les principes d'ionisation des peptides par le MALDI et le ESI. Reproduit de (265) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature; copyright 2000.



Légende : Les portions gauche et droite de la figure illustrent l'ionisation et le processus d'introduction de l'échantillon durant 'electrospray ionization' (ESI) et 'matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)'. Les différentes configurations instrumentales (a) sont illustrées avec leur source d'ions typique. (a) Dans le cas des instruments 'reflector time-of-flight' (TOF), les ions sont accélérés à un haut niveau cinétique énergétique et sont séparés dans un 'flight tube' en raison de leur différente vitesse. Les ions sont redirigés vers un réflecteur

qui compense pour les petites différences d'énergie cinétique et par la suite les propulsent sur un détecteur qui amplifie et compte les ions qui y arrivent. (b) L'instrument 'TOF-TOF' incorpore une cellule de collision entre deux sections 'TOF'. Les ions dont le ratio masse/charge équivaut à un sont sélectionnés dans la première section TOF, et par la suite fragmentés dans la cellule de collision et les masses des fragments sont séparées dans la seconde section TOF.

Durant la dernière décennie, la spectrométrie de masse en tandem est passée d'un outil permettant un simple processus d'identification de protéines à des approches de comparaison, de quantification, de caractérisation de modifications post-traductionnelles, d'étude fonctionnelle et d'identification de biomarqueurs biologiques pouvant être utilisés pour des fins de diagnostic. De plus, la formation d'équipe multidisciplinaire faisant appel autant aux biologistes moléculaires, aux chimistes organiciens et analytiques, aux bio informaticiens et aux médecins chercheurs, a pris de l'essor afin d'intégrer les données biologiques et protéomiques dans des contextes pathologiques. La créativité associée au développement de la protéomique fût l'un des moteurs importants permettant de dresser différentes façons d'étudier des protéomes donnés. Finalement, l'ère des 'omics' a permis de générer une quantité importante de banques de données diverses qui servent maintenant d'outils indispensables afin de générer de nouvelles hypothèses.

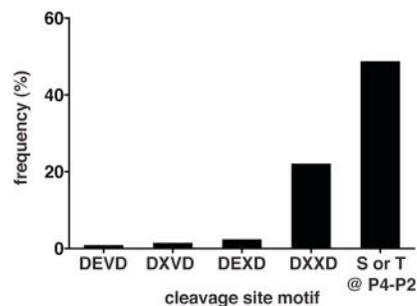
Caspases et dégradomique

Un bel exemple d'étude protéomique créative ayant généré des résultats inattendus et d'autant plus pertinents au projet présenté dans cette thèse, est celui associé au séquençage global des sites de clivages des substrats associés à l'apoptose (207). Cette étude 'dégradomique' et comparative d'échantillons protéiques complexes fait appel à une approche enzymatique basée sur une sélection positive de fragments protéiques contenant des amines- α non bloquées résultant d'une activité protéolytique. À partir de cette prémisse, les auteurs ont développé un système incluant un peptide recombinant composé d'un site de clivage pour la TEV et un fragment biotinylé pouvant être substitué sur les amines- α non bloqués des fragments peptidiques générés durant l'apoptose. Une subtiligase ayant une spécificité absolue pour les amines- α et non les amines epsilon permet d'ajouter le peptide biotinylé recombinant. L'apoptose a été induite dans des cellules Jurkat via la voie intrinsèque à l'aide d'un inducteur classique de l'apoptose, l'etoposide. La méthode d'identification consiste à incuber les protéomes avec le peptide et la subtiligase afin de transférer le peptide biotinylé sur les fragments peptidiques. Suivant un traitement à la trypsine, les produits peptidiques sont capturés sur une colonne avidin permettant de purifier uniquement les fragments N-terminal ayant un tag biotinylé. Par la suite, ces fragments sont traités avec la TEV afin de libérer

les fragments du peptide recombinant initial et les produits sont séparés par SDS-PAGE mono et bidimensionnel. Un point important est que les peptides enrichis retiennent une modification N-terminale SY-dipeptidique fournissant une caractéristique clé leur permettant d'être distingués des peptides non tagués et de nature contaminante.

Leur analyse comparative a généré 3 points importants. D'abord, leur approche comparative des protéomes apoptotique et non apoptotique ont révélé que 43% des peptides identifiés dans les protéomes apoptotiques correspondent à un site de clivage suivant un résidu aspartate caractéristique de l'activité protéolytique des caspases. Ces peptides correspondaient seulement à 1% des protéomes non apoptotiques, démontrant la spécificité de l'activité protéolytique des caspases. Deuxièmement, ils ont démontré que les sites de clivages identifiés dans les protéomes apoptotiques correspondent à des sites de clivage généralement associés aux caspases effectrices 3 et 7. Toutefois, ils ont observé que le site canonique DEVD associé au clivage des caspases 3 et 7 représente en fait seulement 1% des substrats qu'ils ont identifiés (Figure 24) et qu'un motif plus permissif DXXD a été identifié dans 22% des peptides séquencés. Cette observation soutient un point important concernant la puissance de la protéomique : à partir d'une hypothèse selon laquelle les caspases effectrices participent à la démolition cellulaire durant l'apoptose, ces travaux démontrent qu'en fait, le motif classique de clivage auquel on se référait depuis des années est en fait sous-représenté dans des échantillons protéiques complexes.

Figure 24: Le motif de clivage DEVD canonique est sous-représenté dans les peptides générés par les caspases effectrices. Reproduit de (207) avec la permission de Elsevier.



Légende : Fréquence des motifs P4-P1 dans les sites de clivages de type caspase identifiés dans les cellules Jurkats apoptotiques.

Un 3^{ème} point important de cette étude est qu'en évaluant les interactions des substrats identifiés à l'aide de banques de données interactionnelles, les substrats des caspases forment des complexes spécifiques associés à différentes fonctions cellulaires incluant 1) la régulation de la transcription et de la réparation de l'ADN, 2) les mécanismes anti et pro apoptotiques, 3) les changements mitochondriaux, 4) la régulation de l'initiation de la traduction, 5) le déroulement de la chromatine durant la réplication, 5) l'endocytose et 6) la division cellulaire. Cet aspect suggère donc que l'activité protéolytique des caspases est ciblée et non généralisée permettant ainsi d'induire une signature mécaniquement importante pour le démantèlement cellulaire. Finalement, ils ont aussi observé que les sites de clivages des caspases sont situés à l'intérieur ou entre les domaines fonctionnels des substrats et que la structure tertiaire et quaternaire des substrats clivés durant l'apoptose permettraient de faciliter l'accessibilité des caspases.

Somme toute, cette étude dégradomique a permis de révéler plusieurs observations inattendues et de générer de nouvelles hypothèses concernant l'activité protéolytique des caspases durant l'apoptose.

CASBAH

Les études protéomiques permettent de générer une quantité importante d'informations pertinentes comptabilisées dans différentes banques de données accessibles au public. Un exemple pertinent à ces ressources disponibles sur l'internet est la banque de données CASBAH (The CAspase Substrate dataBAse Home page). CASBAH regroupe une liste complète de tous les substrats des caspases recensés manuellement dans la littérature scientifique (267). Les auteurs de cette banque de données suggèrent que les substrats comptabilisés dans cette banque sont principalement associés à l'activité des caspases effectrices 3 et 7 compte tenu que les substrats connus pour les caspases initiatrices 8 et 10 sont seulement au nombre de 2 (BID et RIP kinase). De plus, ils ajoutent que l'inhibition des caspases effectrices a pour effet d'influencer les caractéristiques morphologiques associés spécifiquement à l'apoptose, soit la rétraction du cytoplasme, le 'blebbing' et la production de corps apoptotiques, suggérant que la plupart des substrats retrouvés dans CASBAH sont des cibles des caspases effectrices (267). L'accessibilité à cette banque de données s'est révélée particulièrement pertinente pour le projet présenté dans cette thèse et vous pourrez apprécier cette utilité dans l'élaboration de nouvelles hypothèses proposées dans la section Discussion.

Vasculomique

La vasculomique intègre toutes les approches 'omics' associées à l'étude de la biologie vasculaire et l'angiogénèse. Par exemple, plusieurs études transcriptomiques ont permis de comparer l'expression génique de cellules endothéliales isolées de vaisseaux sanguins dans des contextes de croissance normale, angiogénique ou tumorale. Ces travaux ont révélé que dépendamment de l'origine et de l'état d'activation des cellules endothéliales, celles-ci initient différents programmes d'expression génique révélant ainsi les différences physiologiques et pathologiques. Ces informations sont importantes pour le développement d'approches pharmacologiques visant à traiter les cellules tumorales et les maladies vasculaires ainsi que pour des fins diagnostiques et de monitoring (262, 268-271).

Plusieurs études 'omics' ont été effectuées en lien avec l'athérosclérose. Un intérêt particulier est celui de caractériser les composantes protéiques et lipidiques permettant de miroiter et prédire l'évolution des plaques athérosclérotiques. Dans cet optique, des approches protéomiques classiques ont permis d'identifier des protéines impliquées dans la migration des cellules musculaires lisses et la dégradation de la matrice extracellulaire contribuant à la rupture de ces plaques. Au total, 800 protéines ont été identifiées dans ces plaques athérosclérotiques permettant de générer une mappe protéique dont les fonctions biologiques permettront, dans un futur rapproché, de valider leur importance à titre de médiateur et de biomarqueur de l'athérosclérose (272, 273).

La caractérisation du protéome plasmatique associé au HUPO Plasma Proteome Project (274, 275) a permis de révéler 345 protéines associées aux fonctions cardiovasculaires. Toutefois, tous les résultats issus de ces analyses 'omics' sont victimes d'un écart important entre la recherche fondamentale et la médecine translationnelle. Un défi de taille de la technologique 'omic' repose sur la difficulté d'extraire parmi toutes ces données celles qui sont réellement pertinentes aux maladies vasculaires. De plus, la variabilité et la stabilité des échantillons récoltés affectent grandement l'interprétation des données ajoutant ainsi un niveau supplémentaire de difficulté (276, 277). Malgré ces limitations, des informations importantes ont découlées d'analyses protéomiques associées à la caractérisation de microparticules associées à l'homéostasie vasculaire. Malgré que ces microparticules fissent pendant bien longtemps associées à de simples débris cellulaires, l'ère des 'omics' leur ont permis de se forger une place importante dans la compréhension de l'homéostasie vasculaire. À l'aide d'analyses fonctionnelles, ces microparticules ont été caractérisées à titre de déterminants dans l'homéostasie, l'inflammation, la thrombose, le transfert

de protéines de surface et l'angiogénèse (278). Sur ce, je vous dis que l'étude des sécrétomes issus des cellules endothéliales est grandement attendue dans le monde de la vasculomique! (262).

Problématique

L'immunosuppression a permis d'améliorer l'incidence du rejet aigu sans toutefois améliorer significativement le rejet chronique. Par conséquent, malgré que la réponse immunitaire de l'hôte envers le greffon soit importante, cet aspect ne semble pas être le seul facteur influençant la survie du greffon à long terme. L'apoptose endothéliale semble toutefois très importante dans l'initiation de la vasculopathie du greffon (VG) caractérisant, avec la fibrose, le rejet chronique.

Hypothèse

Compte tenu que l'inhibition de l'apoptose endothéliale bloque le développement de la VG *in vivo*, notre hypothèse de travail reposait sur les répercussions paracrines de l'apoptose endothéliale sur les types cellulaires participant au remodelage vasculaire. Le laboratoire du Dre Marie-Josée Hébert a antérieurement démontré que les cellules endothéliales apoptotiques génèrent un ensemble de facteurs ayant des propriétés anti-apoptotiques et fibrogéniques sur les composantes du mur vasculaire, récapitulant ainsi des phénotypes associés aux CML et aux fibroblastes durant le remodelage vasculaire. En collaboration avec le laboratoire du Dr Alexey Pshezhetsky, leur travail a permis d'identifier un fragment de la MEC, le LG3, généré durant l'apoptose endothéliale et induisant une activité biologique sur les CML. Toutefois, le LG3 a une activité biologique partielle comparativement au sécrétome complet libéré durant l'apoptose endothéliale, suggérant l'existence d'autres médiateurs anti-apoptotiques. De plus, les facteurs fibrogéniques responsables de la différenciation myofibroblastiques *in vitro* n'ont pas été caractérisés.

Objectifs

1. Caractériser biochimiquement l'apoptose endothéliale *in vitro* (notre modèle d'étude) suivant une déprivation de facteur de croissance;
2. Caractériser les médiateurs générés durant l'apoptose endothéliale par une approche protéomique multidimensionnelle et comparative. Les médiateurs sont sélectionnés selon différents critères et selon leur appartenance aux fonctions associées au remodelage vasculaire incluant 1) les composantes de la MEC et les protéases associées à la dégradation de la MEC; 2) des facteurs anti-apoptotiques et 3) des facteurs fibrogéniques connus;
3. Caractériser les mécanismes associés à la machinerie apoptotique régulant l'export extracellulaire de ces médiateurs;

4. Caractériser l'aspect fonctionnel de ces médiateurs sur les composantes cellulaires du mur vasculaire.

Article principal

Titre : Caspase-3-Dependent Export of TCTP: A Novel Pathway for Anti-Apoptotic Intercellular Communication

Auteurs : Isabelle Sirois, Marc-André Raymond, Nathalie Brassard, Jean-François Cailhier, Michael Fedjaev, Katia Hamelin, Irene Londono, Moise Bendayan, Alexey V. Pshezhetsky, Marie-Josée Hébert

Article publié dans : Cell Death and Differentiation, 22 octobre 2010, DOI : cdd2010126 [pii] 10.1038/cdd.2010.126

Contribution des auteurs :

Isabelle Sirois : auteur principal ayant élaboré les hypothèses de travail et les expériences et ayant contribué majoritairement avec Marie-Josée Hébert à la rédaction du manuscrit. Ce manuscrit représente le cœur de ses travaux de thèse.

Marc-André Raymond : co-auteur ayant participé à générer des données relatives à la caractérisation de l'apoptose endothéliale et à la standardisation de la génération du milieu conditionné par les cellules endothéliales apoptotiques.

Nathalie Brassard: co-auteur ayant généré des données relatives à la présence de TCTP dans le milieu conditionné par les cellules endothéliales apoptotiques ainsi que plusieurs analyses d'immunobuvardage; a participé à la culture cellulaire et à la correction du manuscrit.

Jean-François Cailhier: co-auteur ayant effectué les analyses de cytométrie en flux; participation à la culture cellulaire, aux immunobuvardages et à la correction du manuscrit.

Michael Fedjaev: co-auteur ayant participé aux analyses protéomiques et à l'enseignement du monde de la protéomique selon le point de vue d'un chimiste organicien.

Katia Hamelin: co-auteur ayant fait les expériences fonctionnelles de TCTP ainsi que les expériences relatives à l'activité de la caspase-3 sur TCTP.

Irene Londono: co-auteur ayant élaboré les expériences de morphométrie et de quantification des cellules endothéliales à l'aide de la microscopie électronique.

Moise Bendayan: co-auteur et collaborateur ayant dirigé et analysé les résultats de microscopie électronique.

Alexey V. Pshezhetsky: Directeur de thèse, co-auteur et collaborateur; nous a ouvert et guidé dans son laboratoire de protéomique afin d'identifier le sécrétome des cellules endothéliales apoptotiques.

Marie-Josée Hébert: Directeur de thèse et investigateur principal. A dirigé et supervisé l'ensemble de ce projet de la génération d'hypothèses à la rédaction du manuscrit.

Abstract

The apoptotic program incorporates a paracrine component of importance in fostering tissue repair at sites of apoptotic cell deletion. As this paracrine pathway likely bears special importance in maladaptive intercellular communication leading to vascular remodelling, we aimed at further defining the mediators produced by apoptotic endothelial cells (EC), using comparative and functional proteomics. Apoptotic EC were found to release nanovesicles displaying ultrastructural characteristics, protein markers and functional activity that differed from apoptotic blebs. Tumor susceptibility gene 101 and translationally-controlled tumor protein (TCTP) were identified in nanovesicle fractions purified from medium conditioned by apoptotic EC and absent from purified apoptotic blebs. Immunogold labelling identified TCTP on the surface of nanovesicles purified from medium conditioned by apoptotic EC and within multivesicular blebs in apoptotic EC. These nanovesicles induced an extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2)-dependent anti-apoptotic phenotype in vascular smooth muscle cells (VSMC) whereas apoptotic blebs did not display anti-apoptotic activity on VSMC. Caspase-3 biochemical inhibition and caspase-3 RNA interference in EC submitted to a pro-apoptotic stimulus inhibited the release of nanovesicles. Also, TCTP siRNAs in EC attenuated the anti-apoptotic activity of purified nanovesicles on VSMC. Collectively, these results identify TCTP-bearing nanovesicles as a novel component of the paracrine apoptotic program of potential importance in vascular repair.

Key words: apoptosis, exosomes, nanovesicles, apoptotic blebs.

Introduction

Although classically considered a "silent" process, apoptotic cells are known to actively release paracrine mediators that, in turn, control the phagocytosis of apoptotic cells. For example, apoptotic cells release lysophosphatidylcholine, which favours the recruitment of professional phagocytes and the clearance of apoptotic cells (279). They also secrete lactoferrin as a means of promoting the migration of mononuclear leukocytes while inhibiting the migration of polymorphonuclear leukocytes (280). Recent results suggest that this paracrine response also aims at fostering tissue remodelling and repair. A C-terminal fragment of perlecan (LG3), released as a consequence of cathepsin L translocation from apoptotic endothelial cells (EC), induces Bcl-xL upregulation and resistance to apoptosis in fibroblasts, mesenchymal stem cells and smooth muscle cells, all of which are pivotal to tissue or vascular remodelling and repair (281-285). Recently, we showed that caspase-3 activation in EC favours the release of connective tissue

growth factor (CTGF) (286) which induces the differentiation of fibroblasts into myofibroblasts, a mandatory process in all forms of repair. To date, caspase-3 activation has been implicated in the release of most, if not all, mediators secreted by apoptotic cells (279, 280, 284, 286), suggesting that the paracrine response is embedded within the effector phase of apoptosis.

Dysregulation of apoptosis within cellular constituents of the vessel wall is pivotal to most forms of pathological vascular remodelling. Chronic transplant vasculopathy, systemic sclerosis and classical atherosclerosis are all characterized by the enhanced apoptosis of EC and decreased apoptosis of neointimal cells (29, 71). Neointima formation develops initially through the acquisition of a synthetic and anti-apoptotic phenotype in neointimal cells associated with extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2) activation and Bcl-xl overexpression (77, 287, 288). Mediators produced by apoptotic EC, such as LG3 and CTGF, actively induce ERK 1/2- and/or Bcl-xl-dependent anti-apoptotic phenotypes in VSMC, mesenchymal stem cells and myofibroblasts (281-286). This raises the possibility that a chronic increase in EC apoptosis, resulting in a sustained paracrine response, could contribute to maladaptive vascular repair. Here, we aim at further characterizing the molecular paracrine signals released by apoptotic EC with a specific focus on proteins of importance in fostering a neointimal phenotype in VSMC. We used comparative and functional proteomics to identify novel anti-apoptotic mediators released by apoptotic EC through caspase-dependent pathways.

Results

Serum starvation (SS) induces a pure apoptotic response in EC

To study the secretome of apoptotic EC, human umbilical vein EC (HUVEC) were rendered apoptotic in vitro by SS for 4 h, as reported previously (281-286). In serum-starved EC, the percentage of cells with chromatin condensation in absence of cell membrane permeabilization increased over time suggesting increased apoptosis (Fig. 1a). The absence of lactate dehydrogenase (LDH) release in serum starved EC was also consistent with absence of cell membrane permeabilization (Fig. 1b). Loss of mitochondrial integrity was evident after 2 h of SS (Fig. 1c) with concomitant activation of caspase-9 and caspase-3 and polyADP-ribose) polymerase (PARP) *cleavage* (Fig. 1d and 1e). Pre-incubating EC with the pan-caspase inhibitor ZVAD-FMK or with inhibitors of caspase-3 and caspase-9 (DEVD-FMK and LEHD-FMK respectively), before SS effectively blocked caspase(s) activation, PARP cleavage and chromatin condensation (Fig. 1d-g). Cell membrane permeabilization, suggestive of necrosis, was not significantly modulated by ZVAD-FMK, DEVD-FMK or LEHD-FMK compared to the vehicle (dimethylsulfoxide, DMSO) (Fig. 1g). Finally, as expected, pan-caspase inhibition in serum-starved EC did not prevent mitochondrial

permeabilization (Fig. 1c) and did not modulate p53 protein levels (Fig. 1h). Collectively, these results demonstrate a pure intrinsic apoptotic response in serum-starved EC.

Characterization of the secretome of apoptotic EC

Serum-free media conditioned by apoptotic and non-apoptotic EC (SSC-Apo and SSC-No-Apo respectively) were generated by exposing equal EC numbers to either vehicle (DMSO) or ZVAD-FMK for 2 h, followed by medium change and SS for 4 h, as described above and in Figure 2a. Proteins secreted by apoptotic EC downstream of caspase(s) activation were studied through comparison of equal amounts of proteins precipitated from equal volumes of conditioned media cleared of apoptotic blebs and confirmed by flow cytometry analysis (Fig. 2b). Proteins from SSC-Apo and SSC-No-Apo were analyzed comparatively, by either 2-dimension-liquid chromatography tandem mass spectrometry (2D-LC-MS/MS) (Fig. 2c) or SDS-PAGE LC-MS/MS (289) (Fig. 2d). The latter revealed a distinct pattern of Coomassie Blue protein staining in SSC-Apo compared to SSC-No-Apo. These results are in keeping with our previous work describing increased protein secretion downstream of caspase(s) activation by apoptotic EC (284). Concomitantly, SSC-Apo was fractionated by fast protein liquid chromatography (FPLC), and the anti-apoptotic activity of each fraction was evaluated on VSMC (281). The protein mediators present in fractions with significant anti-apoptotic activity were further characterized by SDS-PAGE LC-MS/MS.

To be considered a specific component of the apoptotic secretome, a protein identified by multifaceted screening had to meet the following criteria: 1) it had to be identified by at least 2 out of the 3 different MS/MS approaches, 2) it had to be found exclusively in SSC-Apo, and 3) it had to be of human origin. Among the 27 proteins meeting the screening criteria (Table 1), only 11 had known secretion signals and 10 had been previously reported as components of exosomal nanovesicles (Table 1). To evaluate whether proteins known to be secreted through nanovesicles were over-represented in SSC-Apo compared to SSC-No-Apo, the proteomics data were re-analyzed in search of classical nanovesicle (exosome and exosome-like) markers identified at least once by any proteomics strategies in either SSC-Apo or SSC-No-Apo. In addition to the proteins listed in Table 1, 12 exosomal proteins were identified solely in SSC-Apo, including the 2 highly characteristic exosomal markers Alix and CD63 (290), whereas only 2 exosomal proteins were found exclusively in SSC-No-Apo (Table 2). These results suggested increased release of nanovesicles by apoptotic EC downstream of caspase(s) activation.

Caspase(s) activation in apoptotic EC fosters the release of anti-apoptotic exosome-like nanovesicles

To determine whether apoptosis specifically increases the release of nanovesicle biomarkers over other proteins, levels of Grp96, an endoplasmic reticulum resident protein, and tubulin, a microtubule-associated protein, were evaluated in intracellular protein extracts and corresponding supernatants of serum-starved EC. Grp96 and tubulin intracellular protein levels were stable throughout SS (Fig. 3a). Grp96 and tubulin were not recovered in medium conditioned by serum-starved apoptotic EC (Fig. 3a), ruling out the possibility of unspecific protein leakage. These results are in keeping with the absence of cell membrane permeabilization in serum-starved EC (Fig. 1a-b). However, protein levels of tumor susceptibility gene 101 (TSG 101) and translationally-controlled tumor protein (TCTP), 2 classical markers of exosomal nanovesicles (290-293), increased over time in media conditioned by serum-starved EC (Fig. 3a).

To specifically address the importance of caspase(s) activation in the production of exosomes or exosome-like nanovesicles by apoptotic EC, protein levels of the exosomal marker TCTP were compared in equal volumes of SSC-Apo and SSC-No-Apo conditioned by equal EC numbers (Fig. 3b). Elevated TCTP levels were evident in total un-fractionated conditioned medium (Total) and in nanovesicle extracts (Exo) of SSC-Apo compared to SSC-No-Apo. Ponceau Red staining confirmed augmented protein content in the nanovesicle fraction of SSC-Apo compared to SSC-No-Apo (Fig. 3b). In nanovesicle-free supernatant (SN), the TCTP signal was recovered at similar levels in SSC-Apo and SSC-No-Apo (Fig. 3b). In SSC-Apo, TCTP was detectable at different molecular weights (approximately 23, 50 and 75 kDa) in media conditioned by serum-starved EC (Fig. 3a-c in agreement with the SDS-PAGE LC-MS/MS results where TCTP sequences were identified from 2 bands (Fig. 2d*). High molecular weight bands likely represent oligomeric forms of TCTP, as reported previously (294, 295), since the addition of a strong reducing agent (TCEP) to SSC-Apo prior to protein separation decreased the intensity of high molecular weight forms and increased the intensity of the 23-kDa band (Fig. 3c, middle and left panels). Also, electrophoresis of recombinant TCTP demonstrated the presence of high molecular weight bands (Fig. 3c, right panel), indicating dimerization. Of note, recombinant-TCTP contains a GST-tag therefore explaining the higher molecular weights of monomeric and oligomeric forms. Known sequences of importance in TCTP oligomerization (294) were present within recombinant TCTP. Collectively, these results confirmed that caspase(s) activation in EC enhances the secretion of the nanovesicle marker TCTP.

To confirm the increased release of nanovesicles by apoptotic EC, ultrastructural studies were performed on nanovesicle fractions isolated from SSC-Apo (Fig. 3d). Immunogold-labelling revealed the presence of TCTP on nanovesicles of 30-100 nm released by apoptotic EC (Fig. 3d) and within multivesicular bodies (MVB) in apoptotic EC (Supplementary Fig. S1a). Morphometric quantification of MVB-like structures in apoptotic and non-apoptotic EC demonstrated a 7-fold increase in the volume density of MVB-like structures within apoptotic EC (Supplementary Fig. S1b). These data suggested that TCTP-bearing nanovesicles produced by apoptotic EC originated, at least in part, from MVB, consistent with the classical pathways of exosomal nanovesicle formation.

Exosome-like nanovesicles released by apoptotic EC have an anti-apoptotic function

We then evaluated whether exosome-like nanovesicles participate in the anti-apoptotic activity of the endothelial apoptotic secretome. Equal volumes of SSC-Apo and SSC-No-Apo were ultracentrifuged, supernatants were collected, and exosomal pellets were re-suspended in the initial volume of serum-free medium. Total un-fractionated SSC-Apo and the corresponding supernatant and exosomal fraction significantly inhibited VSMC apoptosis compared to an equal volume of SSC-No-Apo (Fig. 3e and Supplementary Fig. S1c).

We also considered the possibility that exosome-like nanovesicles produced by apoptotic EC represent unusually small apoptotic blebs. In that event, the functional activity of apoptotic blebs and exosome-like nanovesicles should be similar. Apoptotic blebs were purified by centrifugation from SSC-Apo, and depletion was confirmed by flow cytometry (Fig. 2b). VSMC exposed to un-fractionated SSC-Apo (Total) or to nanovesicle fractions re-suspended in the initial volume of serum-free medium mounted a significant anti-apoptotic response as compared to SSC-No-Apo (Fig. 3e). However, VSMC exposed to apoptotic blebs re-suspended in the initial volume of serum-free medium failed to develop an anti-apoptotic response whereas VSMC exposed to SSC-Apo depleted of apoptotic blebs did so (Fig. 3f). Also, TCTP and TSG 101 levels were undetectable in apoptotic blebs isolated from SSC-Apo whereas both markers were enriched in the nanovesicle fraction (Fig. 3g). These results confirmed that apoptotic blebs and exosome-like nanovesicles produced by apoptotic EC represent 2 distinct entities, with different protein composition and function.

TCTP is a novel anti-apoptotic component of the apoptotic secretome

We then sought to identify specific protein(s) involved in the anti-apoptotic activity of exosome-like nanovesicles released by apoptotic EC. Three proteins known to be secreted through nanovesicles

were identified concomitantly through functional (anti-apoptotic) and comparative proteomics strategies (Table 1). Among these, TCTP appeared to be the most likely anti-apoptotic candidate since it has known anti-apoptotic activity in a number of cell types. Small interfering RNAs (siRNAs) were used to silence TCTP expression in EC with the aim of reducing the release of TCTP-bearing nanovesicles by apoptotic EC. TCTP-silencing reduced intracellular TCTP levels and inhibited TCTP release in nanovesicle extracts (Fig. 4a) but did not modulate the apoptosis of serum-starved EC (Fig. 4b). TCTP-silenced EC or control EC were employed to condition equal volumes of serum-free media. Un-fractionated SSC-Apo generated by TCTP-silenced EC (SSC siRNA TCTP) or its corresponding nanovesicle fraction failed to inhibit VSMC apoptosis whereas control SSC-Apo (SSC siRNA Ctrl) or its corresponding nanovesicle fraction did so (Fig. 4c). There was, however, no difference in the anti-apoptotic activity of nanovesicle-free supernatants conditioned by serum-starved, TCTP-silenced and control EC (Fig. 4c).

Since ERK 1/2 activation is a characteristic feature of the anti-apoptotic phenotype of neointimal cells, we evaluated whether TCTP induced ERK 1/2-dependent anti-apoptotic pathways in VSMC. VSMC exposed to medium conditioned by siRNA TCTP (un-fractionated and exosomal fraction) showed reduced ERK 1/2 phosphorylation in comparison to their respective controls (SSC siRNA Ctrl) (Fig. 4c, lower panel). ERK 1/2 phosphorylation was similar in VSMC exposed to supernatants derived from media conditioned by TCTP-silenced or control EC. In addition, serum-starved VSMC exposed to recombinant TCTP (which included peptides identified by in-gel LC-MS/MS, Supplementary Fig. S1d) manifested dose-dependent inhibition of apoptosis (Fig. 4d) in association with increased ERK 1/2 activation (Fig. 4e). The concentration of TCTP released by apoptotic EC in SSC-Apo was within the bioactive range (Supplementary Fig. S1e). Inhibition of ERK 1/2 activation in VSMC with PD98059 blocked the anti-apoptotic activity of recombinant TCTP (Fig. 4f). Collectively, these results establish the importance of TCTP in the activation of an ERK 1/2-dependent anti-apoptotic response in VSMC.

Increased TCTP export is characteristic of apoptotic cell death

To evaluate if TCTP release by apoptotic cells was specific to EC, VSMC were serum-starved in the presence of ZVAD-FMK or vehicle (DMSO). SS induced an apoptotic response in VSMC, which was blocked in the presence of ZVAD-FMK (Supplementary Fig. S1f). Elevated TCTP levels were found in medium conditioned by apoptotic VSMC, compared to an equal volume of medium conditioned in the presence of ZVAD-FMK (Supplementary Information Fig. S1f, lower panel). These data suggest that caspase activation favours TCTP export in different cell types.

Since nutrient deprivation is a potent autophagic stimulus, we also considered the possibility that autophagy could contribute to TCTP export. EC exposed to rapamycin, a specific inhibitor of mammalian target of rapamycin (mTOR) showed characteristic autophagic features as evaluated by acridine orange staining (Fig. 5a), LC3 processing and electron microscopy (Figure 5c) in absence of apoptotic features as evaluated with Ho-Pi staining (Fig. 5a) and PARP cleavage (Fig. 5b). EC exposed to rapamycin failed to increase TCTP release (Fig 5d). Treatment with mitomycin C (MMC), another pro-apoptotic stimulus, increased the percentage of cells with chromatin condensation (Fig. 5a), PARP cleavage (Fig. 5b) and TCTP release (Figure 5d). These results point to the activation of specific apoptosis-associated caspase(s) as a novel pathway regulating TCTP export.

Activated caspase-3 is a novel regulator of TCTP export

In serum-starved EC, TCTP export is initiated (Fig. 6a) concomitantly with caspase-3 activation (Fig. 1d). Biochemical pan-caspase inhibition or specific caspase-3 inhibition in serum-starved EC (pre-incubation with ZVAD-FMK or DEVD-FMK, respectively) concomitantly inhibited EC apoptosis (Fig. 1g) and the release of anti-apoptotic mediators active on VSMC (Fig. 6b). In addition, TCTP levels were reduced in nanovesicle extracts from medium conditioned by serum-starved EC pre-incubated with DEVD-FMK, an irreversible caspase-3 inhibitor, compared to medium conditioned by apoptotic serum-starved EC (Fig. 6c).

To further address the importance of caspase-3 activation in TCTP export (and potential off target effects of biochemical caspase inhibitors), siRNAs were used to silence caspase-3 expression in EC. Caspase-3 silencing significantly inhibited the apoptosis of serum-starved EC compared to EC transfected with control siRNAs (Fig. 6d-e). In turn, VSMC exposed to medium conditioned by caspase-3-silenced EC (SSC siRNA C3) failed to mount an anti-apoptotic response, whereas VSMC exposed to medium conditioned by control apoptotic EC (SSC siRNA Ctrl) developed an anti-apoptotic phenotype (Fig. 6f). TCTP levels were lower in un-fractionated conditioned medium (Total) and in the nanovesicle fraction (Exo) of medium conditioned by caspase-3-silenced EC (SSC siRNA C3) compared to control apoptotic EC (SSC siRNA Ctrl) (Fig. 6g). Finally, we evaluated whether activated caspase-3 could directly cleave TCTP. Recombinant caspase-3 did not show any proteolytic activity toward recombinant TCTP *in vitro* but did cleave its known substrate PARP (Fig. 6h). Also, total and nanovesicle fractions of SSC-Apo failed to show bands lower than the expected 23 kDa, ruling out a contribution of TCTP proteolysis. Collectively, these results demonstrate a key role for caspase-3 activation in the release of TCTP by apoptotic EC.

Discussion

Apoptotic cells actively release a finely regulated set of “come and eat-me” and “stay-away” paracrine signals aimed at coordinating the specific recruitment of mononuclear phagocytes (279, 280). Recent evidence indicates that the paracrine component of the apoptotic program is not limited to the regulation of leukocyte trafficking but also aims at preparing the local microenvironment for remodelling after cell deletion. The present work lends further support to this contention. Taking a multifaceted proteomics approach, we identified a set of 27 proteins released specifically by apoptotic EC (characterized by increased chromatin condensation and exclusion of PI, loss of mitochondrial integrity and evidence of activated caspase-9 and 3) downstream of caspase activation. Several lines of evidence demonstrated that these proteins are not released as a consequence of cell membrane permeabilization. First, plasma membrane rupture, as evidenced by PI staining, is absent in serum-starved EC, and caspase inhibition does not impact cell membrane permeability. Second, LDH, a classical marker of cell membrane permeabilization, is not increased in medium conditioned by serum-starved apoptotic EC. Finally, the release of proteins by serum-starved EC is a targeted response, since Grp96 and tubulin are not secreted throughout SS while TSG 101 and TCTP are released concomitantly with caspase activation.

Non-classical protein secretion pathways are, at least in part, responsible for the paracrine component of the apoptotic program in EC. Among the 27 proteins identified specifically in medium conditioned by apoptotic EC, more than half do not contain a secretion signal sequence. Also, irrespective of the presence of a secretion signal, more than a third corresponded to typical nanovesicle components. In recent years, the characterization of different types of microparticles and nanovesicles released by live cells has been under intense investigation. Unfortunately, there is yet no widely-accepted classification of the various categories of micro- and nanovesicles. Size, appearance under electron microscopy and intracellular origin are currently key features that differentiate various types of membrane vesicles. Exosomes are small, cup-shaped vesicles of 50-100 nm diameter (290, 296-298). Their precursors are intracellular vesicles packaged into MVB, which fuse with the plasma membrane, releasing exosomal vesicles into the extracellular milieu (290, 296-298). Exosome-like nanovesicles are somewhat smaller (20-50 nm), of irregular shape and probably stem also from endosomal compartments (290). Apoptotic blebs are bigger (50 to 500 nm), of heterogenous shapes and result from budding of the cell membrane (180, 290). The nanovesicles released by apoptotic EC share many characteristics with exosome-like nanovesicles and exosomes. Immunoblotting confirmed elevated levels of the exosomal markers TCTP and TSG

101 in medium conditioned by apoptotic EC. Irregular-shaped nanovesicles of sizes within the range described for exosome-like nanovesicles were demonstrated by electron microscopy in medium conditioned by apoptotic EC. Immunogold labelling confirmed that TCTP was present at the surface of these nanovesicles and within MVB of apoptotic EC.

We nonetheless considered the possibility that nanovesicles released by apoptotic EC could represent small apoptotic blebs. Several lines of evidence suggest that TCTP-expressing nanovesicles differ from apoptotic blebs. First, TCTP and TSG 101 levels are high in nanovesicle fractions but undetectable in apoptotic bleb extracts. Second, histones, previously described as a specific component of apoptotic blebs (290, 296) were not recovered with any of our proteomics strategies (data not shown), further confirming optimal depletion of apoptotic blebs prior to MS/MS analysis. Finally, exosome-like nanovesicles purified from medium conditioned by apoptotic EC trigger an anti-apoptotic phenotype in VSMC whereas apoptotic blebs purified from the same medium do not. These results indicate that over the course of apoptosis at least 2 functionally-different types of vesicles are released: apoptotic blebs and nanovesicles. Whether the latter correspond to the enhanced production of exosome-like nanovesicles normally released by live EC or to a different nanovesicle type specific to the apoptotic program, sharing a common intracellular origin and at least some markers with exosome and exosome-like nanovesicles, will be the scope of future investigation.

Our work identifies activated caspase-3 as a novel regulator of TCTP export through the nanovesicle pathway. p53 is known to regulate TSAP-6 activity, which, in turn, controls exosome production and TCTP release (291-293). Here, increased release of nanovesicle constituents was identified by an unbiased proteomics strategy where media conditioned by caspase-activated or -inactivated EC were compared. Caspase(s) inhibition with ZVAD-FMK impacts the execution phase of apoptosis but does not alter molecular events associated with apoptosis initiation, which includes similar intracellular p53 levels and mitochondrial permeabilization. Hence, p53 cannot be inferred as a regulator of TCTP export in our system. Caspase-3 biochemical inhibition or genetic silencing similarly prevents TCTP export, pointing to a pivotal role for caspase-3 in the release of TCTP-bearing nanovesicles by apoptotic cells.

Several lines of evidence indicate that TCTP plays a functional role in the anti-apoptotic activity of nanovesicles released by apoptotic EC. VSMC exposed to TCTP-expressing nanovesicles show increased resistance to apoptosis and activation of ERK 1/2, therefore recapitulating a neointimal

phenotype (71, 281). TCTP silencing in EC blocks TCTP release and largely decreases both ERK 1/2 activation and resistance to apoptosis in VSMC exposed to nanovesicles produced by apoptotic EC. Finally, recombinant TCTP increases ERK 1/2 activation and inhibits VSMC apoptosis. TCTP is an evolutionarily-conserved protein of crucial importance during development (299) and for intracellular apoptosis inhibition (300). The present work demonstrates that TCTP also displays significant extracellular anti-apoptotic activity. These results are in keeping with recent investigations indicating that extracellular TCTP activates ERK 1/2 in basophils .

The present study highlights novel mechanisms of cross-talk between dying cells and the local microenvironment. Apoptotic cells actively release apoptotic blebs and exosome-like nanovesicles. The latter, through an anti-apoptotic activity on cells of importance in tissue and vascular repair, likely favour remodelling at sites of apoptotic cell deletion. However, a chronic increase in apoptosis could foster sustained activation of the paracrine program, resulting in maladaptive remodelling.

Materials and Methods

Cell culture and generation of conditioned media

HUVEC (Clonetics) were grown in microvascular EC medium (Clonetics) and used at passages 2 to 5. WI-38 human fibroblasts (ATCC) were grown in FBM (Cambrex) with 10% inactivated FBS (Mediatech) and employed at passages 2 to 17. A7R5 cells (VSMC), a clonal rat smooth muscle cell line (ATCC), were cultured in DMEM/F12 with 10% FBS. Serum-free media, conditioned by apoptotic or caspase-inhibited EC, were obtained as described previously (281-286). Equal EC numbers (2.5×10^4 cells/cm²) were pre-incubated for 2 h in normal medium containing either DMSO (vehicle) or ZVAD-FMK (100 μ M) or DEVD-FMK (100 μ M) (R&D Systems) for caspase(s) inhibition. Then, the culture medium was changed for serum-free medium RPMI (Gibco) and EC were serum-starved for 4 h.

Characterization of the secretome produced by apoptotic EC

We adopted 2 comparative proteomics approaches to identify the secretome released by apoptotic EC: 2D-LC-MS/MS and SDS-PAGE LC-MS/MS (289). Serum-free media (0.16 ml/cm²) conditioned by apoptotic (SSC-Apo) and non-apoptotic EC pre-incubated with ZVAD-FMK (SSC-No-Apo) were centrifuged sequentially at 1200 g and 50,000 g to eliminate cell debris and apoptotic blebs and depletion was confirmed by flow cytometry (FACScan equipped with CellFit software, Becton-Dickinson) in FL1 and FL2 channels. We also performed a functional analysis of SSC-Apo. 750 ml of medium conditioned by apoptotic EC were fractionated by FPLC, and each fraction was tested for

anti-apoptotic activity on VSMC (281). The anti-apoptotic fraction was resolved by SDS-PAGE, and the bands were sequenced with LC-MS/MS.

For 2D-LC-MS/MS analysis, 40 ml of conditioned media cleared of cell debris and apoptotic blebs were concentrated (0.5 mg of proteins) and solubilized in 100 μ l of 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 7.5 M urea, 2.0 M thiourea, reduced in the presence of 6 mM DTT, alkylated with 15 mM iodoacetamide, and digested overnight with trypsin (Promega, sequencing grade, estimated trypsin/protein ratio 1:100). The tryptic peptides were re-suspended in 55% acetonitrile, 25% dimethylformamide and labelled with pentafluorophenyl-4-anilino-4-oxobutanoate-*d*₀ or pentafluorophenyl-4-anilino-4-oxobutanoate-*d*₅. Labelled samples were combined, desalted, evaporated to dryness, re-suspended in 10% acetonitrile containing 10 mM ammonium acetate, pH 7.0, and analyzed by weak anion exchange chromatography in a PolyWAX column (100 x 1 mm, 5 μ m, 300 Å; PolyLC Inc.) connected to an Agilent 1100 Series LC system. Peptides were eluted by a gradient of 0 to 1 M NaCl in 10 mM ammonium acetate, pH 6.0, containing 10% acetonitrile, at a flow rate of 20 μ l/min. 36 fractions of 80 μ l were collected and acidified with formic acid. 30 μ l from each fraction were analyzed by LC-MS/MS.

SDS-PAGE LC-MS/MS analysis was performed essentially as outlined elsewhere (289). Proteins (125 μ g) were solubilized in 4X Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 2% SDS, 0.5% (w/v) bromophenol blue), reduced in the presence of 4 mM DTT for 1 h at room temperature, and then alkylated with 10 mM phenylmaleimide for 1 h at room temperature. 125 μ g of total protein from each sample were separated by SDS-PAGE on 15% acrylamide gel, which was stained with Coomassie blue. Each lane was cut into 20 slices and treated with trypsin (Promega). Tryptic peptides were extracted with 60% acetonitrile and 0.1% formic acid, evaporated to dryness, and re-suspended in 25 μ l of 3% acetonitrile and 0.1% formic acid.

Peptide digests were analyzed in duplicate by LC-MS/MS consisting of an Agilent 1100 Series nanoflow liquid chromatography system and a 1100 Series LC/MSD-Trap-SL ion trap mass spectrometer (Agilent Technologies). The peptides were enriched in a Zorbax 300SB-C18 trap column (5 μ m, 5 x 0.3 mm) and separated by reverse phase chromatography in a Zorbax 300SB-C18 analytical column (3.5 μ m, 150 x 0.075 mm) with a gradient of 5-90% acetonitrile in 0.1% formic acid at a flow rate of 300 nl/min. The acquisition parameters were as follows: a) positive mode, b) scan range from 400 to 2,200 Da, c) "trap drive" of 90, d) maximum 3 MS/MS per cycle, e) preferred charge state of +2, f) active exclusion after 2 spectra for 1 min, and g) scan speed of 13,000 m/zxsec⁻¹. Spectra were recorded in profile mode.

The mass spectra were interpreted and quantified by Spectrum Mill software (Rev. A.03.02.060a, Agilent Technologies). Using a "Data Extractor" module of the program, the MS/MS

spectra were: a) converted to a centroid mode based on the area in the top 50% of peak intensity, b) merged by similarity (for 2 spectra to be merged, at least 25 out of their 50 most intensive peaks had to match and the matching peaks had to represent >70% of total spectral intensity) within a time window of ± 40 s and m/z window ± 1.2 Da, and c) filtered by quality (precursor signal to noise ratio >25, sequence tag length >1). For every spectrum, MS intensity was calculated as the area under the extracted chromatogram of ion intensity versus retention time (EIC) employing the same parameters as for merging. "MS/MS search" was performed for the 25 most intensive peaks in every spectrum with the human UniProt database (September 7, 2006 release: <ftp://ftp.expasy.org>).

Immunoblotting and reagents

Protein extracts were separated on 12% SDS-PAGE, as described previously (281-286), and probed with monoclonal antibodies against: pro-caspase-3 (Bio Vision Research Products), activated caspase-3 (Cell Signalling Technology), activated caspase-9 (Calbiochem), TCTP (Santa Cruz Biotechnology), p53 (Santa Cruz Biotechnology), actin (Cedarlane), TSG101 (Abcam), Grp96 (Abcam), tubulin (Oncogene), phospho-ERK 1/2 (New England Biolabs), ERK2 (Santa Cruz Biotechnology), PARP (Cell Signaling) and LC-3 (Abnova). Protein extracts from the supernatants were TCA-precipitated 9:1, washed with cold acetone and solubilized in sample buffer. MMC, Rapamycin, TCEP (*tris(2-carboxyethyl)phosphine*) and recombinant PARP were from Sigma. Recombinant GST-TCTP and GST were obtained from Abnova Antibody Innovation. LEHD-FMK was from R&D Systems and PD98059 from Calbiochem. Activated recombinant Caspase-3 was obtained from Enzo Life Sciences.

Fluorescence microscopy for quantitation of cells with chromatin condensation and cell membrane permeabilization

Fluorescence microscopy of unfixed/unpermeabilized adherent cells stained with Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1H-benzimidazole) (HO) and propidium iodide (PI) was undertaken as described previously (3-5). In brief, cells were grown to confluence in 24-well polycarbonate culture plates (Becton-Dickinson). HO (1 μ g/ml) was added for 10 min at 37°C, and the cells were washed with PBS. PI was added to a final concentration of 5 μ g/ml immediately before fluorescence microscopy analysis (excitation filter I = 360-425 nm). The percentages of normal, apoptotic and necrotic cells adherent to the dishes were estimated by an investigator blinded to the experimental conditions. Apoptotic cells will show increased HO fluorescence in absence of PI positivity. Secondary and primary necrotic cells show PI positivity.

Mitochondrial permeability assessment

Loss of mitochondrial permeability of EC was assessed by JC-1 (Molecular Probes, Invitrogen) staining and flow cytometry (301). Cells were incubated with JC-1 (10 μ g/ml) for 15 min, harvested by trypsinization and washed twice with cold PBS. Loss of mitochondrial permeability is indicated by shifting in fluorescence emission from green to red, which was evaluated by flow cytometry (Coulter EPICS XL-MLC flow cytometer) in FL1 and FL2 channels. 10,000 events per sample were acquired and the results expressed as fold increase of EC with loss of mitochondrial permeability relative to control EC exposed to normal medium for 4 h (percentage of experimental cells with red fluorescence/percentage of control cells with red fluorescence).

LDH release assay

LDH release was analyzed by Cyto Tox 96 non-radioactive cytotoxicity assay (Promega), as described by the manufacturer. The results are expressed as the percentage of absorbance at 490 nm of experimental conditions vs absorbance at 490 nm of the positive control for necrosis (heating).

Acridine orange staining

Acidic vesicular organelles, which correlate with autophagic activity, were assessed as described previously (302). In acridine orange-stained cells, the cytoplasm and nucleolus fluoresce bright green and dim red, whereas acidic compartments fluoresce bright red, evaluated by fluorescence microscopy (excitation filter 1 = 525-625 nm).

Purification of nanovesicles by differential centrifugation

Nanovesicles were prepared from HUVEC and VSMC supernatants by differential centrifugation, as outlined elsewhere (303) with some modifications. Conditioned media were centrifuged sequentially at 1,200 x g for 20 min to remove cell debris, 50,000 x g for 15 min to eliminate apoptotic blebs, and at 100,000 x g for 18 h (Beckman SW-41 Ti rotor) to purify the exosomal fraction. For Western blot analysis, exosomes were harvested in phosphate buffer (0.1 M), precipitated with TCA 9:1, washed with cold acetone and solubilized in SDS-PAGE sample buffer (Bio Rad).

Electron microscopy

For immunogold labelling, nanovesicles isolated as above were adsorbed on parlodium-carbon-coated electron microscopy grids and fixed with 4% paraformaldehyde. After washing, the grids were floated on ovalbumin 1% for 5 min and anti-TCTP antibody (1/20 dil.) for 2 h at room temperature, washed with PBS, transferred to protein A-gold (10 nm), washed with PBS and MilliQ

water, and dried. Uranyl acetate and phospho-tungstic acid-negative staining was undertaken, and images were recorded with a Phillips 410 transmission electron microscope. HUVEC were fixed with paraformaldehyde lysine-periodate, dehydrated in increasing methanol solutions and embedded in Lowicryl K4M (Canemco) at -20°C. For immunocytochemical detection of TCTP, ultrathin sections were incubated in saturated sodium metaperiodate for 8 min, washed with MilliQ water, quenched with ovalbumin 1%, and labeled with anti-TCTP (1/10 dil.) for 4 h at room temperature, followed by protein A-gold (5 or 10 nm). The tissues were stained with uranyl acetate and lead citrate (304). For quantification of volume density of MVB and autophagosomes, EC were fixed in glutaraldehyde, postfixed in osmium tetroxide and embedded in Epon. Electron micrograph fields of the cell cytoplasm were recorded at x7000 and enlarged at x21000. The volume density of the multivesicular bodies and the autophagosomes was evaluated in relation to the cell cytoplasm (nuclei were not included in the evaluation) by direct planimetry using the Zeiss Videopan software (MVB area/cell area μm^2).

Caspase-3 and TCTP silencing

EC were grown in 6- and 24-well plates until 90% confluence per well. Transfection was performed with Oligofectamine (Invitrogen Life Technologies) using ON-TARGET plus SMART pool (Dharmacon) for caspase-3, TCTP and control siRNA's. SiRNAs were used at a final concentration of 50 nM (caspase-3) and 200 nM (TCTP) of annealed oligo for 16 h, changed in normal medium for 72 h (caspase-3) and 48 h (TCTP) and serum-starved for 4 h.

Statistical analysis

The data, expressed as mean \pm SEM, were analyzed by Student's *T*-test (with Bonferroni correction when appropriate) or ANOVA, as appropriate.

Acknowledgements

This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research to MJH (MOP-15447) and the Canadian Institutes of Health Research to AVP (MOP-66980). MJH is the holder of the Shire Chair in Nephrology, Transplantation and Renal Regeneration of the University of Montreal. IS is the recipient of a training fellowship from the Canadian Institutes of Health Research. JFC is a FRSQ scholar. We thank the J.-L. Lévesque Foundation for renewed support, Nicolas Parent for help with JC-1 staining assay, and D. Gingras for processing cells for electron microscopy.

Abbreviations

2D-LC-MS/MS: 2-dimension liquid chromatography and tandem mass spectrometry CTGF: connective tissue growth factor; DMSO: dimethylsulfoxide; EC: endothelial cells; ERK 1/2: extracellular signal-regulated kinases 1/2; FPLC: fast protein liquid chromatography; HO: Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1H-benzimidazole; HUVEC: human umbilical vascular endothelial cells; LDH: lactate dehydrogenase; LG3: C-terminal fragment of perlecan; MMC: mitomycin C; MVB: multivesicular bodies; PARP: *poly* (ADP-ribose) polymerase; PI: propidium iodide; HO: Hoescht; SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; siRNAs: small interfering RNAs; SN: exosome-free supernatant; SS: serum starvation; SSC: serum-free media conditioned by endothelial cells; TCTP: translationally-controlled tumor protein; TSG 101: tumor susceptibility gene 101; VSMC: vascular smooth muscle cells; LC3: Microtubule-Associated proteins 1A AND 1B, Light chain 3; mTOR: mammalian target of rapamycin.

Table 1. List of proteins identified exclusively in SSC-Apo by 2 distinct LC-MS/MS approaches. Protein name and gene name were obtained from <http://ca.expasy.org/sprot/>. Information on secretion signal sequence was obtained from SPdb, a signal peptide database on the following website: <http://proline.bic.nus.edu.sg/spdb/>. The mode of secretion for each protein was obtained from articles indexed in PubMed. Undescribed denotes proteins for which information concerning their mode of secretion was not described in the literature.

Table 2. List of all other exosomal proteins identified by one proteomic approach. 12 exosomal proteins additional to those listed in table 1 were identified only in SSC-Apo whereas 2 exosomal proteins were identified only in SSC-No-Apo. Proteins were considered as “classically exosome-associated” when reported as exosomal components in at least two independent reports based on recent literature.

Figure 1. Serum starvation induces a pure apoptotic response in EC.

(a) Percentage of cells with increased chromatin condensation and percentage of cells with increased cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in EC exposed to normal medium (N) or serum starvation (SS) for 1 to 4 h. * = $p \leq 0.02$ vs N, n=4. (b) LDH activity in media conditioned by normal EC, EC serum-starved for 4 hours or heated at 65°C for 30 min (positive control for cell membrane permeabilization). * = $p < 1 \times 10^{-6}$ vs heat, n = 3. (c) JC-1 staining for evaluation of mitochondrial permeabilization in EC treated as described in (a) or pre-incubated with the pan-caspase inhibitor (ZVAD-FMK) 100 μ M or vehicle (DMSO) and serum-

starved for 4 h. * = $p \leq 0.02$ vs normal, $n = 6$. **(d)** Immunoblots for active forms of caspase-9 (p25) and caspase-3 (p17-p19) in EC treated as in (c). Representative of 5 experiments. **(e)** Immunoblots for un-cleaved and cleaved PARP in EC treated as in (c-d). Representative of 2 experiments. Ponceau red staining is shown as loading control. **(f)** Immunoblots for active forms of caspase-9 and caspase-3 in EC exposed for 4 h to N or pre-incubated with vehicle (DMSO), 100 μ M of the caspase-9 inhibitor (LEHD) or the caspase-3 inhibitor (DEVD) as in (c-d). Representative of 5 experiments. **(g)** Percentage of cells with increased chromatin condensation and percentage of cells with increased cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in EC as treated in (c). * = $p < 0.05$ vs serum starvation-DMSO, $n \geq 12$. **(h)** Immunoblots for p53 in EC as treated in (c). Representative of 4 experiments. Ponceau Red staining is shown as loading control for (e) and (h).

Figure 2. Characterization of the secretome of apoptotic EC. **(a)** Schematic representation of the experimental strategy for generating serum-free media (conditioned by equal EC numbers in equal volumes of serum-free media) by apoptotic (SSC-Apo) and non-apoptotic EC (SSC-No-Apo). **(b)** Flow cytometry analysis providing evidence of depletion of apoptotic blebs before MS/MS analysis. **(c)** In-solution fractionation (2D-LC-MS/MS) of SSC-Apo and SSC-No-Apo generated as described in (a). Tryptic protein digests (500 μ g) from conditioned media (SSC-Apo and SSC-No-Apo) were fractionated with high performance liquid chromatography into 25 fractions as represented by the chromatograms (O.D. 280 nm in function of elution time). Tryptic digests from fractions 3 to 22 of both samples were submitted individually to peptide sequencing by LC-MS/MS. **(d)** In-gel fractionation of SSC-Apo and SSC-No-Apo generated as described in (a). Serum-free conditioned media were concentrated on a 30-kDa membrane by ultrafiltration. 125 μ g of proteins were separated on 15% SDS-PAGE gel and stained with Coomassie Blue. The gel was cut into 20 pairs of bands, followed by in-gel trypsinization and peptide sequencing by LC-MS/MS. * represents bands corresponding to TCTP.

Figure 3. Caspase(s) activation in apoptotic EC fosters the release of anti-apoptotic exosome-like nanovesicles. **(a)** Immunoblots for TCTP, TSG 101, Grp96 and tubulin in cytosolic (25 μ g) and total protein extracts from equal volumes (1 ml) of total serum-free media (Total SSC) conditioned by equal numbers of EC serum-starved for 1 to 4 h. Ponceau red staining is representative of total protein content. Representative of 3 experiments. **(b)** Immunoblots for TCTP in proteins precipitated from equal volumes of serum-free media conditioned by equal numbers of apoptotic (Apo) and non-apoptotic EC (No-Apo): 1 ml of un-fractionated serum-free conditioned

media (Total SSC); exosome-like nanovesicle fraction (Exo) purified from 12 ml of total serum-free conditioned media; nanovesicle-free supernatant (SN) corresponding to the soluble fraction of ultracentrifuged serum-free conditioned media (12 ml). Representative of 3 experiments. **(c)** Immunoblots for TCTP. *Left panel:* Proteins isolated from 1 ml of SSC-Apo compared to 1 ml of SSC-Apo supplemented with TCEP 10% (SSC-Apo + TCEP) prior to electrophoresis. TCEP decreased the intensity of high molecular weight TCTP and increased the intensity of the non-oligomeric form (Monomer 23 kDa). *Middle panel:* Quantification by densitometry of TCTP oligomers and monomer from 3 immunoblots. * = $p \leq 0.005$ vs. SSC-Apo. *Right panel:* 0.1 μg of GST-tagged recombinant TCTP (37 kDa) showing formation of oligomers. **(d)** Electron micrographs. Exosome-like nanovesicles purified from SSC-Apo (cleared of cell debris and apoptotic blebs). *Left panel:* Immunogold labelling of nanovesicle extracts revealed TCTP antigenic sites on the surface of a nanovesicle. Bar: 25 nm. Uranyl oxalate and methyl cellulose-uranyl acetate negative staining. *Right panel:* Electron micrograph presenting a population of exosome-like nanovesicles positive for TCTP immunogold labelling. Bar: 100 nm. **(e)** Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in VSMC exposed for 24 h to 0.5 ml of: normal medium (N), serum-free medium (SS), un-fractionated serum-free media (Total) conditioned either by apoptotic EC (SSC-Apo) or non-apoptotic EC (SSC-No-Apo), as described in Fig. 2a; exosome-like fraction (Exo) purified from 12 ml of total serum-free conditioned media and re-suspended in 12 ml of RPMI (SS) and the corresponding nanovesicle-free supernatant (SN). * = $p \leq 2.0 \times 10^{-5}$ vs. SSC-Apo, $n \geq 6$. **(f)** Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in VSMC exposed for 24 h to 0.5 ml of: normal medium (N); serum starvation (SS); total serum-free medium conditioned by apoptotic EC (total); supernatant (SSC WO blebs) after removal of apoptotic blebs by centrifugation at 50,000 \times g (12 ml); apoptotic blebs (SS + blebs) purified from 12 ml of total conditioned medium by centrifugation and re-suspended in 12 ml of SS. * = $p \leq 1 \times 10^{-11}$ vs SS, $n = 8$. **(g)** Immunoblots for TCTP and TSG 101 in apoptotic blebs (Blebs) and exosome-like nanovesicle fraction (Exo) isolated from 35 ml of serum-free media conditioned by apoptotic serum-starved EC. The immunoblot for TCTP corresponds to 2 parts of the same gel. Representative of 3 experiments.

Figure 4. TCTP is a novel anti-apoptotic component of the apoptotic secretome.

(a) Equal numbers of EC were transfected with control siRNA (siRNA control) or TCTP siRNA (siRNA TCTP) and serum-starved for 4 h in equal volumes of serum-free media. Immunoblots for TCTP in: 25 μg of cytosolic extracts (Cytosolic); proteins precipitated from 1 ml of un-fractionated

serum-free conditioned media (Total); exosome-like nanovesicle fraction (Exo) purified from 25 ml of total conditioned media. Tubulin is shown as a loading control for cytosolic extracts. Ponceau Red staining indicates total protein content. Representative of 3 experiments. **(b)** Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in EC pre-treated with either control siRNA or TCTP siRNA exposed to normal medium or SS for 4 h. * = $p \leq 0.05$ vs N, $n = 6$. **(c)** Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in VSMC exposed for 24 h to 0.5 ml of: normal medium (N); serum starvation (SS); total un-fractionated serum-free media (Total) conditioned by apoptotic EC transfected with either control siRNA (SSC siRNA Control) or TCTP siRNA (SSC siRNA TCTP); exosome-like nanovesicle fraction (Exo) purified from 12 ml of total un-fractionated serum-free conditioned media and re-suspended in 12 ml of RPMI (SS) or the corresponding nanovesicle-free supernatant (SN). * = $p < 1 \times 10^{-5}$ vs. siRNA control, $n \geq 7$. *Lower panel:* Immunoblots for phosphorylated and total ERK 1/2 in cytosolic extracts (25 μ g) of VSMC exposed for 30 min to normal medium (N), serum starvation (SS), Total, Exo and SN from SSC siRNA control and SSC siRNA TCTP. Immunoblots are representative of 3 experiments. **(d)** Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in VSMC exposed for 24 h to: normal medium (N), serum starvation in RPMI (SS) and recombinant TCTP (0.03 pM to 26.7 nM) re-suspended in RPMI (SS). * $p \leq 0.009$ vs. SS; $n \geq 4$. **(e)** *Upper panel:* Immunoblots for phosphorylated and total ERK 1/2 in cytosolic extracts (25 μ g) of VSMC exposed for 30 min to 0.03 pM and 2.67 nM of recombinant TCTP re-suspended in RPMI (SS). Representative of 3 experiments. *Lower panel:* Quantification by densitometry for the % of ERK 1/2 phosphorylation relative to SS treatment in VSMC. * $p \leq 0.02$ vs. SS; $n = 3$. **(f)** Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in VSMC exposed for 24 h to: normal medium (N), serum starvation in RPMI (SS); recombinant TCTP 26.7 nM re-suspended in RPMI (SS) and vehicle (DMSO) or recombinant TCTP 26.7 nM re-suspended in RPMI (SS) + PD98059 50 μ M. * $p \leq 0.0008$ vs. SS or PD 98059; $n \geq 8$.

Figure 5. TCTP export is specific of apoptotic cell death. **(a)** Quantification of apoptotic and autophagic cells by fluorescence microscopy in HO-PI and acridine orange-stained EC exposed to: MMC, 0.01 mg/ml in normal medium or vehicle in normal medium for 24 h; rapamycin 0.1 μ g/ml in normal medium or vehicle in normal medium for 4 h. Apoptosis refers to the percentage of cells with

increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining). Autophagy referred to the % of cells with increased formation of cytoplasmic vacuolization as assessed by acridine orange staining. * $p = 1 \times 10^{-6}$ vs vehicle (24 h), $n = 3$. ** $p = 1 \times 10^{-6}$ vs vehicle (4 h), $n = 6$. **(b)** Immunoblots for PARP in cytosolic extracts of EC treated with rapamycin or MMC as described in (a). **(c)** *Left upper panel:* Immunoblots showing conversion of LC3-1 to LC3-II, in EC treated with rapamycin 0.1 $\mu\text{g/ml}$ or vehicle in normal medium for 4 h. *Electron microscopy for morphological characterization of autophagosomes. Right upper panel:* Quantification of volume density of autophagosomes in EC treated with rapamycin 0.1 $\mu\text{g/ml}$ or vehicle as described in (a). 25 cytoplasmic fields were evaluated for each condition; * $p = 0,017$. *Lower panel:* Three different autophagosomes in rapamycine-treated EC (arrows) used for quantification. Bar=0.5 μm . **(d)** Immunoblots for TCTP in 1ml of total serum- free media (cleared of cell debris and apoptotic blebs) conditioned in equal volumes and by equal numbers of EC exposed to MMC and Rapamycin, as described in (a). Representative of 3 experiments. Ponceau Red are shown as loading control for b and c.

Figure 6. Activated caspase-3 is a novel regulator of TCTP export. **(a)** Immunoblots for TCTP in exosome-like nanovesicle extracts (Exo) purified from 25 ml of total un-fractionated serum-free media conditioned by equal numbers of serum-starved EC in RPMI (SS) for 1 to 4 h. Representative of 3 experiments. **(b)** Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in VSMC exposed for 24 h to 0.5 ml of normal medium (N), serum starvation with 0.5 ml of RPMI (SS), total serum-free media conditioned by equal numbers of apoptotic EC (SSC-DMSO) or non-apoptotic EC pre-incubated with either the caspase-3 inhibitor DEVD-FMK (SSC-DEVD) or the pan-caspase inhibitor ZVAD-FMK (SSC-ZVAD), as described in Fig. 1E-G. * = $p < 1 \times 10^{-10}$ vs SS, $n \geq 3$. **(c)** Immunoblots for TCTP in exosome-like nanovesicle extracts (Exo) purified from 12 ml of total un-fractionated serum-free media conditioned by equal numbers of EC pre-incubated as in (b) either with vehicle (SSC-DMSO) or the caspase-3 inhibitor DEVD-FMK (SSC-DEVD) and serum-starved for 4 h. Representative of 3 experiments. **(d)** Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in EC exposed for 4 h to 0.5 ml of normal medium (N) or serum starvation with RPMI (SS); or EC transfected with either siRNA control (SS siRNA Ctrl) or siRNA caspase-3 (SS siRNA C3) prior to serum starvation (0.5 ml of SS) for 4 h. * = $p < 0.001$ vs SS-siRNA control, $n = 3$. **(e)** Immunoblots for the pro-form of caspase-3 (p37) in cytosolic extracts (50 μg) of EC transfected with caspase-3 siRNA (C3) or control siRNA (Ctrl) and exposed to normal medium for 4 h.

Representative of 4 experiments. Tubulin is shown as loading control. **(f)** Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in VSMC exposed for 24 h to 0.5 ml of normal medium (N), serum starvation with RPMI (SS), total un-fractionated serum-free media conditioned by EC transfected with either siRNA control (SSC siRNA ctrl) or siRNA C3 (SSC siRNA C3), as described above. * = $p \leq 0.004$ vs SS, $n \geq 3$. **(g)** Immunoblots for TCTP in protein extracts precipitated from equal volumes of serum-free media conditioned by equal EC numbers and transfected with siRNA control (Ctrl) or caspase-3 siRNA (C3) and serum-starved for 4 h; 1 ml of total un-fractionated serum-free media (Total); exosome-like nanovesicle fraction (Exo) purified from 25 ml of conditioned media. Representative of 3 experiments. **(h)** Immunoblots for PARP and TCTP exposed to recombinant activated caspase-3 in vitro. 300 ng (2.6 pmol) of recombinant PARP (left panel) and 270 ng (7.3 pmol) of recombinant TCTP (right panel) were incubated at 37 °C for 1 h with 50 units and 250 units of activated caspase-3. PARP is a known cleavable substrate of activated caspase-3 and was used as a positive control. Representative of 2 experiments.

Legends for Supplementary Figures

Supplementary Figure S1. TCTP is expressed within MVB of apoptotic EC. **(a)** Electron micrographs. EC fixed in PLP and embedded in Lowicryl. Protein A-gold immunolabelling for TCTP. The gold particles (5 nm, arrows) are present within the large MVB. Numerous small vesicles are delineated within these bodies (arrowheads). Bar: 0.25 μm . **(b)** Electron micrographs. *Upper panel:* EC cultured in normal medium or in serum-free medium for 4 hours, fixed in glutaraldehyde, postfixated in osmium tetroxyde and embedded in Epon. The left upper panel (Normal EC) illustrates a small multivesicular body. Bar: 0.25 μm . The right upper panel (Apoptotic EC) demonstrates numerous vesicles in a large MVB. Bar: 0.5 μm . *Lower panel:* morphometrical evaluation of MVB. Electron micrograph fields of the cell cytoplasm were recorded at x7000 and enlarged at x21000. The volume density of the multivesicular bodies was evaluated in relation to the cell cytoplasm (nuclei were not included in the evaluation) by direct planimetry using the Zeiss Videopan software (MVB area/cell area μm^2). 50 cytoplasmic fields were evaluated for each condition, * = $p = 0.001$. The volume density of MVB increases by more than 7 fold during serum starvation. **(c)** Exosome-like nanovesicles secreted by apoptotic EC inhibit apoptosis of VSMC. Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in VSMC grown to confluence in 24 well plates and exposed for 24 hours to 0.5 ml of: normal medium (N); serum starvation in RPMI (SS); un-fractionated serum-

free medium conditioned by apoptotic EC (Total); exosomal fraction (Exo) purified by ultracentrifugation (100 000 x g 18 h) of serum-free medium conditioned by apoptotic EC (12 ml) and resuspended in 12 ml of RPMI (SS); the residual exosome-free supernatant (SN); exosomal fraction and exosome-free supernatant recombined together after ultracentrifugation (SN + Exo). * = $p \leq 1 \times 10^{-5}$ vs. SS, & = $p \leq 1 \times 10^{-5}$ vs. Total, $n \geq 12$. **(d)** Amino acid sequence of human TCTP. The diagram shows the complete amino acid sequence of human TCTP (1-172; <http://www.uniprot.org/uniprot/P13693>, peptides identified by LC-MS/MS denoted by * in Figure 2d (dash lined), amino acid sequence of the partial recombinant TCTP (yellow). **(e)** Quantification by immunoblotting and densitometry of TCTP released in the SSC-Apo using recombinant TCTP for the standard curve. 1 ml of SSC-Apo (performed in triplicate) was TCA-Precipitated followed by immunoblotting for TCTP. Representative of 3 independent experiments. **(f)** Caspase activation favors TCTP export in different cell types. *Upper panel:* Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining) in VSMC exposed to 0.5 ml of: normal medium (N); serum starvation in RPMI (SS) for 24 h or incubated with either ZVAD-FMK (SS-ZVAD) or vehicle (SS-DMSO) prior to SS for 24 h. * = $p = 0.02$ vs. SS-DMSO, $n = 6$. *Lower panel:* Immunoblots for TCTP in exosome-like nanovesicle extracts purified from 25 ml of serum-free media conditioned by equal numbers of VSMC treated with vehicle (Exo-DMSO) or ZVAD-FMK (Exo-ZVAD), as described in the upper panel. 25 ug of EC cytosolic extracts were used as positive control for TCTP. Representative of 2 experiments.

Supplementary Figure S2 Caspase inhibition and TCTP release

(a) Percentage of apoptotic cells as defined by increased chromatin condensation without cell membrane permeabilization (as evaluated with HO and PI staining). EC were incubated in SS with different concentrations of ZVAD-FMK or DMSO (vehicle) for 4 hours. = $p \leq 0.05$ vs DMSO, $n = 3$. **(b)** Immunoblots for TCTP (*left panel*) in 1 ml of total serum-free media conditioned by equal numbers of serum starved EC in presence of ZVAD 30 uM or DMSO (Vehicle). *Right panel:* quantification of TCTP from Immunoblots analyzed by densitometry; $n = 3$. $p \leq 0.05$ vs DMSO.

Supplementary Figure S3. Densitometry analysis for western blots of proteins extracted from conditioned media presented in Figures 3b, 4a, 5d, 6c and g, Supplementary Figure S1f.

Figure 1. Serum starvation induces a pure apoptotic response in EC

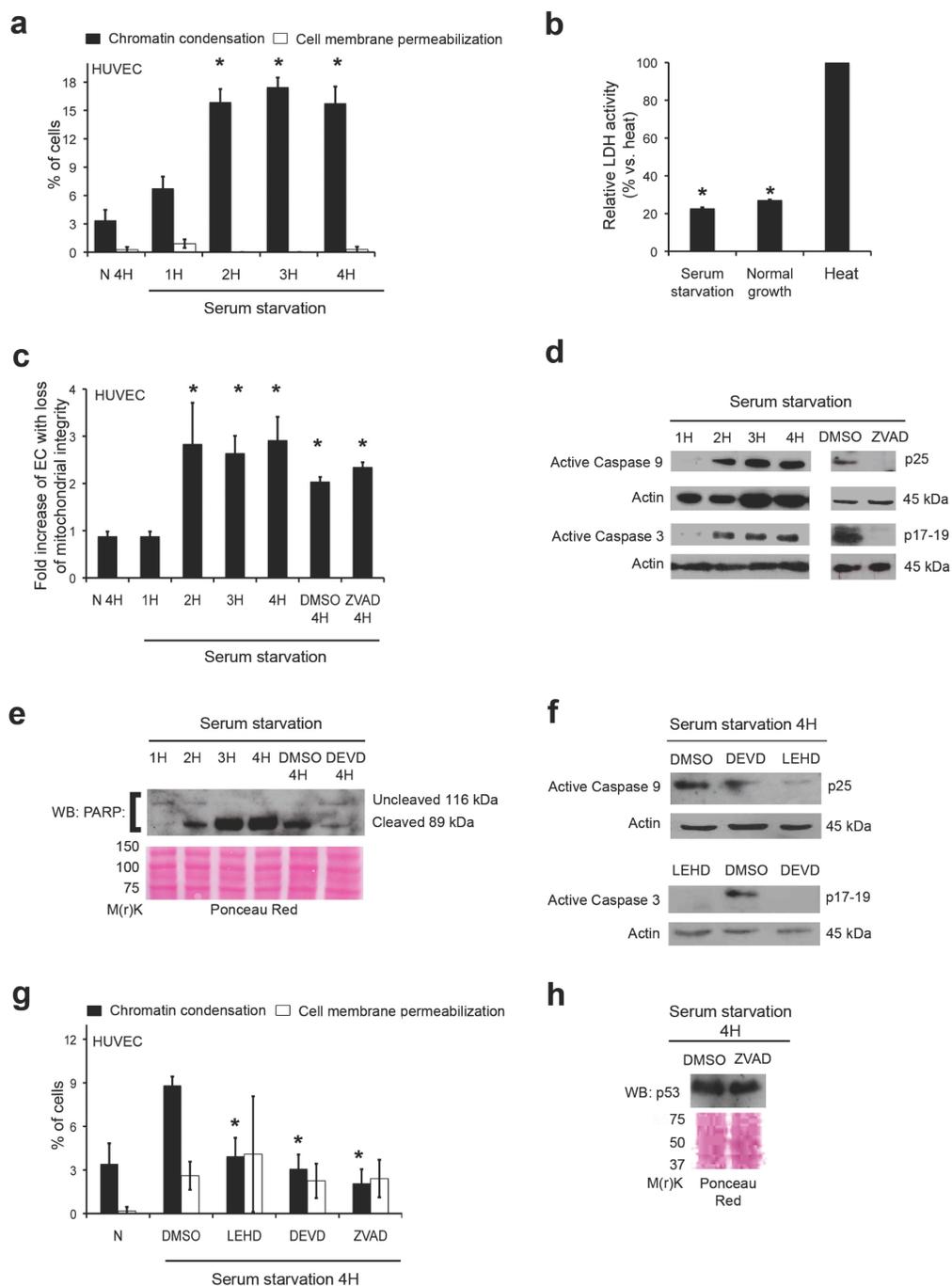


Figure 2. Characterization of the secretome of apoptotic EC

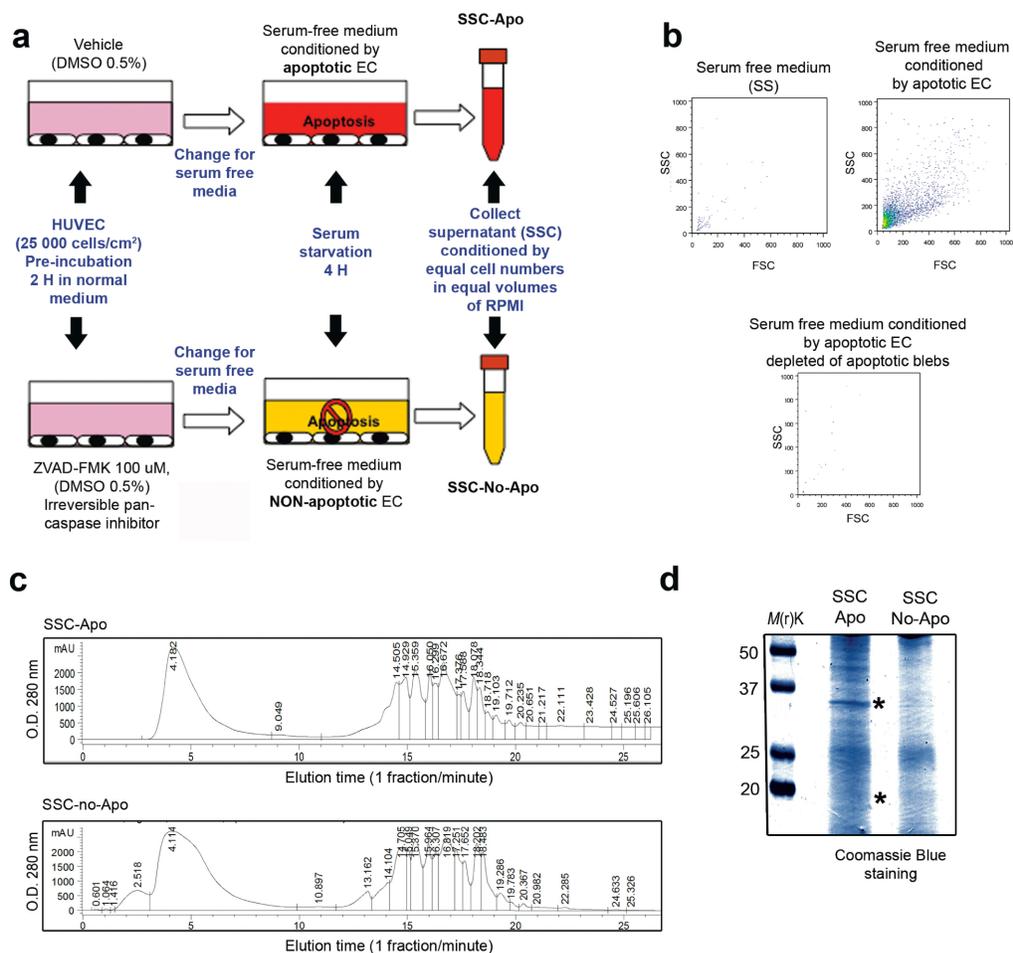


Figure 3. Caspase(s) activation in apoptotic EC fosters the release of anti-apoptotic exosome-like nanovesicles

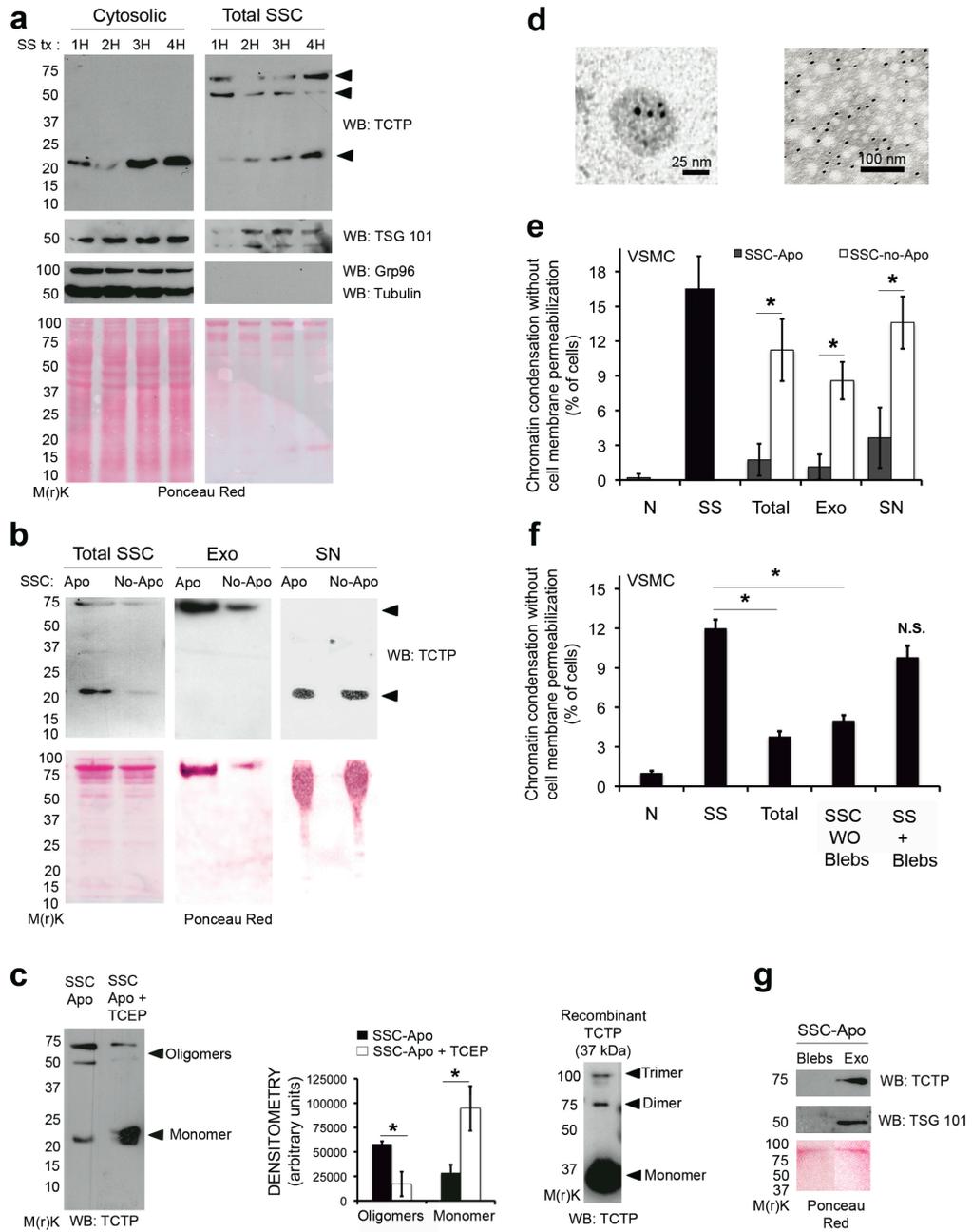


Figure 4. TCTP is a novel anti-apoptotic component of the apoptotic secretome

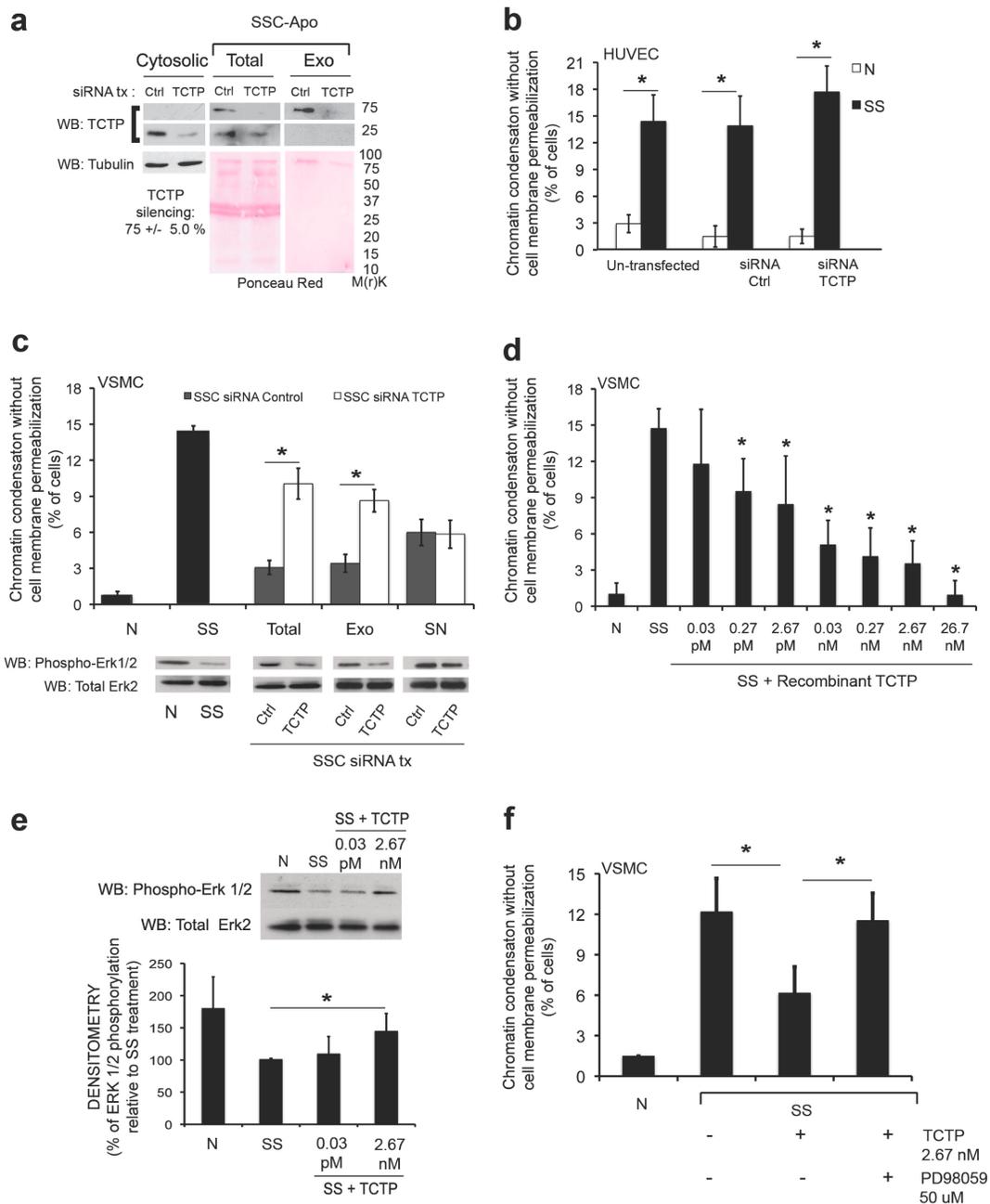


Figure 5. TCTP export is specific of apoptotic cell death

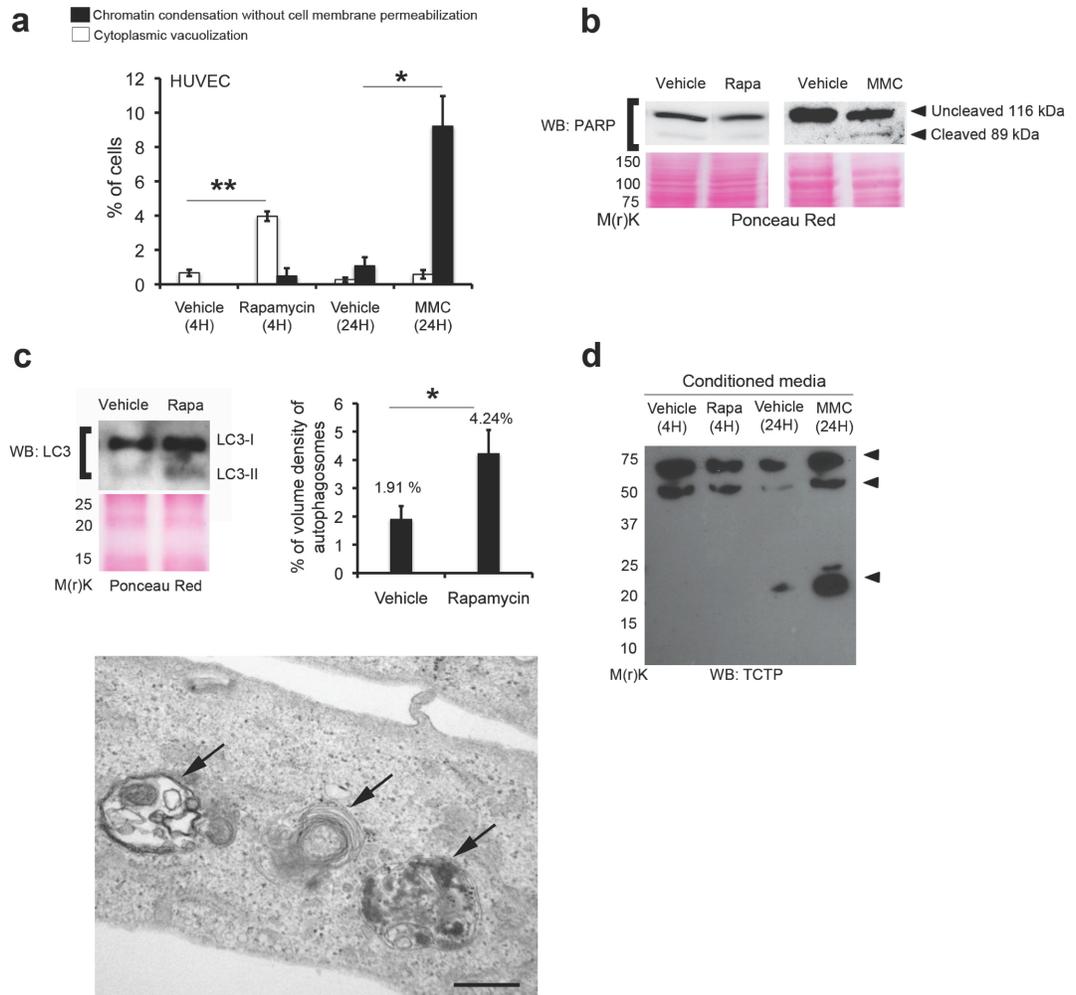
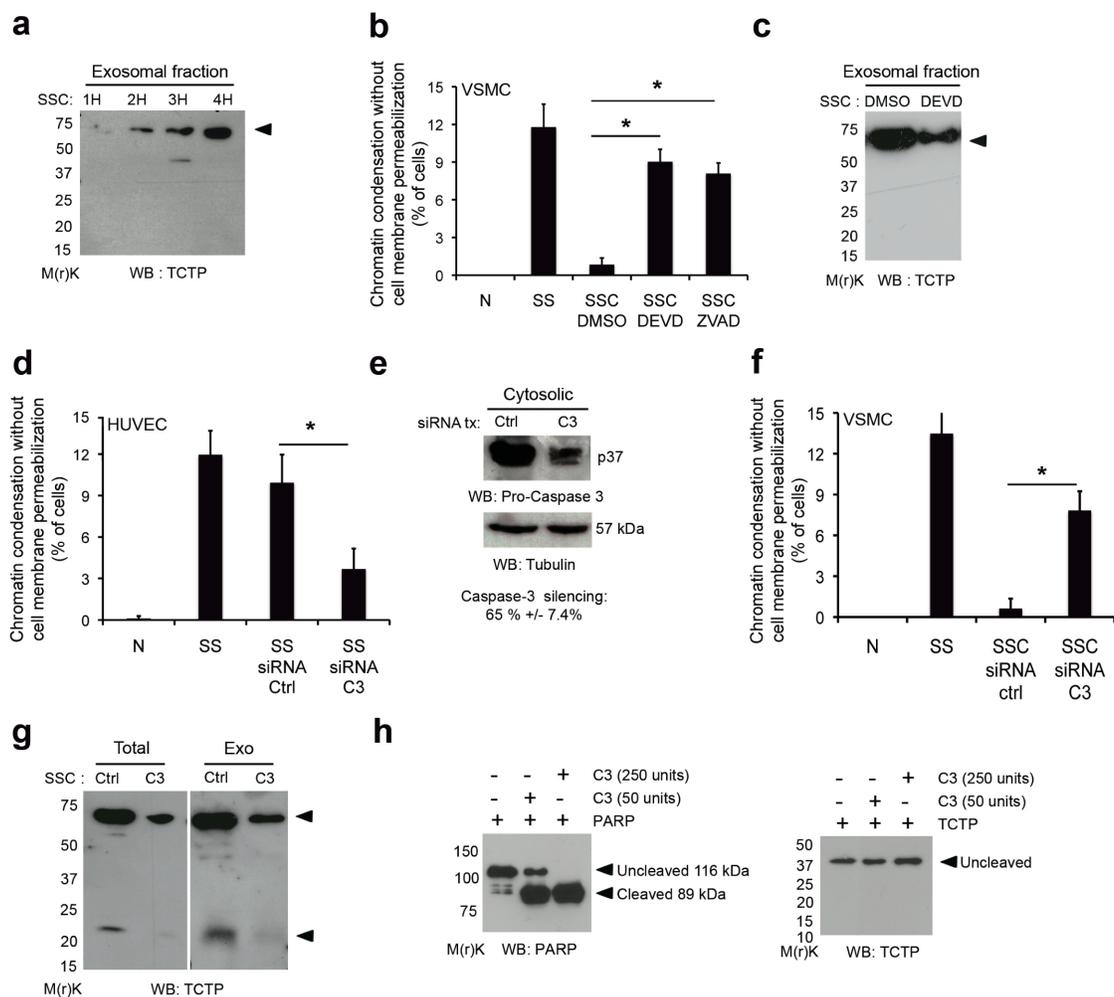
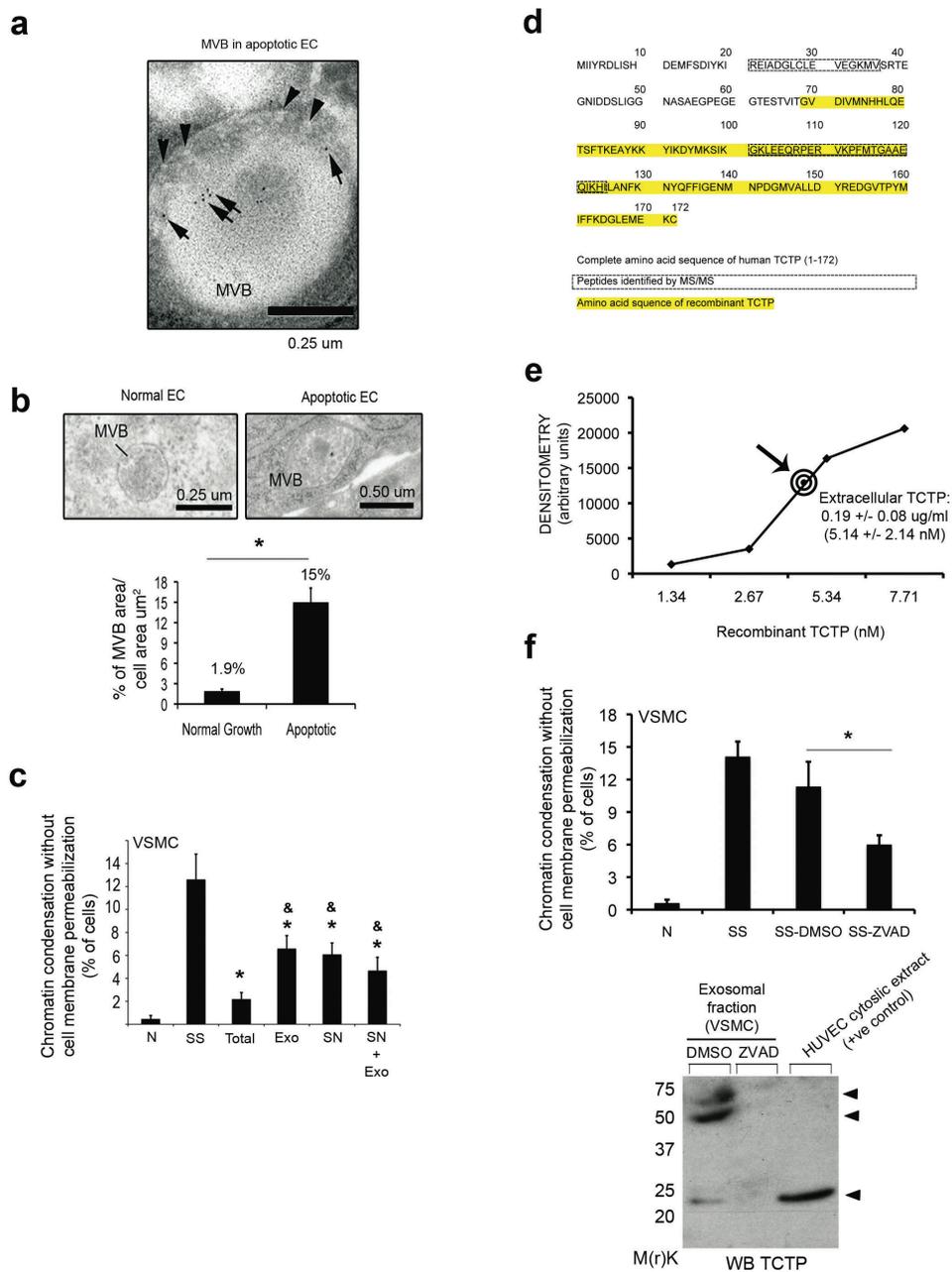


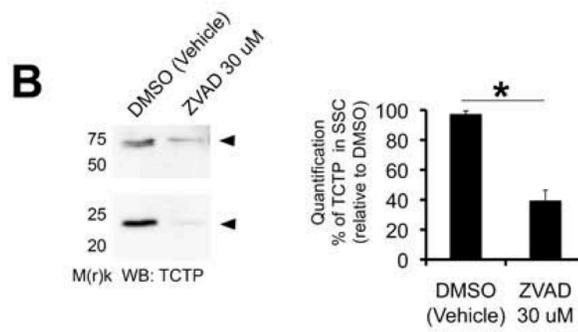
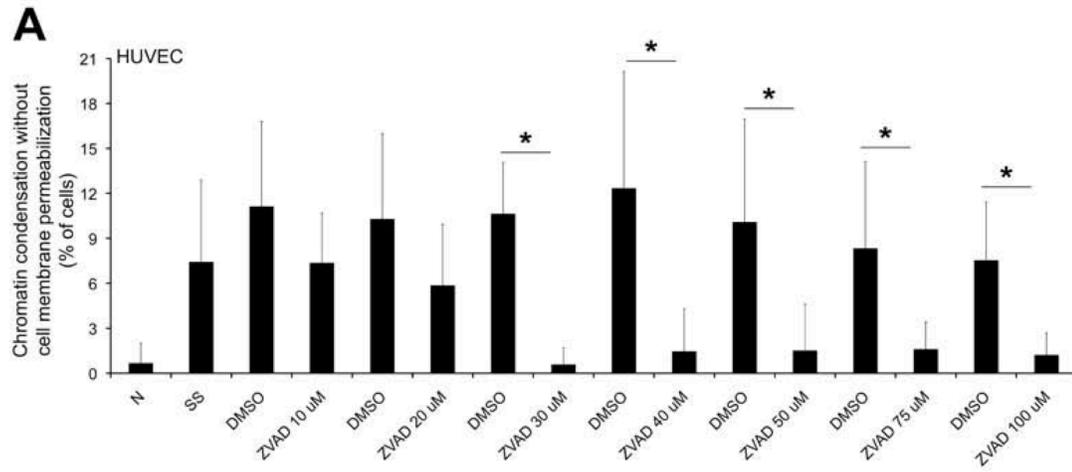
Figure 6. Activated caspase-3 is a novel regulator of exosomal TCTP export



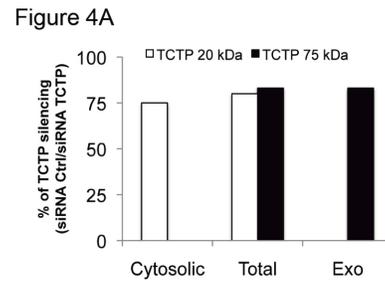
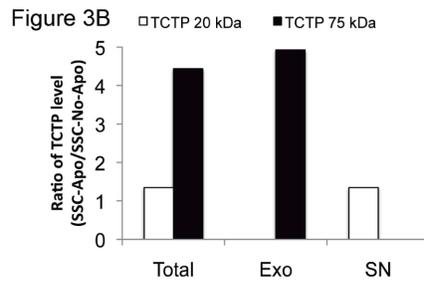
Supplementary Figure S1



Supplementary Information Figure S2



Supplementary Figure S3



Supplementary Information Figure S1F

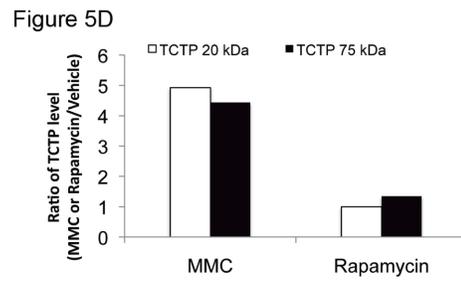
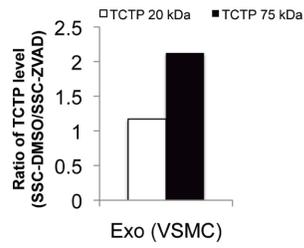


Figure 6C

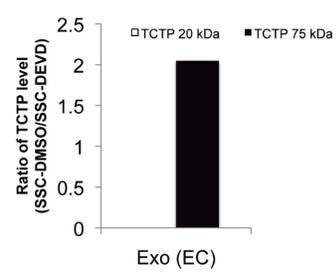


Figure 6G

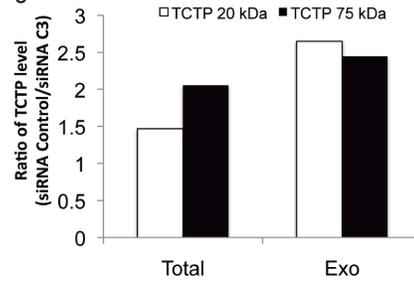


Table 1 : List of proteins identified exclusively in SSC-Apo by 2 distinct LC-MS/MS approaches

#	Proteins identified by two LC-MS/MS approaches	Gene name	Type of LC-MS/MS approach			Secretion signal sequence	Mode of secretion
			Functional	2D-LC	SDS-PAGE		
1	Translationally controlled tumor protein (TCTP)	tpt1	x		x	NO	Exosome (291, 293)
2	a-SNAP N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein alpha NSF	Napa	x		x	NO	Exosome (305)
3	Insulin-like growth factor II receptor	igf2r	x	x		YES	Exosome (305)
4	Aldehyde dehydrogenase 1	aldh1a1		x	x	NO	Exosome (305)
5	Heat shock 70kDa protein 1-like	hspa1l		x	x	NO	Exosome (296)
6	Epidermal growth factor	Egf		x	x	YES	Exosome (305)
7	L1 cell adhesion molecule	l1cam		x	x	YES	Exosome (306)
8	Low density lipoprotein receptor-related protein 2	lrp2		x	x	YES	Exosome (305)
9	MHC class II DQ	hla-dqa1		x	x	YES	Exosome (307)
10	Transforming growth factor, beta receptor III (betaglycan, 300kDa)	tgfbr3		x	x	YES	Exosome (305)
11	Ash1 (absent, small, or homeotic)-like	ash1l		x	x	NO	ER Microsome (308)
12	ATPase H+/K+ exchanging alpha polypeptide	Atp4a		x	x	NO	Tubulovesicles and apical membrane (309)
13	ADAMTS4	Adamts4		x	x	YES	Trans Golgi network (310)
14	Tissue type plasminogen activator	Plat		x	x	YES	Small dense vesicles (311)
15	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma	Eif4g1	x		x	NO	Undescribed
16	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 2	golga2	x	x		NO	Undescribed
17	Myotrophin	Mtpn	x	x		NO	Undescribed
18	Anillin, actin binding protein (scraps homolog, Drosophila)	Anln		x	x	NO	Undescribed
19	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	abcc2		x	x	NO	Undescribed
20	breast cancer 2, early onset	brca2		x	x	NO	undescribed
21	Coenzyme Q4 homolog	coq4		x	x	NO	Undescribed
22	Heart muscle inducible nitric oxide synthase (iNOS)	NOs2a		x	x	NO	Undescribed
23	Spindlin-like protein 2	spin2a		x	x	NO	Undescribed
24	Very large inducible GTPase 1	gvin1		x	x	NO	Undescribed
25	Integrin alpha 10 subunit	itga10		x	x	YES	Undescribed
26	Low density lipoprotein-receptor related protein 1	lrp1		x	x	YES	Undescribed
27	Phospholipase A2, group IID	Pla2g2d		x	x	YES	Undescribed

Table 2 : List of all other exosomal proteins identified by one proteomic approach

#	Proteins identified by one LC-MS/MS approach	Gene name	Type of LC-MS/MS approach			References
			Functional	2D-LC	SDS-PAGE	
Exosomal proteins identified exclusively in SSC-Apo						
1	Decay-accelerating factor	<i>Cd55</i>	x			(307, 312)
2	Alix	<i>Pdcd6ip</i>			x	(307, 312)
3	Milk fat globule-EGF factor8/lactadherin	<i>Mfge8</i>			x	(307, 312)
4	Integrin beta 1	<i>Itgb1</i>		x		(307, 312)
5	Integrin alpha 3	<i>Itga3</i>		x		(307, 312)
6	Heat shock protein HSP 90-alpha	<i>Hsp90aa1</i>			x	(307, 312)
7	Flotillin 1	<i>Flot1</i>			x	(307, 312)
8	Lysosomal-associated membrane protein 3	<i>Cd63</i>			x	(307, 312)
9	Actinin	<i>Actn1</i>			x	(305, 313)
10	ATP citrate lyase	<i>Acly</i>			x	(305, 313)
11	Ezrin	<i>Vil2</i>			x	(305, 313)
12	Elongation factor 1-alpha 1	<i>Eef1a1</i>			x	(307, 312)
Exosomal proteins identified exclusively in SSC-No-Apo						
1	Integrin beta 2	<i>Itgb2</i>			x	(305, 313)
2	Rab7	<i>Rab7</i>			x	(305, 313)

Discussion

Le testament protéique et nanovésiculaire de l'apoptose endothéliale

Chapitre 1 - Généralités

Depuis sa caractérisation dans différents contextes physiologiques et pathologiques, l'apoptose s'est révélée un mécanisme des plus originaux ne cessant de surprendre et d'exciter les scientifiques. Les travaux présentés dans cette thèse repoussent les limites de notre compréhension de ce phénomène concernant tout spécialement ses fonctions post mortem qui s'avèrent astucieusement régulées. La compréhension de ce concept a été mise à rude épreuve par la communauté scientifique probablement dû à une vision dichotomique de la mort cellulaire. En fait, la vision initiale de mort cellulaire reposait soit entre un processus nécrotique accidentel ou un mécanisme apoptotique qui contrairement à la nécrose, permettait de ne pas laisser de traces. Or, ce paradigme est revisité et redéfini par les travaux présentés dans cette thèse. La mort apoptotique n'est pas silencieuse et en fait, elle continue 'de vivre' en générant un testament moléculaire complexe ayant des répercussions paracrines importantes, notamment dans le contexte de réparation vasculaire.

Mis à part les travaux effectués dans notre laboratoire, Il existe d'autres exemples démontrant que la phase effectrice de l'apoptose régule la sécrétion de médiateurs ayant des fonctions intercellulaires pertinentes à la VG. Les fonctions paracrines initialement décrites étaient principalement attribuables au trafic leucocytaire. Par exemple, l'externalisation de la phosphatidylserine (PS) des cellules apoptotiques sert de signal de reconnaissance aux macrophages professionnels permettant de phagocyter les corps apoptotiques (314). Lauber, K. et al ont démontré que l'activation de la caspase-3 dans différents types cellulaires apoptotiques régule la sécrétion d'un lipide (lysophosphatidylcholine, LPC) chemoattractif pour les monocytes et les macrophages professionnels permettant de phagocyter les débris cellulaires apoptotiques (279). Truman, L. et al ont démontré que la fractalkine est sécrétée par les lymphocytes apoptotiques afin de stimuler le chimiotactisme des macrophages professionnels (315). Finalement, Bournazou, I. et al. ont démontré que les MCF7 et les cellules Burkitt Lymphoma apoptotiques secrètent la lactoferrine afin d'inhiber la migration des granulocytes (neutrophiles), permettant ainsi d'éviter l'activation d'une réponse inflammatoire (280). Somme toute, ces signaux 'eat me', 'come here' and 'don't eat me' permettent spécifiquement d'éliminer les débris apoptotiques sans toutefois générer une réponse inflammatoire massive.

Avantages et limitations de l'étude du sécrétome des CE apoptotiques

C'est dans le cadre des premières applications de la technologie protéomique que nous avons entrepris l'étude du sécrétome protéique de l'apoptose endothéliale. De ce fait, la publication de ces travaux représente la première analyse protéomique comparative, multidimensionnelle et non-biaisée de sécrétomes issus de cellules endothéliales primaires apoptotiques et non apoptotiques. Un aspect important nous permettant de relever ce défi reposait sur la 'simplicité' de notre modèle d'induction de l'apoptose endothéliale à l'aide de la déprivation de facteur de croissance. Par conséquent, les médiateurs générés durant l'apoptose endothéliale pouvaient être isolés et analysés sans la présence interférente de facteurs de croissance (incluant l'albumine) abondamment retrouvés dans le milieu de culture complet. Malgré que cette prémisse offrait un net avantage, nous avons sous-estimé à quel point les cellules endothéliales ont une importante activité sécrétoire.

Par exemple, les premières tentatives d'identifier les médiateurs directement dans le surnageant sans étape de fractionnement nous ont révélé que des contaminants résiduels du milieu de culture complet, spécialement l'albumine, masquaient l'identification des autres protéines moins abondantes. Après des essais visant à enlever l'albumine des surnageants par immunoprécipitation, nous avons conclu que l'albumine était après tout un transporteur protéique important et que l'immunoprécipitation pourrait aussi soustraire nos médiateurs d'intérêt. Par conséquent, nous avons élaboré une approche où les 2 protéomes (SSC-apo et SSC-no-apo) sont digérés avec la trypsine suivie d'une fractionnement par chromatographie liquide (LC-MSMS). Ainsi, cette fractionnement permet de répartir les peptides dans différentes fractions facilitant ainsi l'identification de protéines moins abondantes. Cette approche s'est révélée efficace: au total, 1300 protéines ont été identifiées. Toutefois, à ce moment, la validité de l'identification de protéines par MSMS reposait sur la présence de plusieurs peptides appartenant à la protéine d'intérêt. Or, les protéines identifiées dans notre approche arboraient 1 ou 2 peptides et l'albumine était encore suffisamment abondante, réduisant ainsi nos chances d'identification d'autres médiateurs moins abondants.

Par conséquent, nous avons entrepris un second processus de fractionnement des sécrétomes sur un grand gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomasie. Ensuite, chacune des bandes visibles dans les 2 protéomes étaient digérées avec la trypsine suivie du processus d'identification par

spectrométrie de masse en tandem. Cette approche permettait 1) d'isoler les protéines de l'albumine selon différentes propriétés physico-chimiques comparativement à la chromatographie liquide; 2) d'associer les protéines identifiées à un poids moléculaire d'après le patron de migration et 3) d'avoir un aperçu de l'abondance relative des protéines entre les 2 protéomes. Selon cette approche, des peptides associés à 2385 protéines ont été identifiés. Parmi ces protéines, plusieurs étaient inconnues, d'autres appartenant aux résidus de milieu de culture, générant ainsi un processus d'analyse complexe. Ajoutons aussi que ces 2 approches comparatives sont considérées semi-quantitatives car l'abondance relative des peptides est reflétée par l'intensité avec laquelle le spectromètre de masse détecte ces peptides qui peut être influencée par des paramètres physiques de l'appareil. Finalement, la coloration au bleu coomassie nous a révélé qu'il y a beaucoup plus de protéines libérées dans le surnageant durant l'apoptose. Nous avons sous-estimé ce fait en comparant des quantités équivalentes de protéines au lieu de comparer les quantités totales de protéines provenant d'un volume équivalent de surnageant. Cet aspect a diminué aussi les probabilités d'identifier des protéines dont l'export extracellulaire est augmenté durant l'apoptose endothéliale.

Nous avons combiné à ces résultats une approche protéomique fonctionnelle effectuée ultérieurement dans les laboratoires des Dre Marie-Josée Hébert et Dr Alexey V. Pshezhetsky où le surnageant des CE apoptotiques a été fractionné par chromatographie liquide et chacune de ces fractions a été évaluée sur les CML afin de voir quelle(s) fraction(s) avait conservé une activité anti-apoptotique. Les fractions dites anti-apoptotiques ont été par la suite analysées par spectrométrie de masse en tandem permettant d'identifier 28 protéines, dont 7 inconnues. Cette approche permettait d'identifier des médiateurs fonctionnellement pertinents concernant l'activité paracrine anti-apoptotique chez les CML induite par le SSC-apo, récapitulant ainsi le phénotype associé aux CML durant le développement de la VG.

L'enrichissement du sécrétome des CE apoptotiques dans le milieu extracellulaire représente un phénomène régulé

Le but initial était d'identifier les médiateurs libérés spécifiquement par les CE apoptotiques. Afin de respecter les limitations de notre approche, nous avons généré une liste de médiateurs potentiels suivant les 3 critères suivants : 1) protéine présente dans le SSC-apo seulement; 2) protéine d'origine humaine et 3) protéine identifiée dans 2 des 3 approches utilisées. De toute évidence, ces critères ont probablement détourné l'identification d'autres médiateurs. Toutefois, ces banques de données regorgent d'indices reliés au testement des CE apoptotiques et peuvent générer des hypothèses très intéressantes.

Les travaux relatifs à la caractérisation du sécrétome des CE apoptotiques nous révèlent un 1^{er} point important : l'apoptose endothéliale augmente l'export de médiateurs protéiques dans l'environnement extracellulaire. Ce fait est illustré par la comparaison des sécrétomes fractionnés sur gel SDS-PAGE et colorés au bleu de coomasie (article principal, Fig. 2D), où l'on peut visiblement apprécier l'enrichissement protéique dans le SSC-apo comparativement au SSC-no-apo. De plus, à partir d'un volume égal de surnageant, la coloration au ponceau rouge nous révèle le même phénomène, surtout dans la fraction exosomiale du SSC-apo (article principal, Figures 3b et 4a). Finalement, malgré l'utilisation de critères de sélection rigoureux et de 2 méthodes distinctes de fractionnement des sécrétomes (en solution et en gel), nous avons quand même été en mesure d'identifier 27 protéines spécifiquement enrichies dans le SSC des CE apoptotiques comparativement au SSC-no-apo (article principal, Table 1).

Tel que discuté dans l'introduction, l'endothélium en réponse au stress est reconnu pour réguler la sécrétion de différentes protéines, lui permettant ainsi de s'adapter à son environnement. De manière intéressante, l'idée que cette activité sécrétoire ne soit pas issue d'un phénomène accidentel ou nécrotique nous apparaît logique et ne démontre pas vraiment d'intérêt particulier. Tel n'a pas été le cas avec le présent projet. Compte tenu qu'il semblait contre intuitif de présumer que l'apoptose endothéliale puisse réguler la sécrétion de médiateurs et que cette observation n'était pas subséquente à une lyse cellulaire de nature nécrotique, nous avons largement examiné l'incidence de la nécrose à différents niveaux dans notre modèle d'étude tel que démontré et discuté dans l'article principal.

Parallèlement à nos analyses biochimiques, nous sommes en mesure de différencier nos travaux de ceux relatifs à la nécrose en s'appuyant sur une littérature très récente démontrant que des médiateurs distincts nommés 'Alarmins' sont générés dans le milieu extracellulaire suivant une infection ou un dommage cellulaire nécrotique. La présence des Alarmins dans le milieu extracellulaire peut être consécutive à 1) une mort cellulaire nécrotique mais non apoptotique; 2) à la dégranulation des neutrophiles, un mécanisme n'impliquant pas de processus de mort cellulaire. Leurs fonctions biologiques sont reliées à l'activation du système immunitaire inné et acquis et ces Alarmins sembleraient participer au retour de l'homéostasie du tissu endommagé (316, 317). Par exemple, certaines Alarmins ont des propriétés anti-microbiales incluant les α -defensins, cathlicidin et lactoferrine (318) et sont libérées suivant la dégranulation des neutrophiles. D'autres Alarmins, incluant HMGB1 (High-mobility group box-1 protein) et Grp96, sont libérées suivant un processus nécrotique et se retrouvent exposées dans le milieu environnant générant ainsi une réponse inflammatoire très rapide incluant le recrutement des neutrophiles et des cellules dendritiques (319-321). En lien avec les travaux présentés dans cette thèse et en plus des évidences biochimiques démontrant que la nécrose n'est pas significativement représentée dans notre modèle d'étude, aucune des Alarmins n'a été retracée parmi les 3500 protéines identifiées dans nos 3 approches protéomiques.

Somme toute, la présence enrichie de protéines dans le sécrétome des CE apoptotiques comparativement au sécrétome des CE non-apoptotiques est associée à une mort endothéliale apoptotique, régulée, pouvant être distinguée de la nécrose endothéliale. Dans un contexte de transplantation, la nécrose endothéliale est plutôt associée aux traumatismes mécaniques générés par les manœuvres chirurgicales péri-opératoires.

Chapitre 2 - L'apoptose endothéliale augmente l'export extracellulaire de médiateurs nanovésiculaires

"It is normal to give away a little of one's life in order not to lose it all."

- Albert Camus

Le point le plus important et le plus excitant de nos travaux publiés dans l'article principal repose sur le fait que l'apoptose endothéliale augmente la sécrétion de nanovésicules ayant une composition protéique et des propriétés fonctionnellement distinctes des microparticules antérieurement décrites. Ce qui est très intéressant, c'est qu'initialement, nous n'avions jamais pensé que l'apoptose endothéliale régulerait la sécrétion de nanovésicules de type exosomal. Au total, 31 protéines exosomiales ont été identifiées spécifiquement dans le SSC-apo à l'aide de 1 ou 2 approches protéomiques. Notre approche non biaisée a grandement dévoilé la pertinence de ces nanovésicules dans un contexte de remodelage vasculaire et TCTP s'est révélé notre guide dans la compréhension de ce nouveau phénomène associé à l'apoptose endothéliale. De plus, au moment de la découverte de ces nanovésicules dans notre système, les informations disponibles concernant leur mode de sécrétion et leurs fonctions étaient minimes. Une certaine controverse était associée à la présence de ces nanovésicules dans le milieu extracellulaire, ajoutant un niveau de difficulté important à la signification de nos résultats. Cet aspect découle, du moins en partie, d'une nomenclature incomplète de l'ensemble des espèces vésiculaires sécrétées par différents types cellulaires dans différents contextes donnés. Durant les 5 dernières années, des données émergentes ont permis d'élucider en partie que la sécrétion de vésicules membranaires de transport extracellulaire soit à l'origine de différents processus physiologique et pathologique. Cette ambiguïté est consécutive à différents facteurs incluant 1) les types cellulaires sécrétant ces vésicules (cellules primaires ou transformées, fluides biologiques), 2) les grandeurs des vésicules (30 nm à 1 μ m), 3) les compositions lipidiques, protéiques et d'ARN; 4) les origines cellulaires et 5) les contextes cellulaires auxquels leur sécrétion est associée.

Les différents types de vésicules membranaires associés au transport extracellulaire

Les vésicules membranaires de transport intracellulaire seraient distinctes des vésicules membranaires régulant le transport extracellulaire. Dans le premier cas, ces vésicules bourgeonnent d'un compartiment intracellulaire et circulent dans le cytoplasme jusqu'au compartiment membranaire accepteur. Le côté cytoplasmique de ces vésicules contient du matériel correspondant à la lumière du compartiment donneur. Par opposition, les vésicules membranaires de transport extracellulaire ont une topographie membranaire similaire à la membrane plasmique ou à celle correspondant à la lumière des organelles intracellulaires d'où elles originent (290). Une panoplie de vésicules membranaires de transport extracellulaire a été décrite. Voici une brève liste des noms prêtés aux vésicules membranaires impliquées dans le transport extracellulaire : exosomes, microparticules, microvésicules, nanoparticules, 'shedding microvesicles', ectosomes, exosome-like vesicles, apoptotic blebs, promininosomes, prostasomes, dexosomes, texosomes, dex, tex, agrosomes, acheotosomes et oncosomes (322).

Microparticules

Étonnamment, la vésiculation membranaire a été associée à l'hypothèse de réponse à l'insulte dès 1978. Les auteurs suggéraient que ce processus participait à l'inhibition des fonctions métaboliques et la croissance cellulaire (323, 324). Toutefois, cette hypothèse n'a jamais repris d'élan depuis ces publications. De plus, pendant très longtemps, les vésicules observées par microscopie électronique étaient associées à des artefacts secondaires à la nécrose cellulaire suivant un dommage mécanique (325).

La sémantique associée aux vésicules résultant d'un dépouillement ("shedding") de la membrane plasmique demeure difficile à décrire. Le terme microparticule a été décrété et officialisé en 2005 par le comité SSC Vascular Biology Meeting (Sydney, Australie) (326). Les microparticules (aussi nommées ectosomes ou shedding vesicles) sont générées suivant un dépouillement de la membrane plasmique décrit par Wolf. en 1967 (327). Les microparticules font souvent référence aux 'shedding vesicles' et se distinguent des microvésicules qui regroupent une population hétérogène de vésicules incluant les exosomes et les microvésicules. Les microparticules nommées ectosomes sont des 'shedding vesicles' provenant des neutrophiles et des monocytes (325). Suivant une protrusion externe de la membrane plasmique, une fission de ce cloisonnement de la membrane résulterait en la formation de microparticules. Leurs caractéristiques sont les

suivantes : leur diamètre varie de 100 à 1000 nm, leur forme est hétérogène, elles peuvent contenir de l'ARN, des récepteurs et des ligands, du matériel cytosquelettique et peuvent être générées suivant différents types de stress cellulaires incluant, des stress mécaniques, l'activation et l'apoptose (326).

Les mécanismes permettant la ségrégation de cargos spécifiques dans les microparticules ne sont pas connus. Toutefois, les microparticules auraient des fonctions associées à la coagulation et l'inflammation et permettraient de servir de plateformes afin de coordonner le développement de différents processus de signalisation (328, 329). Durant le développement de l'athérosclérose, les microparticules s'accumulent dans les dépôts lipidiques et les thrombi et promouvoient une boucle de signalisation dysfonctionnelle au sein du compartiment vasculaire (330, 331). En ce qui a trait à l'inflammation, les microparticules participeraient différemment et dépendamment du stade inflammatoire. Durant les stades précoces, les microparticules libérées par les neutrophiles favoriseraient la sécrétion de facteurs anti-inflammatoires (TGF- β et IL-1) des macrophages et inhiberaient leur production de TNF- α et IL-8 (332, 333). Dans les stades plus tardifs, les microparticules peuvent devenir pro-inflammatoires en catalysant le transfert de récepteurs CCR4 et CCR5 et stimuleraient la sécrétion de IL-6 et MCP qui participent à soutenir une forte réponse inflammatoire (325, 334). Finalement, les microparticules pourraient participer à des événements épigénétiques affectant le destin cellulaire des cellules cibles en transférant des mARN et des miARN de manière paracrine (335).

Blebs apoptotiques

Les 'blebs' ou 'corps' apoptotiques quant à eux seraient distincts des microparticules, malgré qu'ils puissent être générés par les mêmes stimuli. Les microparticules seraient libérées durant les stades précoces de l'apoptose tandis que les blebs apoptotiques représenteraient des débris de cellules apoptotiques associés aux stades tardifs de l'apoptose (336). Les blebs apoptotiques ont un diamètre hétérogène (50-500 nm) et contiennent des histones et du matériel nucléaire et se comportent différemment dans un gradient de sucrose linéaire comparativement aux autres types de vésicules membranaires de transport (296). Les corps apoptotiques issus des cellules endothéliales participeraient au 'homing' des EPC et des CML afin de faciliter le processus de ré-endothélialisation et de réparation, respectivement (337).

Microvésicules

Les microvésicules seraient une espèce vésiculaire n'ayant pas de caractéristique vraiment spécifique et leur diamètre varie de 30 nm à 1000 nm. En fait, les microvésicules correspondraient de manière indiscriminée à une population hétérogène de vésicules. Parmi cette classe, les prostasomes (aposomes ou seminosomes) ont un diamètre variant de 50-500 nm, ils ont une composition lipidique particulière et ressemblent aux epididysosomes (338, 339). Les particules P2 et P4 (les prominosomes) sont associées à la prominin-1. De manière intéressante, ces vésicules de transport membranaire extracellulaire seraient générées à différents moments du développement cérébral. Les P2 seraient de 600 nm de diamètre et apparaîtraient dans le liquide ventriculaire au début de la neurogénèse. Les particules P4 ont un diamètre plus petit (50-80 nm) et apparaîtraient plus tard durant la neurogénèse (340). Finalement, cette catégorie inclut aussi des vésicules de la membrane plasmique externe qui seraient impliquées dans le transport de lipides et de protéines des bactéries Gram-négative pour la communication et l'intoxication de la cellule hôte (326, 341).

Les exosomes

Les fameux exosomes... Malgré une confusion certaine concernant la nomenclature des vésicules membranaires associées au transport extracellulaire, les exosomes ont une place privilégiée. D'abord, les exosomes semblent avoir un certain attachement avec la ville de Montréal compte tenu qu'ils ont été décrits la première fois par la biochimiste Rose Johnstone (Figure 25) à l'Université McGill dans les années 70 et pour la première fois dans un contexte d'apoptose durant ce présent projet, déroulé aussi à Montréal. R. Johnstone aurait décrit sa découverte de "Alice in Blunderland" lorsqu'elle observa au microscope électronique que de petites vésicules étaient littéralement 'régurgitées' durant la maturation des réticulocytes en culture (342, 343). Johnstone et al. ont démontré l'origine endocytaire de ces nanovésicules à l'aide d'expériences de 'pulse-chase' où des récepteurs à la transferrine étaient marqués radioactivement et pouvaient par la suite être récupérés dans le milieu extracellulaire (344). Ils décrétèrent le nom 'exosome' compte tenu que le



Figure 25 : Rose Johnstone, Ph.D. Reproduit de (3) avec la permission de John Wiley and Sons.

processus de sécrétion semblait inverse à l'endocytose et que des molécules externes étaient internalisées dans des structures membranaires (345). À l'époque, ce concept a été mis à rude épreuve par la communauté scientifique : « *Our results were viewed by disbelieving eyes in the first few years. Few were convinced that this was a natural phenomenon, but considered it some type of artifact attributed to the unusual experimental system we were using and/or the result of our long-term incubations using 'stressed' réticulocytes (i.e. from heavily bled animals)* », raconte R. Johnstone dans l'une de ses dernières publications quelques mois avant sa mort (346). Je dois ajouter ici que j'ai eu le même type de commentaire entourant mon projet. Finalement, à l'époque, on croyait que le destin cellulaire des MVB étaient voué uniquement à la dégradation lysosomiale et non à des fins de sécrétion suivant une fusion avec la membrane plasmique (342). Pauvres exosomes, ils ont été la cible de maintes controverses!

Caractéristiques biochimiques et morphologiques

Les exosomes ont leur propre catégorie attribuable surtout à leur origine endocytaire et leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques. Les exosomes sont isolés par centrifugation différentielle et une étape supplémentaire est requise afin d'enlever les corps apoptotiques et les microparticules (soit par centrifugation ou par ultrafiltration). La purification des exosomes est obtenue à l'aide d'un gradient de sucrose où les nanovésicules migrent à une densité de 1.10 à 1.21 g/ml. Des immunobuvardages dirigés contre des protéines exosomiales classiques permet de confirmer la pureté des exosomes isolés. Finalement, les exosomes peuvent être aussi isolés par capture d'immunoaffinité (347) mais le rendement est très faible compte tenu que l'isolation est basée sur un seul anticorps. Morphologiquement, les exosomes sont visibles par microscopie électronique et leur apparence de 'cup hand' varie en fonction de la technique utilisée. Par contre, cette caractéristique morphologique ne suffit pas à elle seule afin de confirmer la présence de nanovésicules catégorisées à titre d'exosomes (290).

Les '*exosomes-like vesicles*' auraient une forme irrégulière et un diamètre variant de 20 à 50 nm et leur indice de flottaison dans un gradient de sucrose est similaire à celui des exosomes. Une seule étude a rapporté l'existence de ces exosomes-like vesicles dans le surnageant de cellules endothéliales en culture (348). Ces nanovésicules participeraient à générer une forme soluble du TNFR1 via la sécrétion d'exosomes et ce de manière constitutive et sans la participation de sheddases normalement impliquées dans le 'shedding' des ectodomains de différentes protéines membranaires. La seule différence importante de ces nanovésicules avec les exosomes, est qu'elles ne contiendraient pas de radeau lipidique.

L'ensemble de ces observations suggère que différentes nanovésicules puissent être générées dans différents contextes cellulaires. Les chercheurs spécialisés dans le domaine des exosomes soutiennent qu'il serait plus avantageux de conserver une nomenclature plus large des nanovésicules : *"The more narrow you make the definition, the less interesting this field will be to everyone else"*, selon Stephen Gould, Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland (343).

Compte tenu que l'étude des exosomes est très récente et que les méthodes de purification varient d'une étude à l'autre, il est possible que des protéines associées à d'autres types de vésicules soient surreprésentées dans les banques de données. Il est aussi important d'ajouter que plusieurs études protéomiques ont été effectuées en condition de déprivation de facteur de croissance afin d'optimiser le processus d'identification des protéines exosomiales compte tenu la présence surabondante et interférente de protéines résiduelles provenant du milieu de croissance complet. Toutefois, la plupart des auteurs n'ont jamais évalué l'incidence d'apoptose associée à la déprivation de facteur de croissance dans leur modèle d'étude *in vitro*.

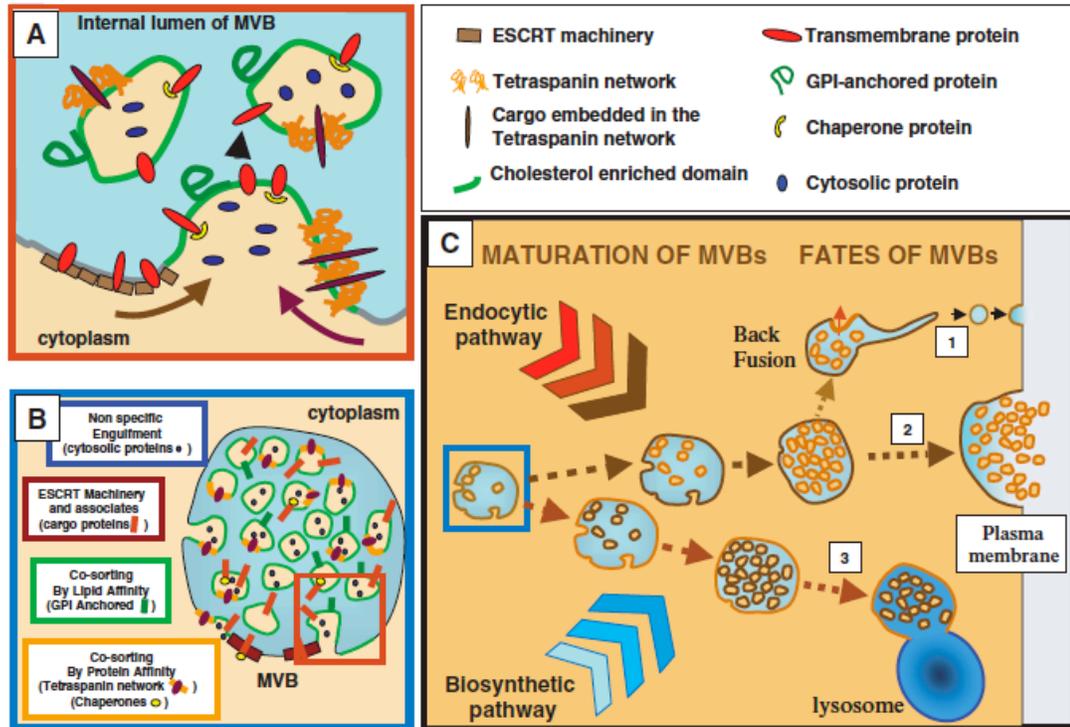
Biogénèse des exosomes

L'orientation topographique membranaire des exosomes est similaire à la membrane plasmique et contient plusieurs protéines membranaires associées aux MVBs, reflétant ainsi l'origine endocyttaire des exosomes (349). Durant la maturation des endosomes, une invagination de leur membrane permet de générer des vésicules intraluminales (ILV) caractérisant les MVB. Ces ILV sont nommées exosomes lorsque les MVB fusionnent avec la membrane plasmique afin de relarger leur contenu intraluminal dans le milieu extracellulaire. La formation des ILV serait le reflet d'un processus régulé et nécessite des lipides et des protéines et dans certains cas, la machinerie ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport) serait requise. Les complexes I et III ESCRT sont requis pour le bourgeonnement et le chargement des protéines dans les ILV destinées à la dégradation lysosomiale. Un processus d'ubiquitination serait requis pour le chargement des protéines dans les ILV. TSG101 et Alix appartenant aux complexes ESCRT I et III seraient des candidats potentiels du mécanisme de chargement. TSG101 servirait de protéine interactionnelle ubiquitinée permettant de lier les cargos ubiquitinés dans les ILV (325). Cette voie est habituellement destinée à la dégradation lysosomiale via la fusion des MVB avec les lysosomes (350). Toutefois, il existe des mécanismes indépendants de l'ubiquitination associés au chargement des protéines dans les ILV (351). Certains auteurs suggèrent que les protéines tetraspanines enrichies dans les exosomes ne nécessitant pas d'ubiquitination participeraient à l'invagination de la membrane endosomale compte tenu leur particularité de former des

microdomaines similaires aux radeaux lipidiques (352). De plus, leur tendance à lier différents types de protéines leur permettrait de cibler certaines protéines dans les ILV (353).

Différentes populations de MVB existent au sein d'une même cellule et auraient 3 destins différents selon une composition lipidique et protéique distincte. La voie classique des MVB serait associée à la dégradation lysosomiale (Figure 26C) tandis que certains MVB serviraient au transport rétrograde permettant de redistribuer des protéines à la membrane plasmique. D'autres MVB favoriseraient un processus de fusion avec la membrane plasmique permettant de sécréter les exosomes dans le milieu extracellulaire. Il a été suggéré que les MVB riches en cholestérol fusionneraient préférentiellement avec la membrane plasmique (354). Parallèlement, des études effectuées sur le récepteur de la transferrine ont démontré que la distribution de ce récepteur est associée à une population distincte de MVB (355). Toutefois, les mécanismes associés à cette ségrégation particulière des MVB demeurent inconnus. L'activité fusionnelle des MVB, la rapidité avec laquelle cela se produit ainsi que le manque de marqueurs spécifiques des MVB rend difficile d'évaluer les différentes populations de MVB.

Figure 26: La biogénèse et les différents destins des MVB. Reproduit de (349) avec la permission de Oxford University Press, Copyright 2006.



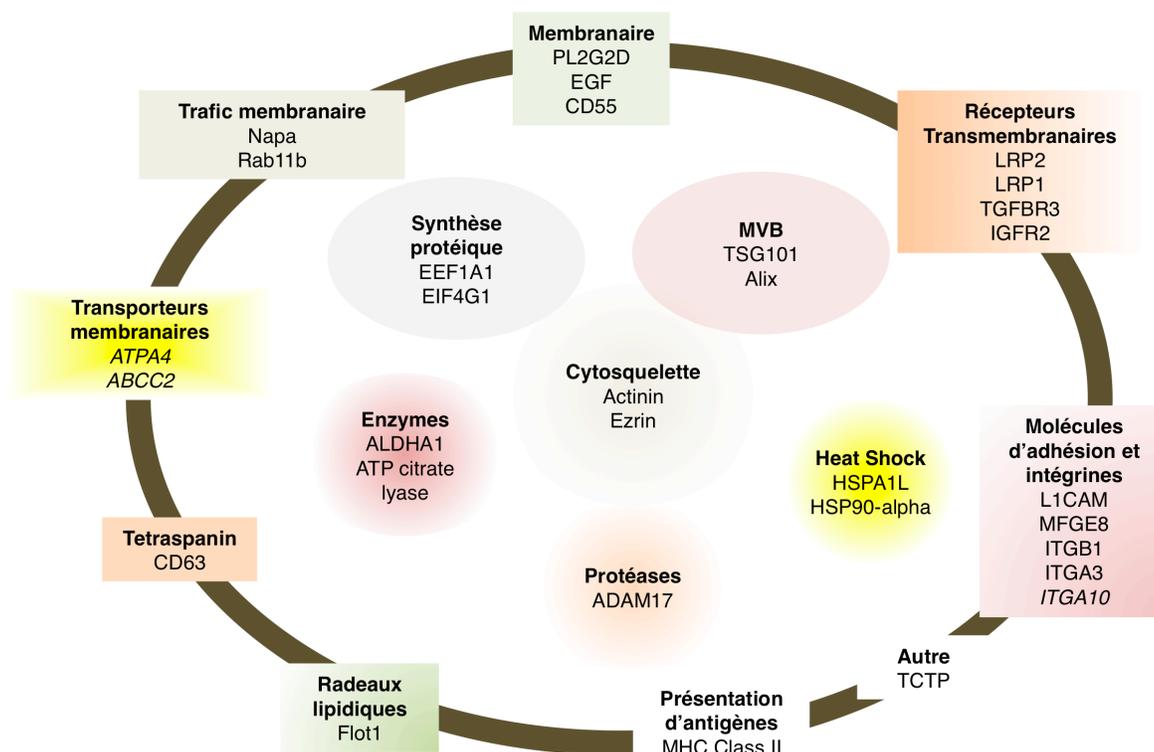
Légende : Biogénèse des exosomes. A : À la membrane limitante des MVB, plusieurs mécanismes agissent conjointement afin de permettre le triage de protéines transmembranaires, chaperones, protéines associées à des membranes ou cytosoliques dans la formation des ILVs. B : La présence de plusieurs mécanismes de sélection pourrait générer une population hétérogène de ILVs au sein d'un seul MVB en agissant séparément sur différents mécanismes de la membrane limitante. C : Les MVB recevant des lipides et des protéines provenant des voies endocytaires et biosynthétiques peuvent générer des sous-populations de MVB dont leur composition leur confère différents destins : (1) fusion inverse des ILVs avec la membrane limitante. Durant ce processus, les molécules préalablement séquestrées sur les ILVs sont recyclées à la membrane limitante et dans le cytosol. Des changements de la composition de la membrane limitante peuvent être responsables d'une 'tubulation' permettant l'expression à la membrane plasmique de protéines endosomales. (2) Des mécanismes inconnus pourraient mener les MVB vers la membrane plasmique où des protéines telles que SNAREs et les synaptogamines pourraient permettre leur fusion et le relargage conséquent des ILVs dans l'espace extracellulaire sous la forme d'exosome. (3) De façon similaire, la composition de la membrane limitante pourrait préférentiellement induire la fusion des MVB avec les lysosomes menant à la dégradation des molécules empaquetées dans les ILVs.

Composition moléculaire des exosomes

Les exosomes peuvent contenir différents cargos : des protéines, des lipides, des miRNA et mRNA et des protéines infectieuses incluant les prions. Par exemple, 1300 mRNA ont été identifiés dans des exosomes de souris et humains et le transfert de miRNA murins dans des cellules humaines mammaires résulte en une synthèse protéique *de novo* de ces transcrits (356). La composition des carbohydrates des exosomes n'a pas encore été révélée.

Compte tenu de leur origine endocytaire, les exosomes contiennent des 'protéines exosomiales classiques' représentant la machinerie protéique commune à la plupart des exosomes isolés de différents types cellulaires ou de fluides biologiques. En fait, il existe une banque de données nommée ExoCarta disponible sur l'internet regroupant 75 études protéomiques effectuées sur des préparations exosomiales (357). Cette banque recense à la fois les protéines et les ARN identifiés dans ces préparations et elle s'avère utile afin de déterminer les protéines exosomiales dites 'classiques'. Par exemple, TSG101, Alix, MHC Class II, MFGE8, GDI2, HSP90- α , Annexin V, EEF1A1 et la famille des Small GTPase (Rab) sont retrouvées dans plus de 7 analyses protéomiques exosomiales sur un total de 19 comptabilisées dans la banque de données ExoCarta. D'autres familles de protéines sont communément retrouvées dans les préparations exosomiales (347). Les protéines exosomiales retrouvées dans le surnageant des cellules apoptotiques de notre système sont schématisées à la figure 27.

Figure 27 : Schématisation des protéines exosomiales identifiées dans le SSC-apo seulement par spectrométrie de masse en tandem. Générée par I.S.



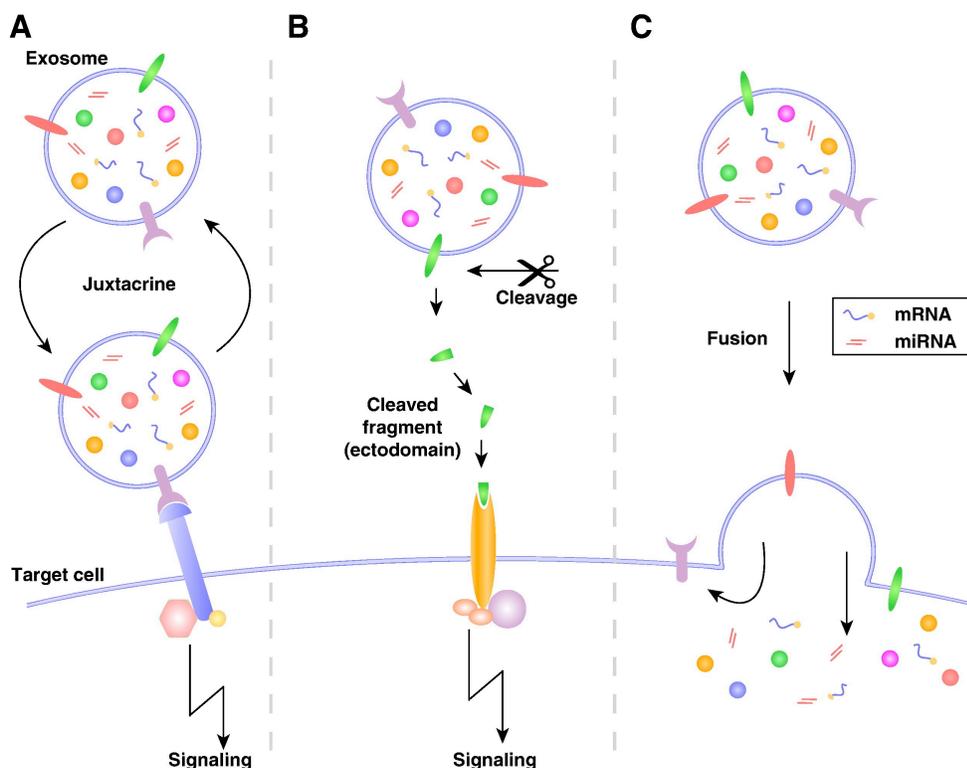
Il a été proposé que certaines protéines retrouvées dans les exosomes puissent être spécifiques à certains types cellulaires, leur conférant ainsi un intérêt particulier concernant leurs fonctions potentielles (326). Par exemple, les exosomes issus de cellules hématopoïétiques ont davantage de protéines associées à la présentation d'antigènes (HLA-DR, CD2, CD37, CD45, CD53, CD86). Les cellules tumorales sécrètent aussi des protéines associées aux exosomes de manière spécifique : Ephrin-B1 (cancer colorectal); MUC18 (mélanome); ERBB2 (cancers du sein et de l'ovaire), FasL (cancer de la prostate, colorectal, ovaire, mélanome); Gag polyprotein, (HIV-infected monocytes-derived macrophages); Major prion protein precursor and scrapie (Prions-infected Rov and Mov cells). J'ajouterais aussi, compte tenu des résultats démontrés dans l'article principal, que l'environnement et les conditions cellulaires puissent aussi influencer le contenu exosomal de différents types cellulaires. Par exemple, TCTP est exporté durant l'apoptose endothéliale mais il ne figure pas dans la banque d'Exocarta malgré que les mécanismes de sécrétion de TCTP via les

exosomes aient été indubitablement décrits. Par conséquent, il est possible que la sécrétion de certaines protéines associées aux exosomes reflètent davantage un changement d'état de la cellule. Cet aspect est documenté dans les exosomes issus de cellules tumorales ayant subi un stress thermique (358). Ces exosomes contiennent davantage de protéines chaperones que les exosomes issus de cellules tumorales non stressées. Compte tenu qu'il existe peu d'études comparatives de sécrétomes, il demeure difficile, mis à part les travaux de cette thèse, de valider cette hypothèse.

Mécanismes d'interaction des exosomes avec les cellules cibles

3 mécanismes ont été proposés concernant les mécanismes de communication intercellulaire initiés par les exosomes tel qu'illustré à la figure 26 (347). Les protéines membranaires distribuées à la surface des exosomes pourraient initialiser une signalisation juxtacrine avec les cellules environnantes (Figure 28 A). De plus, des protéases présentes dans le milieu extracellulaire pourraient générer le clivage d'ectodomains présents à la surface extracellulaire des protéines membranaires exosomiales. Cette modification initierait une signalisation avec les cellules adjacentes (Figure 28 B). Finalement, les exosomes pourraient être endocytosés par les cellules cibles permettant ainsi de transférer leurs cargos (Figure 28 C). Malgré que les exosomes semblent être des entités vésiculaires stables dans le milieu extracellulaire, certains auteurs ont suggéré que les exosomes puissent se désintégrer dans le milieu extracellulaire, libérant ainsi les cargos retrouvés dans la lumière exosomiale. Par contre, compte tenu que les exosomes ont été identifiés morphologiquement et biochimiquement dans différents fluides biologiques (ascites, plasma et urine), et qu'ils puissent être résistant à un processus de congélation, la possibilité qu'ils se désintègrent *in vivo* semble peu probable.

Figure 28: Mécanismes potentiels de communication intercellulaire des exosomes. Reproduit de (347) avec la permission de Elsevier.



Légende : Mécanismes potentiels relatifs à la communication intercellulaire médiée par les exosomes. A. Des protéines membranaires exosomiales peuvent interagir avec des récepteurs d'une cellule cible et activent une signalisation intracellulaire (de manière juxtacrine). B. Des protéines membranaires exosomiales peuvent être clivées par des protéases dans l'espace extracellulaire. Les fragments clivés peuvent ensuite agir à titre de ligand soluble se liant avec un récepteur de la cellule cible. En retour, ce mécanisme active une cascade de signalisation à l'intérieur de la cellule. C. Les exosomes peuvent aussi fusionner avec la membrane de la cellule cible et libérer leur contenu à l'intérieur de la cellule cible de manière non spécifique. La surface membranaire de la cellule cible en retour peut être modifiée par l'addition de nouveaux récepteurs membranaires provenant de la membrane exosomiale ainsi que de différentes compositions lipidiques. Des molécules exosomiales (protéine, mRNA et miRNA) peuvent activer une multitude d'évènements signalétiques chez les cellules cibles.

Activités biologiques des exosomes

À ce jour, la caractérisation des rôles fonctionnels des exosomes demeure un défi académique majeur. Les exosomes auraient des rôles antagonistes dépendamment des stimuli environnementaux que la cellule sécrétant les exosomes expérimente. Des conditions de stress pourraient modifier la composition exosomiale afin de permettre aux cellules environnantes de

s'adapter aux changements rencontrés (290). De plus, durant la maturation des érythrocytes, les exosomes permettent d'exporter le récepteur de la transferrine. Cela permet aux cellules de se débarrasser des récepteurs obsolètes participant ainsi à la terminaison du processus de différenciation (344). Initialement, les exosomes étaient considérés à titre de vidangeurs cellulaires permettant de se débarrasser des protéines désuètes (359). Or, les exosomes transfèrent aussi du matériel moléculaire de manière paracrine, suggérant que leurs activités puissent être fonctionnellement importantes dans différents contextes donnés. Par exemple, les exosomes transportent et transfèrent des agents infectieux incluant les prions et les particules du HIV-1. Les exosomes contenant le PrPscrapie, soit la forme pathogène des prions, sont infectieux et peuvent représenter un moyen d'interchanger du matériel infectieux aux cellules saines sans être éliminé par le système immunitaire (360-362). Parallèlement, les macrophages accumulent des particules HIV-1 dans leurs MVB. Selon l'hypothèse 'Trojan', le rétrovirus HIV dans les cellules infectées peut bourgeonner des cellules infectées via la voie exosomiale permettant ainsi de 'cacher' ses cargos infectieux et d'infecter les cellules saines environnantes (363-365). Finalement, compte tenu le rôle potentiel des exosomes à moduler différentes réponses immunitaires, les exosomes ont été la proie des immunologistes.

Activités immunomodulatrices des exosomes

La particularité des exosomes de transporter du matériel antigénique et des peptides associés aux complexes du CMH a soulevé beaucoup d'enthousiasme concernant leur rôle potentiel à titre d'immunomodulateur. Les exosomes sécrétés par différents types cellulaires pourraient représenter une source exogène d'antigènes pour les APC (290). Par exemple, les exosomes purifiés de surnageant de cellules tumorales en culture ou provenant de liquides ascites de patients ayant des tumeurs contiennent des antigènes tumoraux. Ces antigènes tumoraux initient une réponse cellulaire T spécifique mais requiert la présence de cellules dendritiques (CD) n'ayant jamais rencontré cet antigène afin d'assurer cette activation lymphocytaire (366). Dans cet optique, les CD fournissent le 2^{ème} signal habituellement requis pour le processus de présentation d'antigènes directe ou indirecte.

Compte tenu que les exosomes issus de pratiquement n'importe quelle cellule ont du CMH de classe I fonctionnel à leur surface, ceci suggère qu'ils puissent activer les lymphocytes CD8⁺. *In vitro*, suivant une présentation directe d'antigènes, les exosomes peuvent solliciter une réponse CD8⁺ mais seulement en présence de CD. Parallèlement, les exosomes issus des APC incluant les CD, contiennent beaucoup de molécules associées aux CMH de classe II ayant le potentiel

d'activer une réponse lymphocytaire T CD4⁺ (367). De plus, les molécules du CMH de classe II originent de la voie endocyttaire tardive, tout comme les exosomes, pouvant justifier leur présence au sein de ces nanovésicules.

Les exosomes ont aussi des rôles immunomodulateurs indépendants du processus de présentation d'antigène. Ils partagent des activités à la fois immunosuppressive, anti-tumorale et activatrice de la réponse immunitaire. Par exemple, les exosomes et les microparticules provenant de lignées cellulaires tumorales peuvent induire l'apoptose des cellules T en activant la voie extrinsèque via le récepteur FasL (368, 369). Finalement, les exosomes issus de cellules tumorales ont des fonctions immunitaires activatrices seulement lorsqu'elles ont subi des conditions de stress. Les exosomes issus de cellules tumorales ayant subi un stress thermique sécrètent davantage de HSP70 présent à la surface exosomiale et favorise la migration et l'activité cytolytique des cellules NK (358).

Immunologie vésiculaire, cellules apoptotiques et transplantation

Un nouveau défi dans le domaine de la transplantation consiste à instaurer un état de tolérance du receveur envers le futur greffon transplanté. L'idée repose sur le fait que les CD sont des APC professionnels capables de présenter des alloantigènes provenant du greffon aux cellules T du récipient afin d'induire une réponse de rejet. Toutefois, les CD participent aussi à l'induction et la maintenance d'un processus de tolérance des cellules T, dépendamment de l'état de maturation des CD (313, 370). En absence de stress initial, les CD sont initialement immatures et n'induisent pas de réponse allogénique. Ainsi, différentes approches ont été envisagées afin d'injecter des alloantigènes d'un donneur à un receveur potentiel avant la transplantation afin d'induire un phénomène de tolérance lors de la greffe (371) (372).

Les CD phagocytent les cellules apoptotiques et migrent vers les organes lymphoïdes afin de présenter leur contenu aux cellules T naïves. Une des approches utilisées afin d'induire un état de tolérance consiste à injecter des leucocytes du donneur auxquels on a induit l'apoptose afin qu'ils soient phagocytés par les CD immatures du receveur (373). Cette prémisse s'appuie sur le fait que les cellules apoptotiques précoces semblent inhiber l'activation des CD en diminuant l'activité transcriptionnelle et la sécrétion de cytokines pro inflammatoires (374, 375). De cette façon, les alloantigènes issus des cellules apoptotiques sont présentés en absence de stress associé à la greffe permettant d'induire une tolérance sans créer de réponse immunitaire future et délétère pour le greffon. Une autre approche consiste à injecter de manière intraveineuse des exosomes dérivés des APC du donneur. Ce principe repose sur le fait que les exosomes peuvent transporter du

matériel allogénique et le présenter aux cellules du receveur tel que discuté précédemment. Ainsi, les exosomes dérivés des APC du donneur injectés au receveur avant la transplantation permettrait d'induire une tolérance associée à une diminution de l'incidence de rejet chronique dans différents modèles de transplantation *in vivo* (376, 377).

La sécrétion de médiateurs via la voie exosomiale offre plusieurs avantages afin de propager une communication intercellulaire efficace. Ce type de transport permet entre autre de stabiliser les messagers dans un milieu extracellulaire abondant de protéases et de cellules immunitaires pouvant les intercepter. De plus, ce transport permet de signaler sur une longue distance via la circulation sanguine. Finalement, la voie exosomiale pourrait permettre de délivrer un messager à un type cellulaire spécifique en arborant à la surface des nanovésicules des molécules permettant une reconnaissance spécifique par les cellules cibles. Ainsi, il semble logique que l'apoptose endothéliale associée au développement de la VG puisse être un événement clé permettant de générer des médiateurs nanovésiculaires stables afin de promouvoir des activités de réparation des cellules du mur vasculaire.

La plupart des fonctions associées aux exosomes ont été investiguées d'un point de vue immunologique. De plus, les fonctions de base des nanovésicules libérées par les cellules saines nous sont encore inconnues. En connaissant la composition moléculaire des cargos de ces nanovésicules, il serait intéressant de voir si, à l'état cellulaire normal, leurs fonctions sont similaires ou différentes des nanovésicules générées pendant un processus d'apoptose.

Mis à part leur rôle potentiel dans la présentation d'antigènes provenant du greffon aux cellules APC de l'hôte dans un contexte de transplantation, les travaux issus du présent projet suggèrent qu'ils puissent aussi participer à accentuer le remodelage vasculaire pathologique associé à la VG. Il n'est pas exclu que différentes populations d'exosomes puissent assumer différentes fonctions associées au rejet chronique. Il serait intéressant d'évaluer si les exosomes issus spécifiquement de cellules endothéliales apoptotiques favorisent le processus de présentation d'alloantigènes ou s'ils sont seulement associés à des mécanismes de réparation vasculaire. Somme toute, le fait que l'apoptose endothéliale initie la production de médiateurs anti-apoptotiques via la voie exosomiale ajoute une nouvelle fonction non immunologique aux exosomes et démontre l'importance de l'apoptose endothéliale dans le développement de la VG. Dans un futur rapproché, l'utilisation de ces nanovésicules à titre de bio marqueur de la réparation vasculaire nous permettra peut-être d'assurer un suivi adéquat des différentes manifestations vasculaires associées au rejet chronique

et de développer des approches pharmacologiques afin de réduire cette activité de réparation chronique.

Chapitre 3 - Activités biologiques des Signaux Post Mortem (SPM) de l'apoptose endothéliale

Le but ultime de ce projet consistait à identifier des médiateurs libérés par l'endothélium apoptotique dont les fonctions connues pourraient potentiellement être associées au remodelage vasculaire pathologique caractérisant la VG et l'athérosclérose native. En lien avec l'hypothèse de réponse à l'insulte, nous recherchions des médiateurs appartenant à l'un des quatre groupes suivant : 1) facteurs anti-apoptotiques, 2) facteurs fibrogéniques; 3) protéases impliquées dans la dégradation de la MEC et 4) des fragments de la MEC. Voici un résumé des médiateurs que nous avons biologiquement caractérisés et pertinents au remodelage vasculaire.

1) Médiateurs anti-apoptotiques

TCTP associé aux nanovésicules de type exosomal

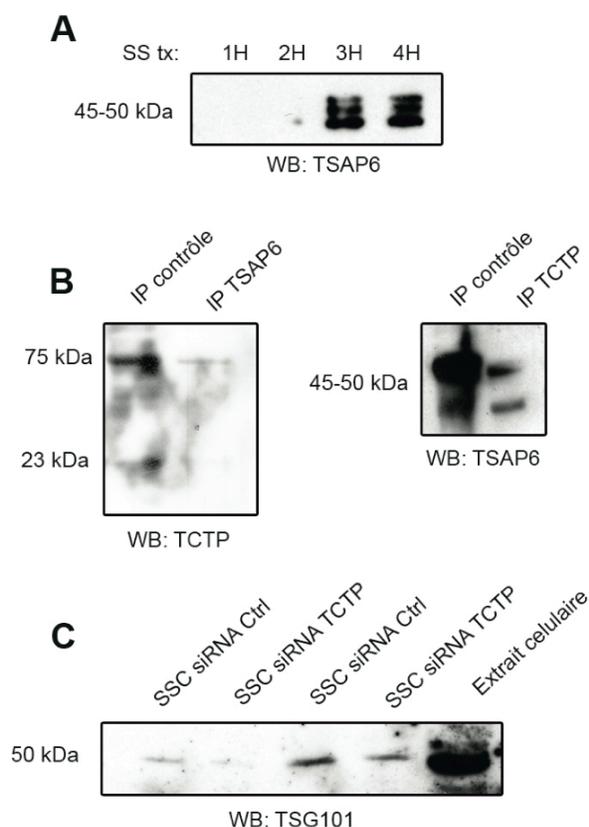
Notre approche s'est révélée très efficace pour l'identification de facteurs anti-apoptotiques pertinents au remodelage vasculaire pathologique. Dans un premier temps, nous avons caractérisé l'activité biologique anti-apoptotique de TCTP sécrété via des nanovésicules de type exosomal, ouvrant ainsi une nouvelle avenue fonctionnelle associée à ces nanovésicules. TCTP a été décrit initialement par le groupe de Brawerman qui avait identifié TCTP dans une tumeur acide murine (378-381). Par la suite, plusieurs études ont décrit TCTP dans différents contextes lui conférant différents noms incluant IgE-dépendent histamine-releasing factor et fortilin. Ses fonctions intracellulaires semblent être diverses; TCTP peut agir à titre de protéines stabilisant les microtubules (382), il peut aussi être anti-apoptotique en s'associant à des protéines pro-apoptotiques (383), et il influence la traduction protéique à titre de 'guanine nucléotide dissociation inhibitor' (384). En ce qui a trait à ses fonctions extracellulaires, la mieux caractérisée avant la publication de ces travaux repose sur sa capacité de sécrétagogue pour les basophiles (385). TCTP isolé de lavages bronchiques de patients atteints d'une pneumonie éosinophilique est capable de sensibiliser les basophiles à sécréter IL-4 et IL-13 (386). De plus, TCTP a été identifié dans les lavages nasaux de patients allergiques. Les travaux présentés dans cette thèse sont les premiers à décrire une fonction extracellulaire anti-apoptotique paracrine de TCTP.

À ce jour, aucun récepteur pour TCTP n'a été décrit. Par contre, plusieurs observations me permettent de proposer que TCTP pourrait interagir avec un récepteur membranaire des CML. En premier lieu, nous avons démontré par microscopie électronique que TCTP est présent à la surface des exosomes et dans les MVB (Figure 3d de l'article principal). Un fait intéressant est que TCTP ne possède pas de signal de sécrétion, suggérant qu'il doit être stabilisé à la membrane via des interactions avec d'autres protéines. Un autre point important est que les nanovésicules issues de CE apoptotiques dont l'expression de TCTP a été invalidée à l'aide d'ARN d'interférence, ne protègent pas contre l'apoptose des CML. Parallèlement, l'activité des surnageants déplétés des nanovésicules (siRNA TCTP et siRNA Ctrl) ne démontre pas d'activité différentielle (Figure 4c. de l'article principal), démontrant la nécessité que TCTP doit être sécrété via des nanovésicules dans notre système. Nous avons aussi démontré à l'aide d'un recombinant TCTP soluble que celui-ci protège l'apoptose des CML via l'activation de la voie ERK1/2, suggérant que TCTP doit activer un récepteur membranaire des CML. Alors, quelles sont les protéines permettant de stabiliser TCTP à la surface des nanovésicules ?

Premièrement, d'après nos résultats, TCTP semble former des oligomères (Figure 3C de l'article principal). Cette observation est corrélée avec des études récentes ayant démontré que l'oligomérisation de TCTP est nécessaire à son activité extracellulaire de sécrétagogue (295). Par conséquent, l'oligomérisation de TCTP à la surface des nanovésicules pourrait lui conférer une certaine stabilité dans le milieu extracellulaire. Ceci pourrait lui permettre d'activer de façon plus efficace un récepteur membranaire X tel que fréquemment observé pour différents ligands extracellulaires. Par exemple, FGF1 doit oligomériser de manière covalente afin d'être exporté et induire une activité extracellulaire angiogénique (387).

Un deuxième candidat potentiel permettant de stabiliser TCTP à la surface des nanovésicules est TSAP6. TSAP6 est une protéine membranaire retrouvée dans les exosomes qui régule et interagit avec TCTP (293, 388). De plus, des résultats préliminaires issus d'une analyse protéomique de la fraction exosomiale du SSC-apo a révélé la présence de TSAP6. Un autre fait intéressant est que TSAP6 est enrichi dans le SSC-apo selon la même cinétique que TCTP et TSG101 (Figure 29 A). Finalement, des résultats préliminaires d'immunodéplétion (Figure 29 B et C) suggèrent que TSAP6 et TCTP pourraient former un complexe au sein des nanovésicules TCTP^{+ve}.

Figure 29: TSAP6 et TSG101 et leurs interactions avec TCTP dans le SSC-*apo*.

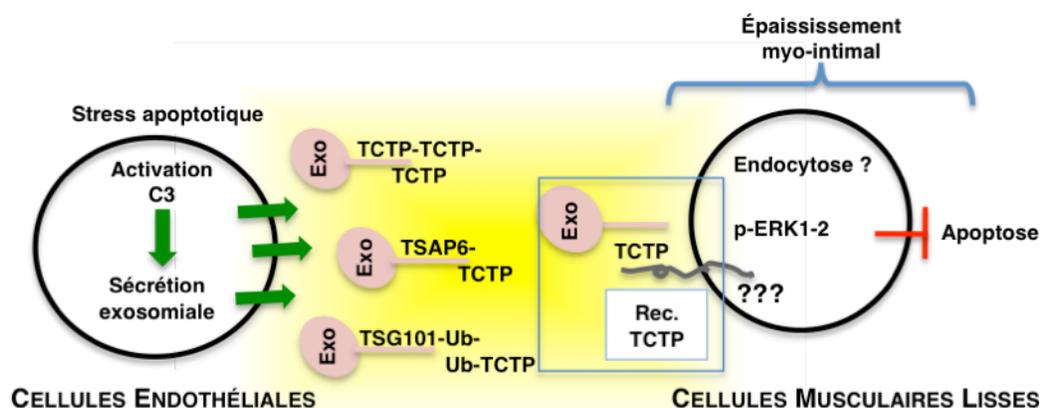


Légende : A) Présence de TSAP6 dans un volume équivalent de surnageant de CE apoptotiques incubées dans du milieu sans sérum SS de 1 à 4 hres. Les SSC correspondants ont été isolés et précipités au TCA afin de procéder aux analyses d'immunobuvardages dirigées contre TSAP6. Représentatif de 2 expériences. B) Des expériences préliminaires d'immunodéplétion révèlent une interaction potentielle entre TSAP6 et TCTP. En immunodéplétant TSAP6 dans un volume équivalent de SSC, on diminue les niveaux détectables de TCTP comparativement à l'IP contrôle. Inversement, en immunodéplétant TCTP, on diminue aussi les niveaux de TSAP6. C) L'inactivation de TCTP dans les CE par siRNA diminue les niveaux de TSG101 dans le milieu conditionné produit par les CE apoptotiques. Dans un volume équivalent de SSC, les niveaux de TSG101 ont été évalués par immunobuvardage (duplicata) dans les SSC produits par les CE apoptotiques invalidées pour l'expression de TCTP (SSC siRNA TCTP) et comparés au siRNA contrôle (SSC siRNA Ctrl). Travaux non publiés et générés par I.S. dans le laboratoire du Dre Marie-Josée Hébert en 2008.

Une 3^{ème} possibilité permettant de stabiliser TCTP implique la protéine exosomiale TSG101. Ce facteur est impliqué dans le chargement des protéines dans les ILVs des MVB. TSG101 est ubiquitiné et cette modification post-traductionnelle permettrait de lier des cargos eux aussi

ubiquitinés et de les charger dans les ILVs des MVBs. Ainsi, il est possible que les formes de haut poids moléculaire de TCTP puissent représenter des modifications post-traductionnelles de TCTP, incluant l'ubiquitination. De plus, il a été proposé que l'ubiquitination des protéines chargées dans les nanovésicules des MVB puissent servir de signal de localisation dans les MVB. Des résultats préliminaires suggèrent une interaction potentielle entre TCTP et TSG101 dans le surnageant des CE apoptotiques. Le milieu conditionné par des CE apoptotiques invalidées pour l'expression de TCTP montre une diminution significative de la présence de TSG101 (Figure 29 C). Par conséquent, les possibilités expliquant cette diminution sont soit que TCTP régule directement la formation des nanovésicules dans les MVBs, soit que TSG101 est lié avec TCTP et l'absence de TCTP diminue la présence de TSG101 dans le milieu extracellulaire.

Figure 30 : Schématisation des partenaires potentiels de TCTP à la surface des nanovésicules issues de l'apoptose endothéliale. Se référer au texte pour la description de ce schéma. Générée par I.S.



En résumé, TCTP semble interagir avec plusieurs protéines associées aux exosomes lui permettant probablement ainsi soit d'activer directement un récepteur membranaire des CML soit de favoriser l'endocytose des nanovésicules par les CML afin de promouvoir de manière paracrine l'inhibition de l'apoptose (Figure 30).

EGF

L'importance de EGF à titre de facteur anti-apoptotique actif chez les MSC a été démontré suivant son identification dans la sécrétion des CE apoptotiques (285). L'étude de EGF fût priorisée parmi d'autres facteurs compte tenu qu'il était le seul facteur de croissance dont l'identification avait été

confirmée par 2 de nos 3 approches MSMS. EGF coopère avec un fragment du perlecan, le LG3, que le laboratoire a caractérisé auparavant (281, 283) afin d'activer la voie ERK 1-2 dans les MSC soumises à un stress apoptotique, récapitulant ainsi des événements associés à la VG et à l'athérosclérose native.

2) Protéases et dégradation de la MEC

La dégradation de la MEC par différentes métalloprotéinases matricielles (MMP et ADAMs) durant le remodelage vasculaire représente une étape importante permettant la migration cellulaire et la génération de facteurs bioactifs permettant la prolifération des CML. Nous avons démontré que différentes protéases sont enrichies dans le milieu conditionné par les CE apoptotiques dont ADAM17, Cathepsin L, ADAMTS4, SPUVE et t-PA (284). Un fait intéressant est que ADAM17 est retrouvé dans les MVB ainsi que dans des préparations exosomiales, suggérant que ce médiateur pourrait emprunter une voie non classique de sécrétion de type exosomal. Finalement, nous avons démontré que la Cathepsin L est sécrétée spécifiquement suivant l'activation de la caspase-3. La Cathepsin L contribue à la protéolyse du perlecan afin de générer un fragment bioactif, le LG3, ayant des propriétés anti-apoptotiques chez les CML et les MSC (281, 284, 285). De manière analogue à ADAM17, la Cathepsin L a été localisée dans les MVB de fibroblastes fusionnant avec la membrane plasmique, ajoutant ainsi des évidences que ce médiateur pourrait aussi être sécrété via la voie exosomiale (389).

Finalement, l'identification de composantes de la MEC dans le sécrétome des CE apoptotiques s'est avérée peu fructueuse. En fait, l'approche protéomique nécessite une étape de digestion à l'aide de la trypsine afin de générer des peptides ionisables durant le processus d'ionisation en spray. Or, selon notre hypothèse que la MEC est dégradée durant l'apoptose, la digestion partielle des fragments de la MEC avant de procéder à une 2^{ème} étape de digestion complexifierait davantage l'identification des fragments de la MEC. Par conséquent, nous n'avons pas été en mesure d'identifier des composantes de la MEC dégradée durant l'apoptose selon nos critères de sélection du Table 1 de l'article principal.

3) CTGF à titre de médiateur fibrogénique

Aucune protéine ayant des fonctions fibrogéniques connues n'a été identifiée selon nos critères initiaux. Cet aspect était surprenant compte tenu que le Dr Patrick Laplante dans notre laboratoire avait démontré que le milieu conditionné par les CE apoptotiques induisait la différenciation myofibroblastique de manière TGF- β indépendante (282). Or, en modifiant nos critères de

sélection, nous avons identifié CTGF avec un ratio d'abondance 2.5x plus élevé dans le SSC-apo comparativement au SSC-no-apo (286). Des analyses d'immunobuvardages ont permis de valider cette différence d'abondance entre le SSC-apo et le SSC-no-apo. De plus, nous avons démontré que l'activation de la caspase-3 régule la sécrétion de CTGF, tout comme TCTP et la Cathepsin L. L'importance de CTGF *in vivo* concernant sa participation dans la réponse fibrogénique dermique a été démontrée dans un modèle murin par le Dr Patrick Laplante (286). CTGF possède un signal peptidique mais ses mécanismes de sécrétion ne sont pas encore connus. Des résultats préliminaires issus d'analyses protéomiques effectuées directement sur la préparation exosomiale du SSC-apo ont révélé la présence de CTGF. Par conséquent, il est possible que la sécrétion de ce facteur soit reliée à des modes de sécrétion classique et non classique.

En résumé, notre approche protéomique nous a permis de caractériser différentes fonctions du sécrétome des CE apoptotiques pertinentes au contexte de réparation vasculaire. Tel que discuté dans l'introduction de cette thèse, les mécanismes de réparation vasculaire sont initialement bénéfiques et leurs actions pathologiques sont conséquentes à la persistance d'un stress apoptotique chronique. De manière intéressante, notre approche protéomique n'a pas révélé la présence de cytokines suggérant que l'apoptose endothéliale favorise davantage des processus de réparation vasculaire que l'activation de la réponse immunitaire.

Compte tenu que l'apoptose et l'activation de la caspase 3 initient aussi la sécrétion de médiateurs impliqués dans l'inhibition de la réponse inflammatoire via la régulation du trafic leucocytaire (279, 280, 314, 315), je propose que la phase effectrice de l'apoptose génère et régule la production de signaux post mortem (SPM) de nature diversifiée (soluble, microparticulaire et nanovésiculaire) dont leurs actions '*après la mort; post mortem*' permettent d'engendrer une réponse multifonctionnelle et intercellulaire régulant la réparation et le remodelage vasculaires (Tableau 3). Selon cette définition, les corps apoptotiques sont aussi des SPM compte tenu qu'ils sont générés durant l'apoptose et qu'ils participent au 'homing' des EPC des CML aux sites d'insultes (337). Parallèlement, les microparticules peuvent aussi être catégorisées à titre de SPM. Elles participent fonctionnellement à l'état pro-coagulant de l'endothélium apoptotique, représentant un mécanisme additionnel de communication intercellulaire généré durant l'apoptose endothéliale visant la réparation de l'endothélium stressé.

Tableau 3: Les signaux post mortem (SPM) de l'apoptose et leurs fonctions associées au trafic leucocytaire et au remodelage vasculaire pathologique. Généré par I.S.

Type cellulaire apoptotique	SPM (Signaux post mortem)	Fonctions biologiques	Type de cellules cibles	Conséquences
Fonctions associées au trafic leucocytaire				
Burkitt Lymphoma	Lactoferrin	"Don't eat me" signal Inhibe la migration	Neutrophiles	Inhibition de la réponse inflammatoire et élimination des corps apoptotiques
Tous les types cellulaires	Phosphatidylserine (PS) à la surface extracellulaire	"Eat me" signal Reconnaissance et phagocytose des corps apoptotiques	Monocytes Macrophages professionnels	
HT29-Cos7-MCF7-L929	Lysophosphatidylcholine (LPC)	"Come here" signals		
Lymphocytes MCF7	Fractalkine	Migration		
Fonctions associées à la réparation vasculaire				
Endothélium vasculaire	Solubles: LG3, EGF	Anti-apoptotique	CML et MSC	Épaississement myo-intimal
	Nanovésiculaire: Nanovésicules TCTP ⁺ de type exosomal		CML et fibroblastes	
	Soluble et/ou nanovésiculaire : CTGF	Fibrogénique	Fibroblastes	Différenciation myofibroblastique
	Corps apoptotiques	'Homing'	EPC et CML	Ré-endothélialisation
	Microparticules	Pro-coagulant	Plaquettes	Épaississement myo-intimal

Autres médiateurs issus de l'apoptose endothéliale pertinents au remodelage vasculaire

À l'aide d'une revue de la littérature, les médiateurs présents dans les tableaux 1 et 2 de l'article principal et décrits dans les paragraphes suivants nous indiquent que le testament protéique et vésiculaire de l'apoptose regorge d'informations pertinentes relatives aux rôles des nanovésicules dans la communication intercellulaire du mur vasculaire. En plus des SPM que nous avons identifiés et fonctionnellement caractérisés, notre approche protéomique non biaisée a permis d'identifier au moins quatre SPM ayant des fonctions pertinentes au remodelage vasculaire : phospholipase A2 groupe IID (PLA2G2D), tissue plasminogen activator (tPA), heat shock protein 90 alpha (HSP90- α) et low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1). L'approche protéomique utilisée dans ce projet offre un bel exemple d'hypothèses générées à partir de données obtenues à l'aide de quelques expériences générant des quantités impressionnantes d'informations.

Phospholipase A2, groupII D (PLA2G2D)

PLA2G2D appartient à la famille de phospholipases sécrétées (sPLA₂) catalysant l'hydrolyse de glycérophospholipides membranaires permettant de libérer des acides gras et des lysophospholipides (390). De manière intéressante, sPLA2A2, une autre phospholipase sécrétée, a récemment été démontrée à titre de biomarqueur et de médiateur déterminant dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose, démontrant une pertinence évidente dans le contexte d'étude de ce projet (391-393). En plus de leur participation enzymatique dans le transport inverse du cholestérol, les sPLAs lient une panoplie de ligands extracellulaires incluant des intégrines, des protéoglycans de type heparan sulfate, des facteurs de coagulation qui régulent l'inflammation et l'activation du système immunitaire (390). Un point très intéressant est qu'il a été démontré que l'activation de la caspase-3 induit l'activation de PLA2 cytosolique et celle-ci, en partenariat avec une sPLA, permettrait de dégrader le lysophosphatidylcholine (LPC), soit un SPM d'origine lipidique permettant le chimiotactisme des macrophages professionnels afin de phagocytoser les corps apoptotiques (279). Un point encore plus important est que PLA2DG2 est spécifiquement sécrété via la voie exosomiale et permet de transférer de manière intercellulaire des molécules inflammatoires, incluant les prostaglandines (394). Somme toute, ces différentes observations nous permettent de proposer que l'apoptose endothéliale et la sécrétion subséquente de nanovésicules permettent d'initier une communication intercellulaire particulièrement pertinente dans un contexte pathologique de remodelage vasculaire.

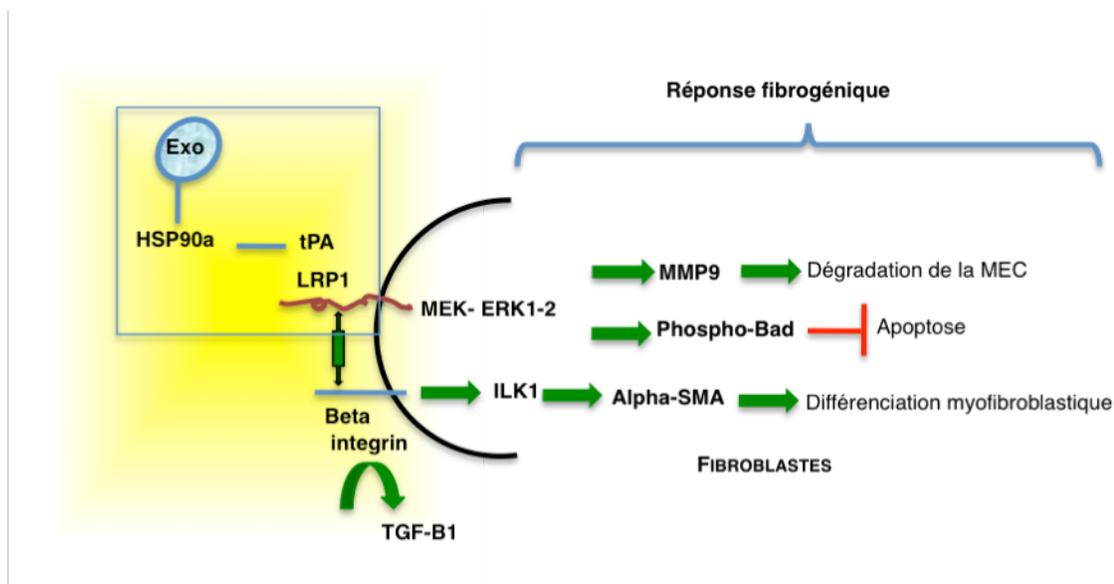
Tissue Plasminogen Activator (tPA ou PLAT)

Jusqu'à tout récemment, on croyait que la fonction unique du tissu plasminogen activator (tPA ou PLAT) était associée à la protéolyse du plasminogen afin de générer la plasmine nécessaire à la dissolution des thrombi. Le tPA possède plusieurs propriétés lui permettant d'être catégorisé à titre de cytokine et il partage beaucoup de similarités structurales avec le HFG (hépatocyte growth factor). Le circuit signalétique de tPA lui conférant le titre de cytokine implique l'interaction d'un ligand soluble (tPA) avec un récepteur transmembranaire (LRP1), l'activation d'une signalisation intracellulaire incluant la voie ERK 1/2 et la régulation directe de l'expression d'un gène cible, soit MMP9 (395). Les 2 seuls récepteurs connus à ce jour pour le tPA sont Annexin II et le LRP1. De manière intéressante, LRP1 est un médiateur que nous avons aussi identifié dans le sécrétome des CE apoptotiques.

Le tPA semble participer à différentes pathologies fibrotiques rénales dépendamment de sa localisation dans le rein (395). Sa fonction protéolytique associée à la plasmin permettrait d'améliorer les lésions fibrotiques dans les maladies glomérulaires (non associée au remodelage vasculaire pathologique) (396) tandis que sa fonction à titre de cytokine accentuerait la fibrose interstitielle rénale associée à la VG et ce, indépendamment de sa fonction protéolytique (397, 398). De plus, l'augmentation du tPA extracellulaire est associée à un stress d'ischémie reperfusion dans un modèle rénal d'obstruction urétral unilatéral (399) et le tPA co-localise avec les myofibroblastes activés exprimant *de novo* le α -SMA (400). Ces évidences expérimentales soutiennent nos résultats concernant l'activité fibrogénique partielle du CTGF comparativement au SSC-apo complet dans le développement de la fibrose. Nos observations suggèrent que l'apoptose endothéliale génère différents médiateurs impliqués dans la fibrose interstitielle, incluant le CTGF et potentiellement le tPA.

L'étude de souris invalidées pour l'expression du tPA a permis de révéler beaucoup d'informations concernant le rôle du tPA dans le développement de la fibrose interstitielle rénale (399). Le tPA complexé avec le LRP1 présent à la membrane des fibroblastes rénaux permet d'initier une réponse fibrogénique précédée d'une activation de la voie MAPK ((Figure 30). L'activation de la voie MEK1-ERK 1/2 suivant une stimulation avec le tPA permet la transcription et l'expression de MMP9 (401). En plus d'augmenter l'expression de MMP9, le tPA complexé avec le LRP1 permet de protéger les fibroblastes et les myofibroblastes contre l'apoptose suivant la phosphorylation de Bad et l'inhibition de la voie apoptotique intrinsèque (402). Finalement, la phosphorylation intracellulaire du récepteur LRP1 permettrait d'activer des intégrines β 1 et l'activation de ILK-1, qui de concert avec TGF- β 1, participent à la différenciation myofibroblastique caractérisée par l'expression de α -SMA et le collagène de type 1 (400). L'action combinatoire de tPA, LRP1 et MMP9 permettrait la dégradation de la membrane tubulaire basale du rein nécessaire à la transition épithéliale-mésenchymale tandis que la survie des myofibroblastes permettrait de perpétuer la réponse fibrotique. Finalement, tel que discuté dans les paragraphes suivants, le tPA extracellulaire peut s'associer à une protéine exosomiale, HSP90- α , formant ainsi des plateformes signalétiques de nature nanovésiculaire. Ces plateformes permettraient une communication intercellulaire afin de propager une réponse fibrogénique (Figure 31).

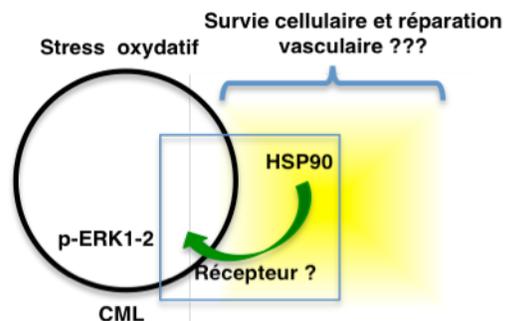
Figure 31: Le tPA et la réponse fibrogénique. Illustration des travaux provenant de (399) (402).
Générée par I.S.



Heat Shock Protein 90 alpha (HSP90- α)

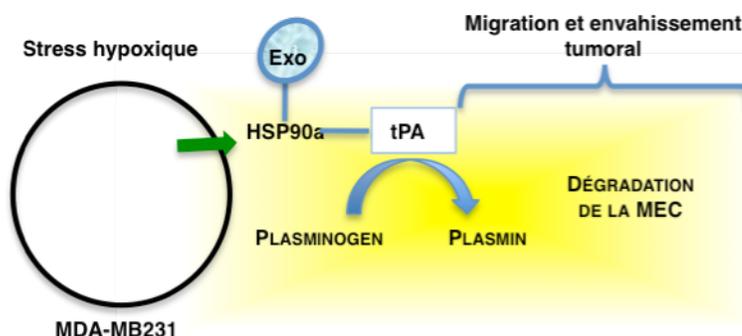
HSP90- α est une protéine exosomiale que nous avons identifiée dans le SSC-apo (Table 2 de l'article principal) et ses multiples interactions connues lui confèrent un intérêt particulier. D'abord, HSP90- α a récemment été démontré à titre de biomarqueur potentiel d'athérosclérose chez les patients dialysés (403-406). La fonction la plus connue de HSP90- α est attribuable à son activité de chaperone permettant d'assurer une conformation adéquate de différentes protéines. Un point intéressant concernant HSP90- α et notre modèle est que son export extracellulaire a été démontré dans différents modèles cellulaires associés à des stress oxydatif, hypoxique et inflammatoire (407-410). Par exemple, tel qu'illustré dans la Figure 32, les CML exposées à un stress oxydatif sécrètent abondamment HSP90- α qui de manière autocrine induit l'activation la voie ERK 1/2 (410). Malgré que la fonction extracellulaire de HSP90- α était inconnue à l'époque, les auteurs suggéraient tout de même que les facteurs libérés par les CML suivant un stress oxydatif (SOXF) pourraient représenter un mécanisme de survie et de réparation vasculaire.

Figure 32: HSP90- α est sécrété suivant un stress oxydatif et active la voie ERK 1/2 de manière autocrine chez les CML. Illustration des travaux provenant de (410). Générée par I.S.



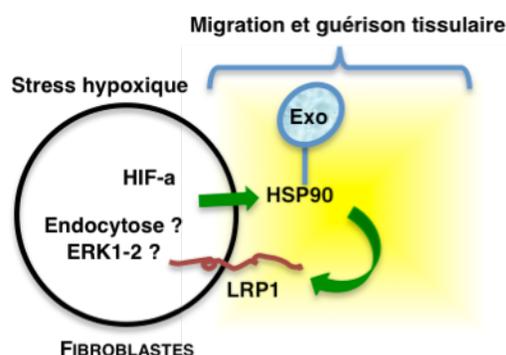
HSP90- α exosomal coopère aussi avec le tPA afin de promouvoir la dégradation de la MEC et la motilité de cellules cancéreuses suivant un stress hypoxique (409) (Figure 33). Suivant le relargage extracellulaire de tPA via la fusion des WBPs et la membrane plasmique, le tPA s'associe de manière extracellulaire aux nanovésicules sécrétées durant le stress cellulaire, incluant HSP90- α , permettant ainsi de générer des complexes de signalisation pertinents pour la dégradation de la MEC et le remodelage vasculaire pathologique.

Figure 33 : HSP90- α exosomal et le tPA coopèrent à la dégradation de la MEC, la migration et envahissement tumoral. Illustration des travaux provenant de (409). Générée par I.S.



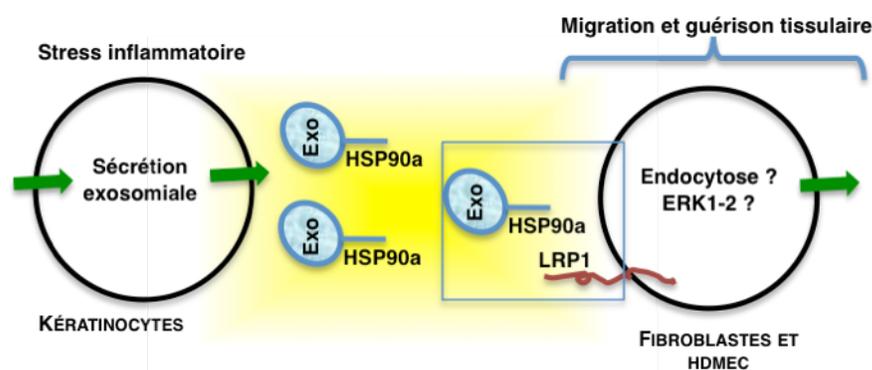
Trois études récentes ont aussi démontré le rôle de HSP90- α exosomal dans la migration et la guérison cellulaire suivant des stress hypoxique et inflammatoire (407, 408, 411). Ainsi, HSP90- α interagirait de manière autocrine avec LRP1 suivant un stress hypoxique permettant ainsi la migration et la guérison tissulaire des fibroblastes (408) (Figure 34).

Figure 34. HSP90- α exosomal et LRP1 initie, de manière autocrine, la migration tissulaire suivant un stress hypoxique. Illustration des travaux provenant de (408). Générée par I.S.



Finalement, HSP90- α exosomal faciliterait une communication intercellulaire entre les kératinocytes et les fibroblastes et les HDMEC impliqués dans la 2^{ème} vague de migration cellulaire nécessaire au processus de cicatrisation dermique. Suivant un stress inflammatoire, des exosomes sécrétés par les kératinocytes contenant HSP90- α permettraient d'initier la migration des fibroblastes et des HDMECs au site d'insulte, via une association avec le récepteur membranaire LRP1 de ces cellules cibles (Figure 35) (411). Une particularité importante de ces observations est que l'effet paracrin de HSP90- α est prépondérant dans un environnement riche en TGF- α qui, en temps normal, inhibe la migration des fibroblastes et des HDMECs.

Figure 35. Stress inflammatoire et communication intercellulaire via HSP90- α exosomal et LRP1 sur les cellules cibles. Illustration des travaux provenant (411). Générée par I.S.



En résumé, HSP90- α est une protéine exosomiale permettant l'interaction des nanovésicules extracellulaires avec différents facteurs solubles ou membranaires favorisant ainsi une communication intercellulaire impliquée dans la migration cellulaire et la guérison tissulaire. Il ne

serait pas étonnant que HSP90- α participe à différents mécanismes paracrins impliqués dans le remodelage vasculaire pathologique.

Low Density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)

Plusieurs caractéristiques relatives à LRP1 m'ont menées à étudier son rôle potentiel dans le remodelage vasculaire pathologique et à justifier sa présence dans le sécrétome des CE apoptotiques. LRP1 est une protéine membranaire de type I appartenant à la famille LDLR (low density lipoprotein receptor) regroupant LDLR, VLDLR, LRP8, MEGF7 (LRP4), LRP1B et LRP2 (412). LRP1 est abondamment exprimé dans les hépatocytes et les macrophages du foie et participe à l'endocytose et la dégradation de différentes protéines plasmatiques incluant des facteurs de coagulation activés, des complexes protéases-inhibiteurs et les chylomicrons (412-414). LRP1 est abondamment exprimé dans le système neuronal et des évidences suggèrent qu'il puisse participer dans la transmission synaptique possiblement via une coopération avec le tPA (415-419). De plus, il a été proposé que la portion cytoplasmique de LRP1 pourrait être un acteur initial dans l'induction de la mort cellulaire induite par un stress ischémique en amont de l'activation de la caspase-3 (420). LRP1 participerait aussi à la migration cellulaire via la modulation de la signalisation des intégrines en collaboration avec des composantes de la MEC (421, 422). D'autres évidences démontrent que LRP1 exprimé par les macrophages favoriserait la phagocytose des corps apoptotiques (423). Finalement, la distribution de LRP1 est ubiquitaire dans le mur vasculaire et la délétion de ce gène *in vivo* a pour effet d'accélérer le développement de l'athérosclérose (412). Par conséquent, il existe une littérature émergente associée au rôle protecteur de LRP1 en réponse à l'insulte.

Une caractéristique très intéressante concernant LRP1 est reliée au fait qu'il régule négativement la voie de signalisation PDGF impliquée dans la prolifération des CML et l'épaississement myo-intimal (418, 424-428). La plupart des expériences démontrant que LRP1 est essentiel à la régulation de la voie PDGF et à la protection contre le développement de l'athérosclérose reposent sur des modèles murins où l'expression génique de LRP1 a été invalidée. Ainsi, en absence de LRP1, la voie PDGF est maintenue favorisant la migration et la prolifération des CML. Par contre, la mécanistique moléculaire protectrice de LRP1 n'est toujours pas connue.

Deux mécanismes ont été proposés afin d'expliquer l'activité protectrice de LRP1 dans ce contexte. En premier lieu, il a été démontré que la portion extracellulaire de LRP1 lie le PDGF-bb et pourrait contribuer à diminuer sa disponibilité dans le milieu extracellulaire via l'endocytose de ce complexe (Figure 34). La deuxième possibilité repose sur l'hypothèse que LRP1 régule le trafic intracellulaire et extracellulaire du récepteur PDGF (PDGFR β) une fois que celui-ci est activé par le ligand PDGF-bb. LRP1 pourrait simplement favoriser l'endocytose du complexe PDGF-bb et de son récepteur et influencer leur trafic dans la voie endocytaire. Ainsi, les niveaux d'expression du récepteur PDGFR β pourraient diminuer via sa relocalisation dans la voie de dégradation lysosomiale dirigé par LRP1 (Figure 34) (425, 428).

Par conséquent, la présence de LRP1 à la membrane cellulaire des CML semble protéger contre l'épaississement myo-intimal. Toutefois, selon notre hypothèse initiale, nous suggérons plutôt que les médiateurs libérés durant l'apoptose endothéliale accentuent le remodelage vasculaire. De plus, nous avons démontré antérieurement que le SSC-apo a des effets pro-prolifératifs chez les CML (travaux non publiés). Alors, comment réconcilier la présence de LRP1 dans le SSC-apo et ses effets potentiellement pro-prolifératifs associés au remodelage vasculaire pathologique? L'identification de LRP1 et LRP2 dans des préparations exosomiales, leur localisation dans les MVB et les endosomes, leur enrichissement spécifique dans le sécrétome des CE apoptotiques (Table 1 de l'article principal) et l'abondance évidente de nanovésicules dans le SSC-apo m'ont influencé à évaluer l'hypothèse que LRP1 puisse être associé aux nanovésicules issues de l'apoptose endothéliale suivant une fusion des MVB avec la membrane plasmique. LRP1 exosomal pourrait agir à titre de médiateur pro-prolifératif chez les CML via l'activation paracrine de la voie PDGF.

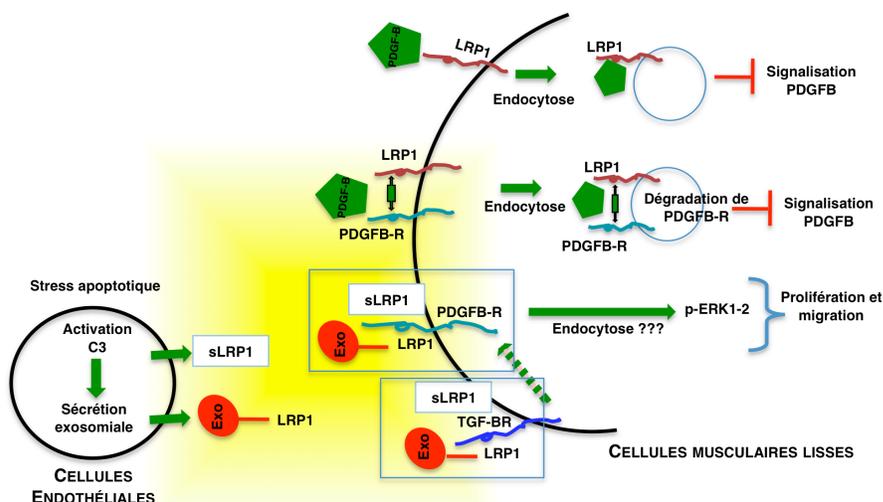
La portion extracellulaire de LRP1 peut être clivée afin de générer un fragment de 515 kDa dont les sites d'interaction avec ses ligands demeurent fonctionnels, incluant le tPA et le récepteur PDGFR β (429-431). En lien avec cette observation, les 2 fragments du LRP1 que nous avons identifiés appartiennent à la portion extracellulaire de LRP1. Deuxièmement, les ADAMs 10 et 17 sont impliquées dans la protéolyse du fragment extracellulaire de LRP1, tout comme pour L1CAM, une protéine membranaire exportée via la voie exosomiale que nous avons aussi identifiée dans le SSC-apo (voir plus loin, Tableau 4 Groupe 1). Ce qui est particulièrement intéressant concernant la génération de L1CAM soluble et exosomal, est qu'il a été démontré que ADAM10 et 17 colocalisent avec L1CAM dans les MVB. (432). En fait, le clivage de L1CAM aurait lieu à la membrane

plasmique et dans les MVB afin de générer deux formes de L1CAM, soluble ou associée aux exosomes, et redistribuées extracellulairement via la fusion des MVB avec la membrane plasmique.

Ainsi, suivant le même raisonnement selon lequel 1) LRP1 est présent dans les MVB et les exosomes; 2) ADAM10 et 17 clivent LRP1, 3) ADAMs 10 et 17 sont présents dans les exosomes et les MVB et 4) ADAM17 a aussi été identifié dans le SSC-apo, l'apoptose endothéliale pourrait générer soit une forme soluble de LRP1 (sLRP1), soit favoriser l'export extracellulaire de LRP1 associé aux nanovésicules (LRP1-exo) localisées dans les MVB qui fusionnent avec la membrane plasmique durant l'apoptose endothéliale. Ce stratégie permettrait de redistribuer LRP1 dans le milieu extracellulaire où sa portion extracellulaire pourrait interagir avec un récepteur des CML (par exemple, PDGFR β et TGF- β R) permettant ainsi de favoriser la prolifération des CML.

Il existe peu d'information concernant l'activité extracellulaire de sLRP1. De manière intéressante, il a été démontré que la présence de sLRP1 dans le plasma et dans le surnageant cellulaire est issue d'un stress ischémique ou inflammatoire (429). De plus, une étude récente a démontré que sLRP1 incubé avec des macrophages initie l'activation de la voie MAPK et la production de molécules inflammatoires via un récepteur non caractérisé (429). Il a été proposé que sLRP1 interagisse avec un récepteur différent de LRP1 présent à surface membranaire des cellules cibles, détournant ainsi la possibilité que sLRP1 bloque l'activité de LRP1 natif et membranaire. Compte tenu que la portion extracellulaire de LRP1 membranaire interagit avec le récepteur PDGFR β et que sLRP1 conserve sa capacité à lier ses ligands habituels (418), sLRP1 ou LRP1-exo pourrait directement activer la voie PDGF via une interaction extracellulaire de PDGFR β présent à la surface des CML. sLRP1 ou LRP1-exo permettrait de maintenir une activation soutenue de la voie PDGF impliquée dans la prolifération des CML (Figure 36, encadré). Finalement, LRP1 a récemment été identifié à titre de récepteur du TGF- β (TGF-R β -V) et pourrait signaler des événements en amont de l'activation de la voie PDGF qui est régulée par la voie TGF- β (Figure 36, encadré). Concrètement, il a été démontré que l'activation de PDGFR β coopère avec la voie TGF- β afin de recruter PI3K aux résidus tyrosines phosphorylés de PDGFR β activé permettant la migration des CML (428). Par conséquent, il serait envisageable que sLRP1 ou LRP1-exo puisse activer la voie TGF- β en amont de la voie PDGF.

Figure 36 : Schématisation des mécanismes de signalisation potentielle de sLRP1 ou LRP1-exo. Se référer au texte pour la description de ce schéma. Générée par I.S.

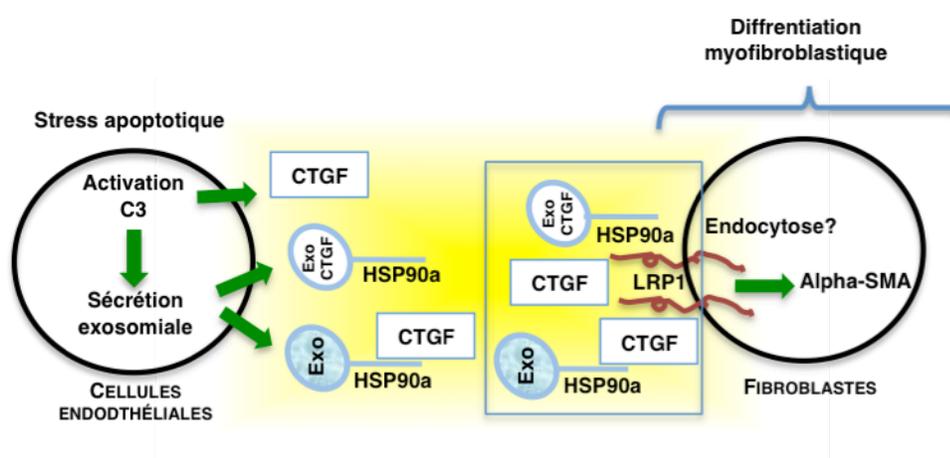


Ces aspects nous permettraient de réconcilier la présence de LRP1 dans le sécrétome des CE apoptotiques et son rôle potentiellement antagoniste à sa fonction intracellulaire athéroprotecteur si bien décrite dans la littérature.

Il est intéressant de noter que 3 protéines de la famille LRP, i.e. LRP2, LRP8 et MEGF7 ont été identifiées dans le SSC-apo à l'aide d'une des 3 approches protéomiques que nous avons effectuées. Certaines fonctions de ces protéines sont similaires à LRP1. Par exemple, LRP2 (Megalin) est un récepteur endocyttaire et régule la disponibilité de molécules extracellulaires signalétiques et MEGF7 aurait un rôle dans le développement (418). Ce dernier a été identifié avec un ratio de 3.0 x plus élevé dans le SSC-apo que le SSC-no-apo. De plus, MEGF7 a été identifié par spectrométrie de masse en tandem dans une préparation exosomiale purifiée à partir du SSC-apo (travaux non publiés). Par conséquent, il est possible, tel que discuté dans le chapitre précédent, que l'apoptose endothéliale favorise la fusion de différentes populations hétérogènes de MVB avec la membrane plasmique, incluant des MVB de recyclage, expliquant ainsi la présence de protéines membranaires dans le SSC-apo. Toutefois, il sera intéressant de voir si cette export cellulaire a pour but de redistribuer de manière paracrine des médiateurs pertinents au remodelage vasculaire ou si cela représente un phénomène généralisé de fusion des MVB hétérogènes avec la membrane plasmique durant l'apoptose.

Un dernier point important relatif à LRP1 et le remodelage vasculaire pathologique est que LRP1 présent à la surface des fibroblastes lie le CTGF que nous avons identifié dans le sécrétome des CE apoptotiques (286). Conséquemment aux arguments proposés relatifs à la sécrétion exosomiale potentielle de CTGF, ce dernier pourrait soit être sécrété sous une forme soluble s'associant par la suite aux nanovésicules sécrétées durant l'apoptose endothéliale, soit être directement sécrété dans les nanovésicules arborant HSP90- α à leur surface permettant de lier le LRP1 membranaire des fibroblastes. Ainsi, les nanovésicules issues de l'apoptose endothéliale pourraient propager une réponse de réparation vasculaire de nature fibrogénique. Compte tenu le rôle important de LRP1 à titre de récepteur impliqué dans l'endocytose, il ne serait pas étonnant que LRP1 soit un récepteur commun permettant l'endocytose des nanovésicules endothéliales (Figure 37).

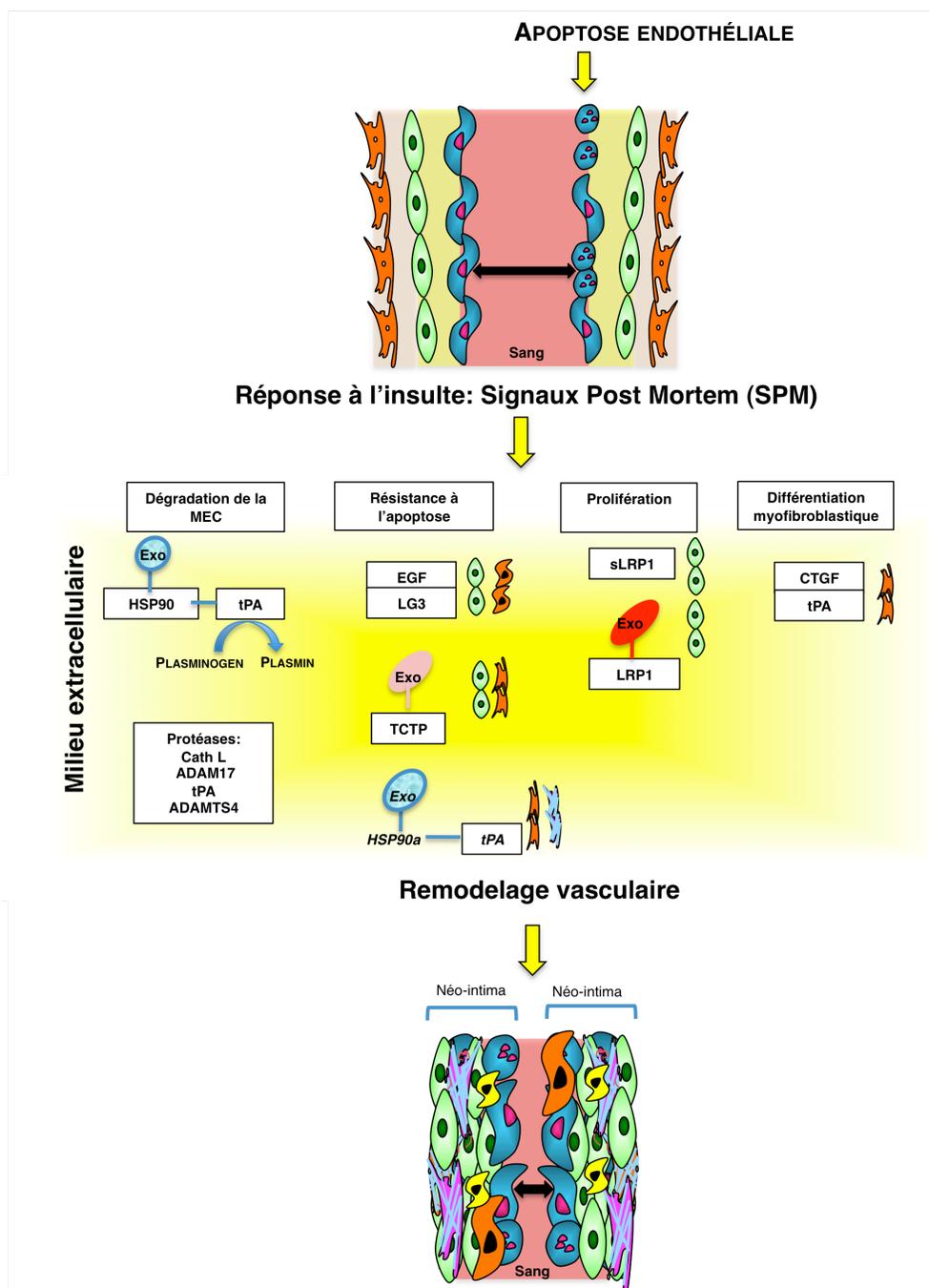
Figure 37. Illustration des mécanismes paracrins potentiels de CTGF soluble ou exosomal sur la différenciation myofibroblastique. Générée par I.S.



En ciblant des fonctions associées au remodelage vasculaire pathologique caractérisant la VG et l'athérosclérose, notre approche protéomique a permis de mieux définir certains médiateurs incluant TCTP, EGF, Cathepsin L et le CTGF. En plus de ces médiateurs, nos analyses protéomiques ont révélé la présence de d'autres médiateurs associés à des voies de sécrétion non classique incluant PLA2G2D, tPA, HSP90- α et LRP1. Une revue de la littérature a permis de révéler que l'utilisation d'un transport nanovésiculaire semble être initiée en réponse à des conditions de stress et peuvent avoir des répercussions cellulaires autocrine et paracrine (Figure 38). Les nombreux exemples illustrés précédemment révèlent que les SPM associés aux

nanovésicules puissent avoir un rôle majeur dans différentes fonctions associées autant à la migration et l'invasion tumorale qu'à la dégradation de la MEC, à la prolifération des CML et à la réponse fibrogénique. Compte tenu de l'abondance de protéines membranaires ayant des ectodomains impliqués dans une signalisation antagoniste aux protéines natives correspondantes, il ne serait pas exclu que l'apoptose permette de redistribuer et de moduler l'activité de ces protéines afin qu'elles puissent favoriser un environnement de réparation en réponse au stress.

Figure 38 : Illustration récapitulative des SPM générés durant l'apoptose endothéliale et leurs activités biologiques sur les composantes cellulaires du mur vasculaire. Générée par I.S.



Légende : Pour chacune des catégories de médiateurs pertinents au remodelage vasculaire, les SPM identifiés sont illustrés ainsi que les cellulés ciblés par ces facteurs. À noter que les activités biologiques de sLRP1, exo-LRP1 Exo-HSP90-TPA sont spéculatives dans notre modèle et leurs activités potentielles découlent d'une revue de la littérature.

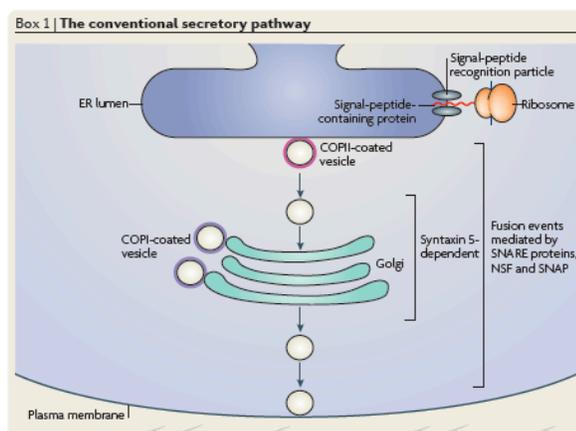
Chapitre 4 - La phase effectrice de l'apoptose

lègue un testament moléculaire via des mécanismes de sécrétion non conventionnels

'Creative data processing combined with a skilled and sensitive researcher's eye, may disclose unexpected results, which may be used to formulate new hypotheses, thus expanding the exploration field. In this perspective omics approaches are emerging as inspiring companions to hypothesis-driven research in vascular biology and many other specialities'
- Curzio Rüegg et al. (262)

Mis à part qu'il y a plus de médiateurs protéiques libérés durant l'apoptose, ces derniers sont qualitativement différents d'après leurs activités biologiques et leurs types de sécrétion. Ajoutons ici que, tel que discuté dans l'article principal, les débris cellulaires ainsi que les corps apoptotiques ont été enlevés des surnageants avant de procéder à n'importe quelle analyse protéomique ou biochimique, nous permettant ainsi d'avancer que leur présence extracellulaire soit le reflet d'un processus régulé. En retour, cette prémisse suggérait que la voie classique de sécrétion soit davantage sollicitée durant l'apoptose. Sommairement, la voie classique de sécrétion implique l'introduction d'un peptide hydrophobe dans la portion N-terminale d'une protéine naissante. Suivant sa translocation dans le réticulum endoplasmique (ER), la protéine continue sa maturation dans le ER et le golgi où elle acquiert des modifications post-traductionnelles pour finalement être confinée dans des granules de sécrétion fusionnant avec la membrane cytoplasmique. Ce processus de fusion semble nécessiter des protéines SNARE, NSF et SNAP et est dépendant de la syntaxine 5 (387, 433, 434). La voie de sécrétion classique est illustrée à la Figure 39.

Figure 39: Sécrétion classique. Reproduit de (434) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Cell Biology; copyright 2009.



Légende : La plupart des protéines contenant un signal peptidique et destinées soit à la surface cellulaire ou dans l'espace extracellulaire sont transportées via la voie conventionnelle de sécrétion (voir figure). Les protéines naissantes entrent dans le réticulum endoplasmique (ER) grâce à leur particule peptidique de reconnaissance. Ensuite, les protéines nouvellement synthétisées sortent du ER dans des régions membranaires spécialisées nommées sites de sortie du ER ou tER, desquelles se forment des vésicules contenant les cargos et recouvertes de 'coat protein complex II' (COPII). Chez la levure, le complexe COPII contenant les petites GTPase Sar1, Sec23–Sec24 and Sec13–Sec31, assure aussi la sélection des cargos soit via Sec24 ou via des interactions avec des récepteurs retrouvés dans les cargo. Les protéines nouvellement synthétisées atteignent l'appareil de Golgi où ils sont modifiées, transformées, triées et redistribuées vers leur destination finale. Le transport de la voie sécrétoire dépend de la formation d'autres intermédiaires vésiculaires, des vésicules 'COP1-coated', qui contiennent les petites GTPase ADP ribosylation factor 1 (ARF1) ainsi qu'un 'coatomer', soit un complexe protéique heptomérique. Les vésicules COP1 sont initialement formées dans le Golgi et orchestrent le mouvement rétrograde des composants du Golgi vers le ER, ainsi que le mouvement antérograde de certains composants. Le métabolite fongique brefeldin A inhibe le recrutement de ARF au Golgi et la formation de vésicules COP1-coated, et bloque ultimement le transport ER-Golgi. Le transport associé à la voie sécrétoire implique une série d'évènements de fusion qui prend place entre les intermédiaires vésiculaires et les organelles catalysées par les SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) accessory protein (SNAP) receptors). La fusion membranaire est médiée par la formation de complexes trans-SNARE serrés et formés par des ballots d'hélices- α via les domaines cytoplasmiques des SNARE. Ces domaines proviennent des vésicules (v)-SNAREs et target (t)-SNAREs. La membrane opposée se retrouve à très grande proximité ce qui éventuellement résulte en une fusion membranaire. Les complexes *trans*-SNARE sont ensuite dissociés par l'ATPase hexamérique NSF qui lie le complexe via SNAP. Cela permet le recyclage des v-SNAREs et leur fonction dans le prochain tour de transport vésiculaire. Syntaxin 5 est un exemple de t-SNARE dont l'importance cruciale pour le transport vers

et via le Golgi a été démontrée dans tous les modèles.

Étonnamment, 16 sur 27 des protéines identifiées dans le sécrétome des CE apoptotiques n'ont pas de signal de sécrétion classique (Tableau 1 de l'article principal). Cette observation suggère que d'autres mécanismes non conventionnels, en plus de la voie exosomiale, puissent être favorisés durant la phase effectrice de l'apoptose endothéliale. Ainsi, l'abondance de médiateurs n'ayant pas de signal de sécrétion fût le point de départ dans l'élaboration d'une hypothèse suggérant que durant un stress apoptotique, la cellule n'utilise pas la voie classique de sécrétion. La voie effectrice de l'apoptose semble favoriser davantage l'export extracellulaire de médiateurs via un relargage rapide et direct dans le milieu environnant via des mécanismes de sécrétion non conventionnels.

Types de sécrétion associés au sécrétome des CE apoptotiques

Afin de dresser le portrait des différents types de sécrétion influencés par l'apoptose endothéliale, les 27 médiateurs enrichis spécifiquement dans le sécrétome des CE apoptotiques (Tableau 1 de l'article principal) sont regroupés dans le Tableau 4 selon les 3 critères suivants: 1) la présence d'un signal peptidique, 2) leur mécanisme de sécrétion décrit dans la littérature et 3) leur localisation cellulaire. Le résumé de ces informations provient d'une mise à jour d'une revue de la littérature et de la banque de données *The UniProt Knowledgebase (UniProtKB)* disponible sur l'internet (435). Cette banque de données compile toutes les annotations relatives à la présence d'un signal peptidique et à la localisation des protéines connues. Les médiateurs sont attirés à la sécrétion classique ou non classique selon le raisonnement suivant: afin d'être associé au mode de sécrétion classique, les médiateurs doivent posséder un signal peptidique; toutefois, afin d'être associé uniquement au mode de sécrétion classique, aucune description relative à des mécanismes de sécrétion non classique ne doit être recensé dans la littérature. Concernant le type de sécrétion non classique, soit que les médiateurs n'ont pas de signal peptidique, soit que des mécanismes de sécrétion non classique ont été décrits pour ces médiateurs et ce indépendamment de la présence ou non d'un signal peptidique. Cette classification issue à partir de seulement 3 critères nous révèle que les médiateurs spécifiquement enrichis dans le sécrétome des CE apoptotiques sont partagés en 5 groupes (Tableau 4). Ce qui est le plus frappant, c'est que les médiateurs sont majoritairement associés à des voies de sécrétion non conventionnelles. Voici les particularités de chacun de ces groupes.

Tableau 4 : Classification des 27 médiateurs identifiés dans le SSC-apo spécifiquement selon leur type de sécrétion. Voir texte pour les critères de sélection. Généré par I.S.

Type de sécrétion	Nom	Signal peptidique {2010 #1415}*	Mécanisme de sécrétion	Ref.	Localisation cellulaire (2010 #1415)				
					Mem.	V.E.	C	N	Ext.
Groupe 1: Sécrétion non classique de type exosomal (13 protéines)	ALDH1A1	NON	Exosome	(305)			♦		♦
	EIF4G1	NON	Exosome	(512)			♦		♦
	HSPA1L	NON	Exosome	(296)			♦		♦
	TPT1	NON	Exosome	(291-293)			♦	♦	♦
	NAPA	NON	Exosome	(305)	♦	♦			♦
	HLA-DQA1	OUI	Exosome	307	♦	♦			♦
	LRP2	OUI	Exosome	(305)	♦	♦			♦
	IGFR2	OUI	Exosome	(305)	♦	♦			♦
	PLA2G2D	OUI	Exosome	(394)(513)	♦	♦			♦
	TGFBR3	OUI	Exosome**	(305)(436)	♦				♦
	EGF	OUI	Exosome**	(305)-(438)	♦	♦			♦
	L1CAM	OUI	Exosome**	(306)(437)	♦	♦			♦
	LRP1	OUI	Exosome **	(514) (515)	♦	♦	♦	♦	♦
Groupe 2: Sécrétion non classique et potentiellement de type exosomal (4 protéines)	BRCA2	NON	Exosome (potentiel)	N.D.		Sec. Gran		♦	N.D.
	ABCC2	NON	Exosome (potentiel)	N.D.	♦				N.D.
	ATPA4	NON	Tubulovesicles and apical membrane Exosome (potentiel)	(309)	♦				♦
	ITGA10	OUI	Grasp-dépendant Exosome (potentiel)	(444)	♦				♦
Groupe 3: Sécrétion non classique (2 protéines)	ANLN	NON	P2 particles prominin-1 ⁴⁶	(516)			♦	♦	♦
	ASH1L	NON	ER et microsome	(308)					♦
Groupe 4: Sécrétion non classique de type indéterminé (6 protéines)	NOS2A	NON	N.D.	N.D.			♦	♦	N.D.
	GVIN1	NON	N.D.	N.D.			♦	♦	N.D.
	MTPN	NON	N.D.	N.D.			♦		N.D.
	COQ4	NON	N.D.	N.D.		Mito	♦		N.D.
	SPIN2A	NON	N.D.	N.D.			♦		N.D.
GOLGA2	NON	N.D.	N.D.	N.D.	Golgi			N.D.	
Groupe 5: Sécrétion classique (2 protéines)	ADAMTS4	OUI	Trans golgi	(310)					♦
	PLAT	OUI	WPBs	(446)					♦

Abréviations: Mem: Membranaire; V.E.: organelle de la voie endocytaire, incluant les endosomes, les MVB, les lysosomes; C: cytoplasmique; N: nucléaire, Ext.: Identification antérieure dans le milieu extracellulaire; N.D.: Information non disponible; Mito: mitochondrie; WPBs: Weibel Palade Bodies; **: shedding; Sec. Gran.: Secretary granules

Le groupe 1 (sécrétion non classique de type exosomal) représente 13 protéines dont la sécrétion dans le milieu extracellulaire est associée à la voie exosomiale, et ce malgré la présence ou non

d'un signal peptidique. Quatre protéines de ce groupe n'ont pas de signal peptidique et sont localisées dans le cytoplasme (ALDH1A1, EIF4G1, HSPA1L et TPT1). Parallèlement, les médiateurs de ce groupe ayant un signal peptidique (HLA-DQA1, LRP2, IGFR2, PLA2G2D, TGFBR3, EGF, L1CAM, LRP1) sont des protéines membranaires et ne sont pas représentées dans le cytoplasme ou le noyau (sauf LRP1), suggérant que leur signal peptidique permet de les redistribuer au niveau membranaire (plasmique, vésiculaire ou autre). De plus, la plupart de ces médiateurs sont aussi localisés dans les organelles regroupant la voie endocytaire incluant les endosomes, les MVB et les lysosomes, reflétant un aspect important concernant l'origine endocytaire d'une protéine sécrétée par la voie exosomiale. Ajoutons aussi que certaines protéines membranaires de ce groupe (TGFBR3 (436), L1CAM (437) et EGF (438) et LRP1 (430)) existent sous une forme soluble suivant un processus de 'shedding' à la membrane plasmique et que nos analyses protéomiques ne nous permettent pas de distinguer leur mécanisme exact de sécrétion durant l'apoptose. Toutefois 42% des protéines exosomiales retrouvées dans ExoCarta sont des protéines membranaires ayant des ectodomaines, suggérant qu'elles puissent avoir des fonctions de signalisation intercellulaire pertinentes à différents contextes pathologiques (347). De plus, il a été récemment démontré que le shedding de L1CAM, EGF et LRP1 a lieu dans les MVB et les exosomes par ADAM10 et 17, ajoutant des évidences que ces protéines sont associées aux voies endosomale et exosomiale.

L'attribution des mécanismes de sécrétion de type exosomal provient essentiellement d'analyses protéomiques effectuées à partir de préparations exosomiales de différents types cellulaires. Par conséquent, différents isoformes appartiennent à une même famille de protéine et la distribution des isoformes varie en fonction du type cellulaire étudié. Ainsi, ABCC2 et ATP4A du tableau 4 (Groupe 2) n'ont pas été directement identifiés dans des analyses protéomiques issues de préparations exosomiales mais appartiennent à des familles de protéines dont leur sécrétion est associée à la voie exosomiale. Différentes protéines appartenant à la famille ABC (ATP-binding cassette) sont largement représentées dans différentes préparations exosomiales (305, 439, 440) suggérant que la sécrétion de ABCC2 du groupe 2 pourrait aussi être associée à la voie de sécrétion exosomiale. Différentes ATPase H⁺ K⁺ ont été identifiées dans plusieurs préparations exosomiales et semblent aussi participer directement à la sécrétion d'exosomes (441, 442), suggérant que ATP4A pourrait potentiellement être enrichi dans les exosomes de notre système. Finalement, malgré qu'aucune publication n'ait démontré la présence de BRCA2 dans les exosomes, BRCA2 a été récemment breveté à titre de marqueur exosomal permettant de déterminer différents phénotypes associés à différentes pathologies (443).

En ce qui a trait à ITGA10, la seule protéine du Groupe 2 ayant un signal peptidique, plusieurs indices suggèrent que ce médiateur puisse emprunter la voie exosomiale. D'abord, il a été récemment démontré que durant le remodelage épithélial, les intégrines alpha et non les intégrines beta empruntent un mécanisme de sécrétion via un transport indépendant du Golgi et nécessitant la protéine GRASP (444). De plus, plusieurs intégrines ont été identifiées à la surface des exosomes (305, 445) ainsi que l'intégrine $\alpha 3$ dans le sécrétome des CE apoptotiques (Table 2 article principal), suggérant que ITGA10 pourrait être aussi sécrété par la voie exosomiale dans notre système ou via un autre mécanisme de sécrétion non conventionnel.

Les groupes 3 et 4 représentent des médiateurs sécrétés par des mécanismes non classiques compte tenu qu'ils n'ont pas signal peptidique. Des mécanismes de sécrétion non conventionnels ont été décrits pour seulement 2 médiateurs, ANLN et ASH1L. Pour la plupart des médiateurs de ces groupes, leur localisation cellulaire est principalement d'origine cytoplasmique et/ou nucléaire et aucun d'entre eux ne semble être associé à une localisation membranaire, excepté COQ4 et GOLGA2 (Groupe 4) localisés respectivement dans la membrane interne mitochondriale et dans le compartiment membranaire central du complexe Golgi. Tel que discuté plus loin dans le chapitre 5, il est possible que ces protéines soient des résidus associés au processus autophagique exocytosés par la cellule suivant une fusion des amphisomes avec la membrane plasmique.

Quoiqu'inattendu, la voie de sécrétion classique est incontestablement sous représentée durant l'apoptose endothéliale. Seulement 2 protéines (ADAMTS4 et PLAT) sur 27 sont sécrétées par la voie canonique selon la présence d'un signal peptidique et leur localisation non membranaire. Toutefois, le tPA est normalement confiné dans les WPBs et sa sécrétion extracellulaire est associée à une augmentation calcique intracellulaire favorisant la fusion de ces organelles avec la membrane plasmique (446), représentant ainsi un autre mécanisme de sécrétion non canonique. La diminution de l'activité de la sécrétion classique dans notre système corrèle avec les événements de fragmentation du ER et du golgi et à la protéolyse des protéines associées à la sécrétion durant la phase effectrice de l'apoptose (251-254).

L'analyse des protéines de ces différents groupes selon la présence d'un signal peptidique, au mode de sécrétion connu et à la localisation cellulaire de nos médiateurs, suggère que l'apoptose endothéliale initie un processus global de sécrétion protéique non conventionnelle. Suivant cette classification, 2 articles de revue récemment publiés (387, 434) me permettent d'appuyer cette

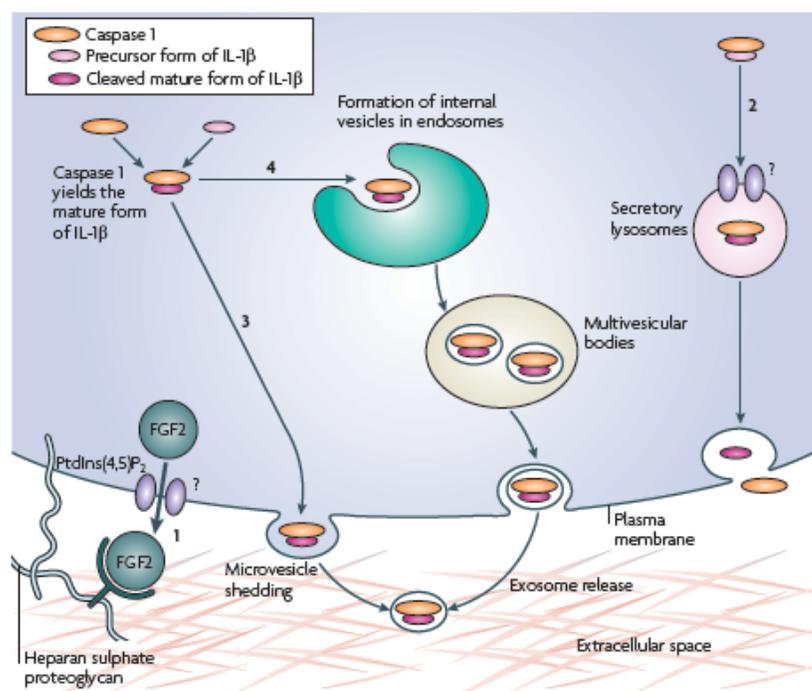
nouvelle hypothèse qui s'avère extrêmement pertinente dans un contexte de remodelage vasculaire. Additionnellement à la caspase-3, il semblerait que la caspase 1 constituant l'inflammasome favoriserait aussi l'export extracellulaire de certains médiateurs suivant un stress inflammatoire, et ce, de manière non conventionnelle (447, 448). Somme toute, les caspases pourraient non seulement diriger la destruction cellulaire organisée, mais aussi la sécrétion de médiateurs via des voies non conventionnelles de sécrétion.

Il existe plusieurs protéines d'origines cytoplasmique et nucléaire qui empruntent des voies de sécrétion non conventionnelles. Ces protéines sont de nature diversifiée, la plupart ne possède pas de signal peptidique et sont sécrétées de manière ER-Golgi indépendante. Parmi ces protéines, on dénote des cytokines (IL1 α et β , FGF1 et FGF2, MIF); des enzymes (secretory transglutaminase et sphingosine kinase); des annexines (I et II), des galectines (1 et 9), des protéines Heat shock (HSP70 et 90), des protéines virales, HMBG1, les protéines S100 (S100A13 et S100A4), la thioredoxin et des protéines impliquées dans l'exocytose (synaptogamin I et syntaxin 2) (387).

Les premiers indices relatifs à la compréhension des voies de sécrétion non conventionnelles reposent sur le fait que certaines protéines contournent l'utilisation classique des vésicules COPII normalement associées à l'exocytose (449, 450). Parallèlement, des études effectuées à l'aide de la Brefeldin A (BFA) ont démontré que CD45 et RRV (simian rotavirus Rhesus monkey rhadinovirus) détournent l'arrêt au Golgi, soit une étape importante concernant l'acquisition de modifications post-traductionnelles (ajout d'oligosaccharides, protéolyse, etc.). (451-453). Finalement, CFTR est transporté directement du ER à la membrane plasmique via des vésicules de type COPII qui ne nécessitent pas la machinerie classique impliquée dans la fusion avec la membrane, i.e. la syntaxine 5, les SNARE et NSF (454, 455). Dans le cas du CFTR, il semble que la syntaxine 13 soit requise afin d'être emmagasiné dans les MVB avant d'être sécrété dans le milieu extracellulaire via les exosomes.

Il existe à ce jour 4 mécanismes de sécrétion non conventionnels grossièrement décrits (Figure 40) dans la littérature compte tenu que la communauté scientifique commence à peine à intégrer l'idée que des protéines d'origine cytoplasmique et nucléaire puissent être sécrétées selon un processus régulé et non conséquent à une lyse cellulaire. De toute évidence, tel que décrit précédemment, la voie exosomiale est l'une des voies de sécrétion non conventionnelles la mieux décrite que nous avons largement observé dans notre sécrétome.

Figure 40: Mécanismes de sécrétion non classiques. Reproduit de (434) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Nature Cell Biology; copyright 2009.



Légende : Sécrétion non conventionnelle de protéines cytoplasmiques solubles. Quatre différents mécanismes pour la sécrétion non conventionnelle de protéine soluble ont été proposés. Le premier (mécanisme 1) est non vésiculaire. Des protéines cytoplasmiques dont FGF2 (fibroblast growth factor 2) peuvent être directement relocalisées du cytoplasme à travers la membrane plasmique via le recrutement par phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) et l'ancrage extracellulaire via les protéoglycans héparan sulfate (HPsGs), dont leurs chaînes secondaires sucrées sont liées par le FGF2. Les trois autres mécanismes dépendent sur des intermédiaires vésiculaires et ont été démontrés pour la cytokine cytoplasmique 1 β (IL-1 β). IL-1 β est redistribué dans les lysosomes sécrétoires avec la caspase-1. Cela génère la forme mature de la cytokine. La fusion de ces lysosomes avec la membrane plasmique mène au relargage de leur contenu dans l'espace extracellulaire. Caspase 1 clive IL-1 β et est sécrété en compagnie de la cytokine mature (mécanisme 2). Le dépouillement micro vésiculaire de la surface cellulaire peut aussi mener au relargage de la caspase-1 et de IL-1 β mature dans l'espace extracellulaire (mécanisme 3). Finalement, le complexe caspase 1–IL-1 β peut être capturé du cytoplasme durant la formation de vésicules intraluminales, lesquelles mènent à la biogénèse des corps multivésiculaires (MVB). Ces vésicules intraluminales sont ensuite exportées sous la forme d'exosome (mécanisme 4). À noter que dans les deux derniers scénarios (mécanismes 3 et 4), IL-1 β et caspase 1 sont relargées dans l'espace extracellulaire entourées d'une membrane. Les points d'interrogation annotés près des transporteurs dans les étapes 1 et 2 indiquent que leur identité n'a pas encore été révélée.

Un 2^{ème} mécanisme proposé est celui d'un transport non vésiculaire via une translocation membranaire permettant le relargage extracellulaire de FGF2. Un lipide (PtdIns(4,5)P₂) situé dans le feuillet cytoplasmique de la membranaire plasmique permettrait la liaison et la translocation de FGF2 (456). De plus, W. Nickel et C. Rabouille proposent que les protéoglycans heparan sulfate (HSPG) serviraient de trappes extracellulaires permettant de diriger l'export de FGF2 (434, 457, 458). Toutefois, les transporteurs membranaires impliqués dans ce processus ne sont pas connus.

Un 3^{ème} mécanisme proposé est associé au dépouillement (shedding) de la membrane plasmique contenant des portions de cytoplasme. La transglutaminase sécrétoire, FGF1 et FGF2, IL1- α et β , HASPB, galectin 1 et syntaxin 2 ainsi que la caspase-1 seraient relargés extracellulairement via ce mécanisme (387).

Finalement, de manière analogue à la fusion des MVB avec la membrane plasmique, les lysosomes sécrétoires représentent le 4^{ème} mécanisme de sécrétion non conventionnel. IL1 β et la caspase 1 seraient transloqués dans les lysosomes et l'ATP servirait de 2^{ème} signal permettant la fusion de ces lysosomes avec la membrane plasmique (459, 460). HSP70 et HMBG1 pourraient emprunter cette voie qui peut être inhibée par le glibenclamide, soit un inhibiteur des protéines ABC1 (461).

Caspase-1

Les inflammasomes sont des senseurs intracellulaires activés suivant des signaux internes et externes, incluant des signaux de danger tels que l'ATP libérés par les cellules nécrotiques. Suite à un stress UVB, ces inflammasomes recrutent la caspase 1 activée et régule la maturation et la sécrétion de IL-1 β . De plus, l'inhibition de la caspase-1 bloque aussi la sécrétion de IL1- α , MIF, FGF2 et les galectines 1 et 3, suggérant un rôle général de la caspase-1 dans la sécrétion non conventionnelle de protéine dans un contexte inflammatoire (462-464).

Le point le plus important concernant les voies de sécrétion non conventionnelles est que celles-ci sont communément sollicitées en réponse au stress. Par exemple, FGF1, IL-1 α et β et la syntaxine 2 nécessitent un stress cellulaire pour être exporté (459, 465, 466). Un traitement à la thrombine permet la sécrétion d'annexin II, un traitement à la glucocorticoïde induit la sécrétion d'annexin I et le TNF- α et les liposaccharides induisent la sécrétion de la thioredoxin (467-469). De manière encore plus intéressante, FGF1, qui est un facteur pro-angiogénique, n'est pas relâché

dans le milieu extracellulaire en conditions physiologiques. Sa sécrétion nécessite soit un choc thermique, hypoxique ou la déprivation de facteur de croissance (!!!!) (465, 470-472). De plus, FGF1 a besoin d'un stress cellulaire pour être sécrété mais pas FGF2. De manière intéressante, FGF1 doit former des homodimères covalents afin d'être efficacement sécrété, récapitulant ainsi l'oligomérisation de TCTP observée dans notre modèle. FGF1 forme un complexe protéique avec d'autres protéines incluant S100A13 et Annexin II. La liaison de FGF1 avec S100A13 est possible dans des astrocytes déprivés de facteurs de croissance et l'effet est catalysé par une augmentation calcique intracellulaire (472). Finalement, Annexin II est externalisé après un traitement à la thrombine et pourrait servir de récepteur pour le plasminogène et le tPA (467, 473). Le stress cellulaire permettrait l'export de FGF1 afin qu'il puisse augmenter la vascularisation de l'endothélium suivant un stress ischémique (474-476).

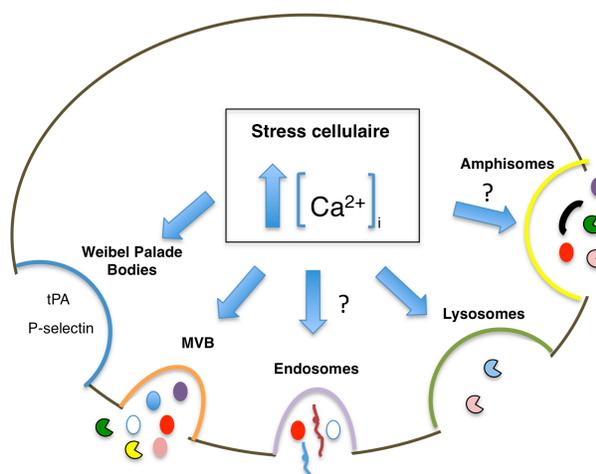
Pourquoi donc des protéines cytoplasmiques sont sécrétées via des mécanismes non conventionnels ? En ce qui a trait aux galactines, il a été suggéré que leur liaison avec des oligosaccharides dans la lumière du ER-Golgi pourrait causer des agrégations et un mauvais repliement. De plus, les protéines signalétiques pourraient de manière prématurée se lier à leurs récepteurs dans le ER et le Golgi, ce qui pourrait initier des signalisations autocrines délétères. Finalement, l'environnement oxydatif du ER et du golgi pourrait causer le mauvais repliement de protéines cytoplasmiques sécrétées, dont thioredoxin. Compte tenu que les protéines cytoplasmiques sécrétées ne semblent pas se déplier durant la translocation à la PM et n'ont pas besoin de se replier encore dans le milieu extracellulaire (dont FGF2), un passage dans le ER-golgi pourrait être désavantageux pour leur fonction (387).

De plus, il a été montré que FGF2 ne peut pas être sécrété via la voie classique en conservant sa forme fonctionnelle. Même si on force FGF2 avec un signal peptide de passer dans le ER-Golgi, il n'est pas biologiquement actif dans le milieu extracellulaire, dû à une modification o-glycosidique non physiologique qui prévient sa déportation dans le milieu extracellulaire et la signalisation FGF2 dépendant (477). Ainsi, un détournement de la voie sécrétoire classique permettrait de générer une nouvelle activité biologique extracellulaire de différentes protéines. À mon avis, compte tenu que les médiateurs sécrétés ont un rôle important dans les événements suivant le dommage cellulaire, leur localisation extracellulaire doit être finement régulée. Le fait de ne pas avoir de signal de sécrétion les empêche ainsi de prendre la voie de sécrétion classique qui pourrait de manière accidentelle distribuer ces médiateurs dans le milieu extracellulaire par des cellules saines. Mon opinion est appuyée par (387) qui suggèrent le même raisonnement pour FGF1 qui lorsque sécrété,

il initie une forte activité mitogénique, soit une situation que l'on veut générer seulement lorsque c'est requis.

La classification des médiateurs identifiés dans le sécrétome des CE-apoptotiques selon 3 simples critères a permis de révéler de manière évidente que l'apoptose favorise la sécrétion de différents médiateurs via des mécanismes non conventionnels. Au total, 31 protéines associées aux exosomes ont été identifiées dans le SSC-apo. Le fait le plus intéressant, à mon avis, est que ces voies de sécrétion non conventionnelles soient favorisées durant un stress apoptotique. Compte tenu l'origine membranaire des vésicules de transport extracellulaire, certaines voies de sécrétion non conventionnelles représentent probablement la fusion de différentes organelles de la voie endocyttaire avec la membrane plasmique. Ce phénomène de fusion est généralement associé à une augmentation calcique intracellulaire, soit un événement associé à différents mécanismes de réponse au stress incluant l'autophagie et l'apoptose (Figure 41).

Figure 41: Schématisation de la fusion potentielle de différentes organelles avec la membrane plasmique suivant une augmentation intracellulaire calcique associée au stress cellulaire. Générée par I.S.



Cette particularité d'exporter rapidement des médiateurs via des mécanismes de fusion avec la membrane cellulaire m'apparaît analogue à la propagation d'un incendie dans un immeuble. Lorsqu'un incendie (stress apoptotique) envahit un établissement et que le dommage associé à l'immeuble est irréversible (activation de la phase effectrice de l'apoptose), les gens présents dans

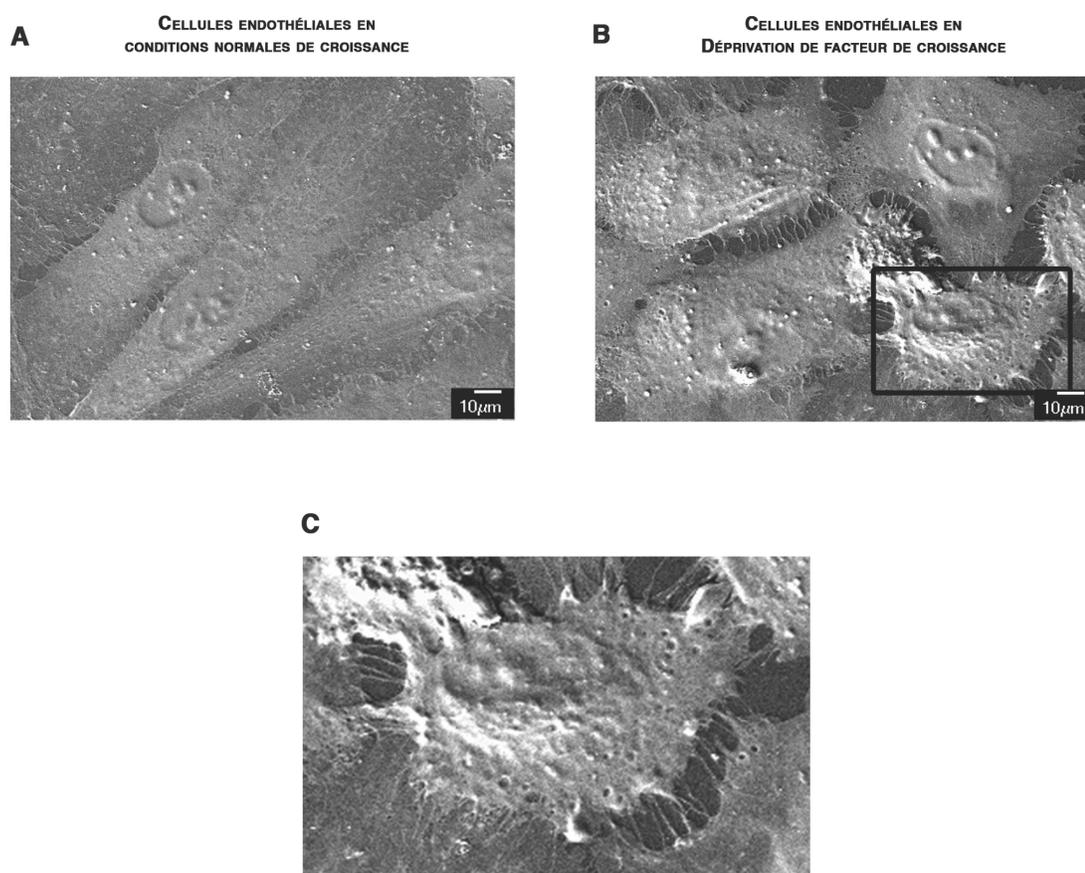
l'immeuble tentent de sortir le plus rapidement possible. Par conséquent, ils ne prennent pas la sortie classique qui est habituellement centralisée à l'entrée principale (voie de sécrétion classique), d'autant plus que celle-ci pourrait être endommagée ou non accessible (démolition des structures cellulaires durant la phase effectrice de l'apoptose). Au contraire, les 'sorties de secours' (organelles intracellulaires fusionnant avec la membrane plasmique) mènent la plupart du temps directement vers l'extérieur permettant ainsi d'évacuer rapidement les individus (libération de médiateurs dans le milieu extracellulaire). Par la suite, un grand nettoyage est déployé afin de ramasser les débris (phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages professionnels) et une reconstruction est généralement envisagée (activités biologiques des SPM: migration, prolifération et survie cellulaire des cellules du mur vasculaire).

Habituellement, les sorties d'urgence sont reliées à un système de sécurité et lorsque ces portes sont ouvertes, cela déclenche l'arrivée de secours très rapide. Par conséquent, ces sorties doivent être utilisées seulement en cas d'urgence réelle. Selon l'analogie avec l'incendie, les voies de sécrétion non classiques doivent être utilisées seulement dans des conditions de mort cellulaire irréversible afin de ne pas recruter les macrophages et les cellules vasculaires par des cellules saines. De là la pertinence d'exporter de manière non conventionnelle les médiateurs biologiquement actifs seulement lorsque les caspases effectrices sont activées. De plus, l'absence de signal peptidique empêche les médiateurs de prendre la sortie canonique, permettant ainsi d'éliminer l'incidence de fausses alertes.

En lien avec cette proposition selon laquelle différentes organelles de la voie endocyttaire puissent fusionner avec la membrane plasmique suivant un stress apoptotique, nous avons entrepris des études de microscopie électronique à balayage effectuées sur les CE cultivées en conditions normales et en déprivation de facteur de croissance (Figure 42). Dans ces clichés, nous pouvons apprécier que les cellules apoptotiques ont un cytoplasme rétracté caractéristique de l'apoptose. De plus, on voit qu'il y a beaucoup d'activité de bourgeonnement dans les cellules apoptotiques comparativement aux cellules normales. Cette activité de bourgeonnement est probablement représentative du blebbing associé à l'apoptose. À mon avis, l'observation la plus intéressante est que les CE apoptotiques ont à certains endroits un aspect très poreux (encadré figure 42B et cliché représenté en (C)) comparativement aux CE en condition de croissance normale (Figure 42A). Ces pores pourraient en fait être générés suivant la fusion d'organelles endocytaires avec la membrane plasmique. De plus, il existe une publication (478) démontrant par microscopie électronique à balayage, la présence de pores à la surface de HUVEC apoptotiques suivant une déprivation de

facteur de croissance. Cette observation représente, parallèlement avec les évidences démontrées dans ce travail, un point de départ intéressant dans la compréhension des mécanismes de sécrétion non conventionnels régulés durant la phase effectrice de l'apoptose. Reste à savoir maintenant comment, outre l'importance d'une augmentation de calcium intracellulaire, les caspases effectrices régulent la fusion membranaire des organelles séquestrant nos médiateurs d'intérêt.

Figure 42: Microscopie électronique à balayage des CE (HUVEC) en croissance normale et en condition de stress apoptotique.



Légende : Suivant une incubation de 4 heures dans (A) du milieu complet de croissance (N) et (B) dans du milieu sans facteur de croissance (SS), les CE ont été fixées dans du glutaraldéhyde 1% et séchées par la méthode de 'Critical Point drying' (479).. Les cellules ont été recouvertes d'une fine couche de carbone. Images produites par microscopie à balayage par le Dre Irène Londono dans le laboratoire du Dr Moise Bendayan 2007. (C) provient d'une portion de l'image (B) afin d'illustrer l'aspect poreux de CE apoptotique

Chapitre 5 - Régulation potentielle des voies de sécrétion non conventionnelles par les caspases effectrices

Notre compréhension des mécanismes impliqués dans l'export extracellulaire des nanovésicules contenues dans les MVB suivant une fusion avec la membrane plasmique demeure fragmentaire (290). Par contre, certaines évidences suggèrent que le calcium ainsi que la régulation de p53 participeraient à ce phénomène.

Sécrétion exosomiale et le calcium

Une augmentation calcique intracellulaire est nécessaire afin de compléter le processus de fusion des MVB avec la membrane plasmique permettant de relarguer les nanovésicules dans le milieu extracellulaire (480, 481). Un fait intéressant est que l'autophagie et l'apoptose participent à l'augmentation intracellulaire calcique durant le stress cellulaire (146). La source majeure de calcium intracellulaire est emmagasinée dans le réticulum endoplasmique (RE), mais les mitochondries servent aussi de réservoir calcique. Ainsi, durant l'ischémie et la déprivation de facteur de croissance générant entre autre un stress du RE, les récepteurs sensibles au calcium à la membrane du RE sont clivés, favorisant le relargage du calcium dans le cytosol (482). Parallèlement, l'autophagie sollicite davantage la production d'énergie via et la surutilisation du cycle de Krebs et a pour effet de générer aussi des ROS (reactive oxygen species) provenant de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces ROS endommagent les protéines ainsi que les lipides associées aux membranes des organelles, incluant les mitochondries, favorisant ainsi le relargage de calcium des mitochondries dans le cytosol ainsi que des facteurs pro-apoptotiques (483-485). Tous ces événements forment une boucle permettant de générer une concentration calcique intracellulaire accrue et de favoriser aussi l'induction de la phase effectrice de l'apoptose. Tel que proposé dans le chapitre précédent, l'augmentation calcique intracellulaire générée durant l'autophagie et l'apoptose pourrait favoriser les mécanismes de sécrétion calcium dépendants. Ce phénomène influencerait la fusion des MVB avec la membrane plasmique permettant le relargage des nanovésicules ainsi que la fusion des organelles intracellulaires, incluant les WPBs, avec la membrane plasmique permettant de relarguer le tPA, le VWF et la e-selectin dans le milieu extracellulaire (446).

Sécrétion exosomiale et p53

La protéine p53 orchestre une réponse cytoprotectrice en réponse au stress cellulaire de nature non génotoxique en favorisant l'activation des mécanismes antioxydants ainsi que l'autophagie (486). Par exemple, p53 transactive DRAM, une protéine lysosomiale qui contribue à l'accumulation de vacuoles autophagiques. L'invalidation de DRAM diminue l'accumulation de ces vacuoles ainsi que l'induction de l'apoptose (487). Or, il a été proposé que la stabilisation de p53 influencerait aussi la sécrétion de nanovésicules via la régulation transcriptionnelle de TSAP6, mais ne nécessiterait pas la participation des caspases suivant une irradiation γ (stress génotoxique) dans des lignées cellulaires cancéreuses et transformées (292, 293). Un aspect très divergent entre ces travaux et les nôtres repose sur le type de stress cellulaire utilisé ainsi que le type cellulaire étudié. Dans leur modèle d'étude, les auteurs utilisent un stress génotoxique tandis que nous utilisons un stress apoptotique que nous avons largement caractérisé. Les auteurs démontrent que dans leur système, la sécrétion de la Cathepsin L diminue suivant un stress génotoxique tandis que la sécrétion de d'autres protéines exosomiales est augmentée. Par opposition, nous avons démontré dans notre système qu'un stress apoptotique et l'activation de la caspase-3 augmentent la sécrétion de la Cathepsin L dans le milieu extracellulaire (284). Parallèlement, nous avons démontré que l'activation des caspases a lieu en aval de la stabilisation de p53 et que la sécrétion des protéines exosomiales a lieu en aval de l'activation des caspases. Finalement, ces auteurs n'ont pas caractérisé morphologiquement et biochimiquement l'incidence de l'apoptose et l'activation des caspases dans leur système, complexifiant ainsi l'interprétation analogue entre les 2 études. En conclusion, p53 ne semble pas influencer, du moins directement, la sécrétion de type exosomal dans notre système.

Déprivation de facteur de croissance et sécrétion non conventionnelle

Dans notre modèle d'étude, l'apoptose est induite suivant une déprivation de facteur de croissance qui a été validée par différents critères morphologiques et biochimiques tel que démontré dans l'article principal. Par contre, la déprivation de facteur de croissance est aussi un stimulus classique d'autophagie. En s'appuyant sur la notion que l'autophagie en soi n'est pas un type de mort cellulaire mais plutôt un processus d'adaptation en réponse au stress qui peut accompagner d'autres types de mort cellulaire, il n'est pas exclu que des événements associés à l'autophagie prennent place en amont et/ou parallèlement à l'induction de l'apoptose via la voie intrinsèque. De plus, tel que discuté dans le chapitre 4 de l'introduction, l'autophagie est initialement un mécanisme cytoprotecteur en réponse au stress permettant d'augmenter l'activité catabolique cellulaire.

L'autophagie permet aussi d'éliminer les organelles endommagées, dont les mitochondries, des réservoirs importants de facteurs pro-apoptotiques. Toutefois, lorsque l'autophagie ne suffit plus à titre de mécanisme de compensation au stress, la voie apoptotique est favorisée.

Une observation intéressante est que dans notre modèle, un stress purement autophagique (i.e. traitement avec la rapamycin) n'augmente pas la sécrétion de nanovésicules tandis que la mitomycin C, un autre stimulus apoptotique, augmente la sécrétion nanovésiculaire (Fig 5D article principal). Ce résultat corrobore avec une récente publication démontrant qu'en fait, l'autophagie inhibe la sécrétion exosomiale. L'autophagie favoriserait la fusion des MVB avec les autophagosomes au détriment d'une fusion des MVB avec la membrane plasmique (481). Par conséquent, l'autophagie déplace l'équilibre endocyttaire vers la voie de dégradation plutôt que vers la voie sécrétoire. Autrement dit, l'autophagie inhiberait la sécrétion exosomiale tandis que l'apoptose favoriserait ce phénomène.

Ces observations me permettraient de réconcilier certains résultats issus de la banque de données protéomiques qui montrent que plusieurs protéines de la voie autophagique (substrats et machinerie) sont spécifiquement enrichies dans le SSC-apo comparativement au SSC-no-apo (Tableau 5). Ces résultats suggèrent que durant la phase autophagique précédant l'induction de l'apoptose, différentes populations hybrides d'organelles endosomales puissent être générées. Lorsque l'apoptose est initiée, ces organelles hybrides (incluant les amphisomes) fusionneraient avec la membrane plasmique permettant d'exporter ainsi différents types de médiateurs reflétant le stress autophagique initial subit par la cellule. De plus, nous avons observé que les MVB ont une densité volumique significativement plus grande durant la déprivation de facteurs de croissance comparativement à des conditions normales de croissance (Supplementary material de l'article principal, Figure S1a et b). Cette augmentation volumique pourrait être attribuable à des événements de fusion homotypique ou hétérotypique entre les différentes populations d'organelles de la voie endocyttaire tel qu'observé dans différents types cellulaires (480) (488). De plus, il a été proposé que lorsque les voies de recyclage et de dégradation sont non fonctionnelles, la sécrétion exosomiale semble être favorisée, ajoutant ainsi un argument favorable à mon hypothèse (350).

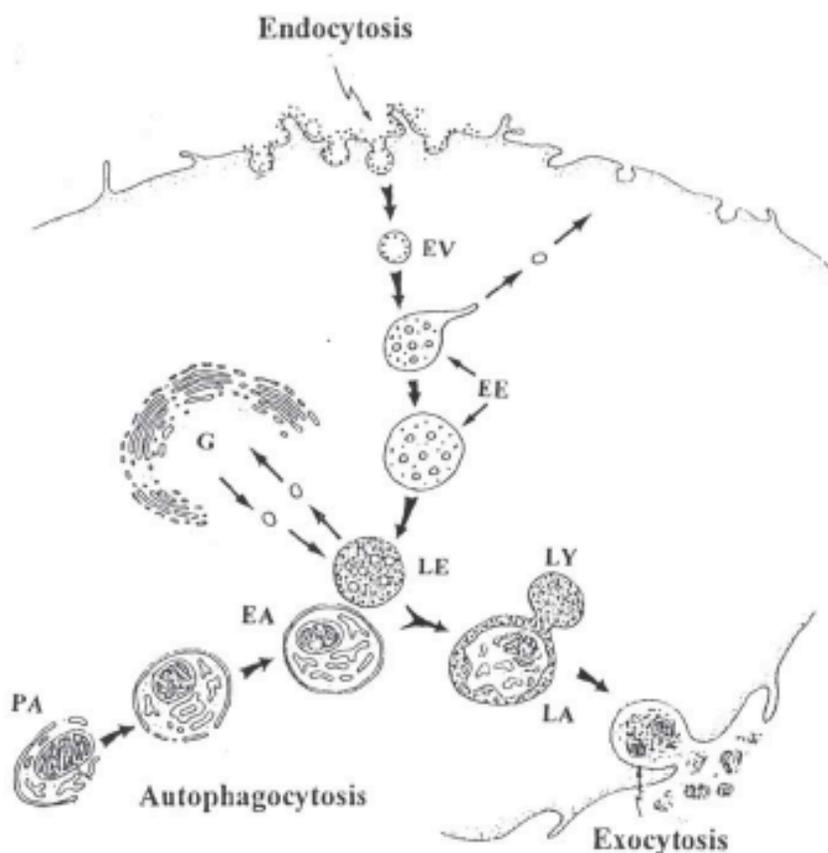
Tableau 5 : Liste des protéines associées au processus d'autophagie et identifiées à l'aide d'une des 3 approches protéomiques effectuées sur les sécrétomes des SSC-apo et SSC-no-apo. Généré par I.S.

	Protein name	Function	Abundance ratio (SSC-apo/SSC-no-apo)
Autophagy machinery			
1	LC3/Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A	Autophagosome formation. Cytosolic and membrane bound to autophagosomes (423).	ratio 2.3 x
2	Apg4/autophagin	Cysteine protease required for autophagy, which cleaves the C-terminal part of either MAP1LC3, GABARAPL2 or GABARAP, allowing the liberation of form I. Protease, c-terminal cleavage of LC3 (atg8) (423).	SSC-apo only
3	Apg16L	Plays an essential role in autophagy Autophagosome formation. Homooligomer. Interacts with ATG5.. Preautophagosomal structure membrane; Peripheral membrane protein By similarity. Note: Localized to preautophagosomal structure (PAS) where it is involved in the membrane targeting of ATG5 (423).	SSC-apo only
4	VPS16	May play a role in vesicle-mediated protein trafficking to lysosomal compartments and in membrane docking/fusion reactions of late endosomes/lysosomes. Large hetero-oligomeric complex together with VPS11, VPS18 and VPS33A. Interacts with STX7 (423). Potentially associated to autophagy.	SSC-apo only
5	SKD1/VPS4B	The AAA ATPase <i>SKD1</i> was also proposed as an essential protein for <i>autophagosome</i> maturation (470). Involved in late steps of the endosomal multivesicular bodies (MVB) pathway. Recognizes membrane-associated ESCRT-III assemblies and catalyzes their disassembly, possibly in combination with membrane fission. Redistributes the ESCRT-III components to the cytoplasm for further rounds of MVB sorting (423).	SSC-apo only
6	SPPL3 (intramembrane protease 2)	Whereas signal peptides are direct substrates for SPP proteolysis, the study suggests that SPP may be involved in the controlled sequestration of possibly toxic membrane protein species in a proteolysis-independent manner. These large oligomeric membrane protein aggregates may then be degraded by the proteasome or autophagy (510).	SSC-apo only
Substrates of autophagy			
7	Huntingtin	(511)	SSC-apo only
8	Huntingtin-associated-interacting protein (duo)		SSC-apo only
9	huntingtin interacting protein B		SSC-apo only
Peroxyphagy			
10	Peroxin 13	Pex14 is involved in the import of matrix proteins into peroxisomes. Together with other peroxins (Pex13, Pex17) it forms a docking complex at the peroxisomal surface (512).	SSC-apo only
11	Peroxisomal membrane protein, 70K	(513)	SSC-apo only
12	GCN1L1 protein	Required for peroxyphagy. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process (514)	SSC-apo only
Other proteins related to autophagy			
13	Lamp-2	(514)	SSC-apo only

Légende : Afin d'identifier les protéines associées à l'autophagie libérées et identifiées dans les SSC-apo et ou SSC-no-apo par les 3 approches protéomiques décrites dans l'article principal, l'utilisation de mots clés associés à l'autophagie (autophagy, apg, atg, peroxysome) et une revue récente de la littérature ont permis de générer cette liste de protéines. La recherche a été effectuée sur un total de 3500 protéines identifiées et mis à part LC3 retrouvés avec un ratio d'abondance 2.3x dans le SSC-apo comparativement au SSC-no-apo, toutes les protéines associées à l'autophagie ont été identifiées dans le SSC-apo. Ces observations suggèrent que l'inhibition des caspases empêche la fusion de vacuoles autophagiques avec la membrane plasmique pendant la phase effectrice de l'apoptose. La source de ces données protéomiques est de la même provenance que les protéines retrouvées dans les tableaux 1 à 4.

Finalement, des auteurs rapportent la fusion avec la membrane plasmique d'autophagosomes fusionnés avec des MVB tardifs que l'on nomme désormais amphisomes (150). Ces observations étaient rarissimes dans leur système mais ils ont quand même illustré ce point dans le schéma présenté à la Figure 43. Ainsi, des événements d'exocytoses d'amphisomes fusionnant avec la membrane plasmique ont déjà été observés *in vivo*. Cette observation peut être comparée aux déchets non digestibles que nous excrétons suivant le processus de digestion.

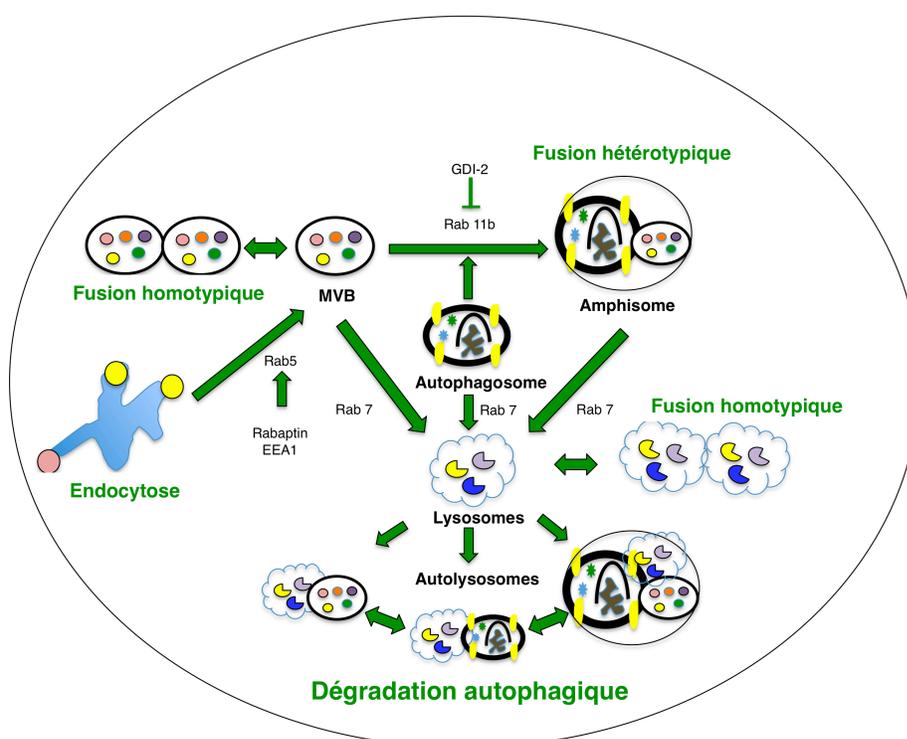
Figure 43: Maturation de la voie autophagique et exocytose de matériel autophagique. Reproduit de (150) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Cell Research; copyright 1999.



Légende : Diagramme illustrant le processus et le point de convergence des voies endocytaires et autophagiques dans les cellules Leydig. Dans la voie endocytairre, des marqueurs internalisés apparaissent en premier lieu dans la fosse endocytairre, les vésicules endocytaires (EV) et les endosomes précoces (EE), et ensuite dans les endosomes tardifs (LE) qui acceptent le transport vésiculaire avec des enzymes lysosomiales provenant de l'appareil de Golgi (G) et rencontrent la voie autophagique. Dans la voie autophagique, la formation d'autophagosome dans les cellules Leydig peut être divisée en trois étapes : le pré-autophagosome (PA), l'autophagosome précoce (EA) et l'autophagosome tardif (LA). L'endosome tardif et l'autophagosome précoce représentent le point de convergence de ces 2 voies. Durant ce processus de convergence, l'autophagosome précoce se transforme en un autophagosome tardif et l'endosome tardif en lysosome mature (LY). Suivant la dégradation lysosomiale, l'autophagosome tardif devient résiduel et ce matériel est éliminé par exocytose.

Par conséquent, dans notre système où une activité autophagique précède et/ou parallèle l'induction de l'apoptose, différentes organelles endosomales hybrides (incluant les MVB et les amphisomes) sont générées pouvant fusionner avec la membrane plasmique dans un contexte associé à une augmentation intracellulaire calcique et à l'apoptose (Figure 44). Reste à savoir comment, mise à part la contribution du calcium intracellulaire, les caspases effectrices régulent la fusion de ces organelles avec la membrane plasmique.

Figure 44: Schématisation des effets fusionnels homotypique et hétérotypique des organelles de la voie endocyttaire durant l'autophagie. Générée par I.S.



Légende : Durant l'autophagie (flèches vertes), la voie endocyttaire est dirigée vers la voie de dégradation. Les MVB fusionnent avec les autophagosomes afin de former les amphisomes. Par la suite, les MVB, les autophagosomes et les amphisomes fusionnent avec les lysosomes afin de terminer le processus de dégradation. De plus, l'autophagie pourrait favoriser des événements fusionnels homotypique et hétérotypique générant des populations hétérogènes d'organelles.

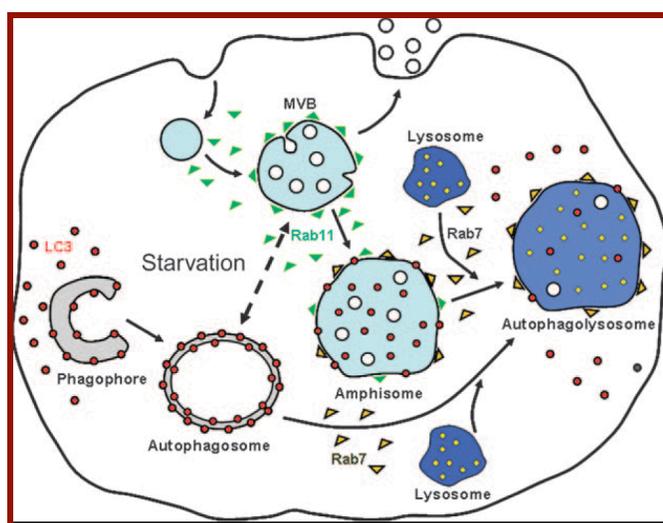
Convergence de la voie endocytaire et de l'autophagie via les Small GTPase Rab

Il est connu que le transport vésiculaire intracellulaire nécessite des protéines appelées Rab appartenant à la famille des small GTPase représentées à ce jour au nombre de 70. Ces protéines contrôlent différentes étapes du trafic vésiculaire incluant le bourgeonnement, la motilité ainsi que le 'docking' et la fusion de différents transports intermédiaires avec la membrane plasmique (489). En général, les Rab servent de commutateur moléculaire pouvant lier le GTP ou le GDP, dépendant des effecteurs associés aux Rab. Par exemple, les GEF (Guanine nucléotide exchange factors) permettent d'échanger le GDP pour le GTP, activant ainsi les Rab. En retour, les GAP (GTPase activating proteins) clive le GTP en GDP, inhibant ainsi l'activité des Rab. De plus, les GDI (Guanine dissociation inhibitor) préviennent la relâche du GDP favorisant ainsi les Rab sous une forme inactive. Finalement, les GDF (GDI displacement factor) peuvent compétitionner avec les GDI afin de faciliter l'association des Rab avec les membranes d'intérêt (490). Parmi les différentes protéines Rab n'affectant pas la voie sécrétoire constitutive, il a été démontré que Rab27a et Rab27b régulent la sécrétion des nanovésicules issus des MVB sans toutefois influencer leur contenu intraluminal (491). De plus, les Rab27 appartiennent à la famille Rab3 impliquées principalement dans l'exocytose calcium dépendante et favoriseraient aussi la fusion des WPBs avec la membrane plasmique (446, 490). Par conséquent, il semble que certains Rab soient associés à des voies de sécrétion non conventionnelles.

Or, il existe un lien évident entre l'autophagie et la voie endocytaire. Par exemple, les autophagosomes coopèrent avec les Rab et les différents acteurs de la voie endocytaire (endosomes précoces, MVB et lysosomes) afin de maximiser le processus de dégradation (Figure 45) (492). Durant l'autophagie, Rab11 s'associe aux MVB et favorise la fusion avec les autophagosomes afin de former les amphisomes (148, 481, 493). Par la suite, Rab7 permet aux MVB, autophagosomes et aux amphisomes de fusionner avec les lysosomes afin de générer les autolysosomes permettant de conclure le processus de dégradation. Ainsi, durant l'autophagie, les MVB sont mobilisés à générer des organelles vésiculaires hybrides (incluant les amphisomes) et sont principalement associés à une activité de dégradation plutôt qu'à une activité sécrétoire. De plus, il est important d'apprécier que la fusion des organelles endosomales génère une population hétérogène d'organelles vésiculaires ayant probablement des affinités différentes avec la membrane plasmique selon leur colocalisation avec différentes protéines Rab. Finalement, la présence abondante de différentes protéines rab dans les exosomes et dans différentes organelles

endosomales suggère qu'ils puissent jouer des rôles spécifiques dans les processus de fusion (350).

Figure 45: L'autophagie et la voie endocytaire. Reproduit de (481) avec la permission de John Wiley and Sons, copyright 2008.



Légende : L'inanition favorise la fusion entre les vacuoles autophagiques et les MVB. Le modèle suggère que la protéine LC3 est associée à une vacuole à double-membrane (autophagosome), qui peut fusionner directement avec un lysosome formant un autophagolysosome. Dans la voie endocytaire des cellules K562, Rab11 s'associe à la membrane des MVB qui, générée après une invagination et le 'pincement' de la membrane limitante, favorisent l'accumulation de petites vésicules intraluminales. Ces vésicules intraluminales nommées exosomes sont éventuellement libérés dans le milieu extracellulaire via la fusion des MVB avec la membrane plasmique. Nous proposons que l'induction de l'autophagie (i.e. par inanition) favorise la fusion entre les vacuoles autophagiques et les MVB (a Rab11-dependent event) générant un organelle hybride, l'amphisome, qui finalement fusionne avec des compartiments associés aux lysosomes. La fusion des autophagosomes avec les lysosomes et la fusion des amphisomes avec les compartiments lysosomiaux dépendent tous deux de Rab7 à l'état actif.

Régulation de la sécrétion exosomiale durant la phase effectrice de l'apoptose

1^{er} indice : Inhibition de l'endocytose et de la voie de dégradation par la caspase-3 activée.

Il a été démontré que la caspase-1 activée doit directement cliver IL-1 beta afin que celui-ci puisse acquérir une forme mature et biologiquement active. Or, nos travaux démontrent que TCTP est exporté suivant l'activation de la caspase-3 mais ne nécessite pas de clivage par celle-ci (Figure 6 H de l'article principal). Ainsi, la caspase-3 ne semble pas influencer la sécrétion de nos médiateurs via un clivage direct de ceux-ci. Par conséquent, la caspase-3 activée doit potentiellement réguler des effecteurs de la voie endocyttaire et de la sécrétion permettant par la suite l'export de TCTP par des mécanismes de sécrétion non conventionnels.

Certaines évidences suggèrent que la caspase 3 activée permettrait de réguler le trafic endocyttaire. La bactérie *Legionella Pneumophila* envahit et se réplique dans les macrophages alvéolaires. Suivant son entrée dans la cellule, *L. pneumophila* module la formation du phagosome en niche répliquative qui exclut Rab5, évitant ainsi d'être redirigé vers la voie endosomale-lysosomale permettant la dégradation du pathogène. Durant son invasion, ce pathogène induit l'activation de la caspase 3 via l'injection intracellulaire de protéines Dot-Icm et ce, de manière indépendante de l'activation des voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose de l'hôte. La beauté de cette étude est qu'elle démontre que la caspase-3 activée permet d'inhiber la voie de dégradation endosome-lysosome via le clivage de Rabptatin, soit l'effecteur le plus important de Rab5 dans les mécanismes de fusion menant à la voie de dégradation lysosomiale (494). Autre fait intéressant est que l'apoptose initie aussi le clivage de EEA1, soit un autre effecteur impliqué dans la fusion des vésicules issues de l'endocytose avec les endosomes précoces (267). Par conséquent, l'activation de la caspase 3 pourrait défavoriser les évènements de fusion des endosomes précoces avec les MVB en régulant négativement les effecteurs de Rab5 dans notre système. Ainsi, ce premier indice pourrait suggérer que l'activation de la caspase-3 favorise l'équilibre fusionnel des MVB vers la membrane plasmique plutôt que vers la voie endocyttaire de dégradation via la protéolyse des effecteurs des Rab. De manière intéressante, le groupe de Marhus et al. ont observé que différentes protéines associées à l'endocytose forme un interactome qui servirait de substrat pour les caspases effectrices durant l'apoptose. Ces observations suggèrent que la phase effectrice de l'apoptose inhiberait les mécanismes d'endocytose.

2^{ème} indice : Rab7 et la voie de dégradation lysosomiale

Rab7 est une protéine principalement impliquée dans les événements menant à la voie de dégradation lysosomiale associée aussi à la voie autophagique. Elle favorise entre autre la fusion des lysosomes avec 1) les MVB ; 2) les autophagosomes et 3) les amphisomes (148). Rab7 ne semble pas être impliqué dans la fusion des organelles endosomales avec la membrane plasmique. Il semble davantage associé aux événements de fusion avec les lysosomes afin de terminer le processus de dégradation.

3^{ème} indice : Régulation des rabs et de leurs effecteurs durant l'apoptose

L'étude du *Legionella Pneumophila* suggère que la caspase-3 activée peut réguler le trafic endosomal. Mon premier réflexe fût d'évaluer si d'autres Rab ou leurs effecteurs sont directement clivés durant l'apoptose. La banque de données CASBAH disponible sur l'internet regroupe tous les substrats pouvant être clivés durant l'apoptose (267). Ces données proviennent entre autre d'une étude protéomique ayant déterminé différents sites de clivage de différents substrats selon la structure tridimensionnelle des protéines et non seulement sur des séquences d'acides aminés. CASBAH comptabilise 4 protéines associées à la famille Rab clivées durant l'apoptose : Rab2a, Rabaptin-5 et Rab10, Rab11b. De manière intéressante, ces Rab sont impliquées dans le transport vésiculaire en général. Parmi celles-ci, Rab11b est le candidat le plus intéressant concernant la régulation des mécanismes de fusion des MVB avec la membrane plasmique. De plus, nous avons identifié Rab11b dans le SSC-apo à l'aide d'une approche protéomique (en solution).

Rab11 a et Rab11b

Rab11a et Rab11b sont des protéines surtout impliquées dans des événements de fusion homotypique et hétérotypique des organelles vésiculaires et avec la membrane plasmique. En général, il est dit que Rab11 (forme non spécifiée) est impliqué dans la fusion des MVB avec les autophagosomes afin de générer les amphisomes et semblerait aussi être impliqué dans la fusion des MVB avec la membrane plasmique (480, 495). Ces résultats suggèrent que différents isoformes de Rab11 puissent avoir des fonctions différentes dépendamment de leur localisation et de leur niveau d'expression. Selon la littérature récente, il semble qu'effectivement, Rab11a et Rab11b diffèrent de manière importante sur plusieurs points. En premier lieu, leur localisation cellulaire semble être différente. Rab11a est davantage associé à la membrane plasmique tandis que Rab11b est davantage associé aux organelles de la voie endocytaire (496-498). Malgré que

Rab11a et Rab11b partagent 90% d'homologie de séquence, des études de cristallographie ont révélé que leur structure tridimensionnelle diffère significativement (499). Ainsi, soit que la structure tertiaire de Rab11a ne permet pas aux caspases de procéder à la protéolyse de ce substrat ou le complexe au sein duquel se retrouve Rab11a n'est pas accessible au clivage par les caspases. Ce point pourrait expliquer le fait que Rab11a n'ait pas été identifié dans l'étude protéomique des substrats de caspases de Mahrus et al. (207), et ce, malgré la présence du même site de clivage que Rab11b dans la séquence primaire d'acides aminés. Finalement, Rab11b régule négativement la sécrétion de type calcium dépendante et favorise la voie de sécrétion constitutive de manière spécifique au type cellulaire étudié (500).

En résumé, le clivage de Rab11b (et non de Rab11a) suivant l'activation de l'apoptose permettrait 1) de freiner la fusion des MVB et des autophagosomes impliqués dans la formation d'amphisomes, 2) de favoriser de manière générale des événements de fusion avec la membrane plasmique de manière calcium dépendant. ***Ainsi, l'apoptose défavoriserait la voie de dégradation autophagique des MVB via une protéolyse de Rab11b par les caspases. Cela pourrait influencer l'équilibre fusionnel des MVB (et ou des amphisomes) vers la membrane plasmique via Rab11a en partenariat avec Rab27. Ceci pourrait expliquer le relargage des nanovésicules dans le milieu extracellulaire suivant un stress apoptotique.*** De plus, la diversité d'organelles endosomales générées durant l'autophagie pouvant fusionner avec la membrane plasmique, contribue probablement à la diversité des médiateurs retrouvés dans le milieu extracellulaire (Figure 46, flèches rouges vers la membrane plasmique).

GDI-2

Une autre approche que j'ai utilisée concernant le rôle potentiel des caspases effectrices dans la régulation des Rab et la fusion membranaire, consistait à évaluer si leurs effecteurs connus (GAP, GEF, GDI et GDF) sont clivés durant l'apoptose. Compte tenu que les Rab puissent jouer plusieurs rôles redondants, la régulation des Rab par la protéolyse de leurs inhibiteurs permettraient d'ajouter une étape additionnelle de régulation. À ma grande surprise, mes recherches ont révélé plusieurs points très intéressants : 1) Rab11 (forme non spécifiée) est impliqué dans le transport vésiculaire vers la membrane plasmique et est spécifiquement et préférentiellement la cible des GDI (forme non spécifiée) (501); 2) GDI-2, et non GDI-1, est clivé par la caspase-3 durant l'apoptose (502) ; 3) GDI-2, et non GDI-1, lie de manière statistiquement significative (503 , 504) des Rab associés à l'endocytose (Rab5), au transport vésiculaire du TGN à la membrane plasmique (Rab8) (505) ainsi que Rab11a et Rab11b ; 4) GDI-2 et GDI-1 ont des affinités différentes pour les Rab (506). ***De***

cette façon, les caspases effectrices activées pourraient cliver un complexe protéique incluant GDI-2 et Rab11b détournant l'équilibre de la voie endocytaire vers la sécrétion plutôt que vers la dégradation. Le clivage de GDI-2 à la membrane plasmique permettrait de libérer Rab11a et favoriser les mécanismes de fusion avec la membrane plasmique.

En résumé, je propose que dans notre système, la régulation des Rab durant la phase effectrice de l'apoptose influence positivement la sécrétion exosomiale de la manière suivante (Figure 46):

- 1) La déprivation de facteur de croissance initie une réponse autophagique permettant de générer une population hétérogène d'organelles endosomales hybrides fusionnant avec les lysosomes et dirigés vers la voie de dégradation;
- 2) Rab11a est inhibé par GDI-2 durant l'autophagie, inhibant ainsi la fusion des MVB avec la membrane plasmique ; Rab11b participe à la fusion des MVB avec les autophagosomes;
- 3) L'autophagie et l'induction de l'apoptose favorisent une augmentation intracellulaire calcique, favorisant ainsi les évènements de fusion et de sécrétion calcium dépendants;
- 4) Suivant l'activation de la caspase-3, l'endocytose et la fusion des endosomes précoces avec les MVB sont inhibées via la dégradation des protéines régulatrices de Rab5 de l'endocytose (EEA1, Rabaptin);
- 5) Rab11b (et non Rab11a) est clivé durant l'apoptose mettant un frein aux évènements de fusion entre les MVB et des autophagosomes et à la voie de dégradation;
- 6) De concert avec une augmentation calcique intracellulaire, l'activation de la caspase-3 initie le clivage de GDI-2, permettant ainsi à Rab11a de participer à la fusion des MVB (et probablement des amphisomes) avec la membrane plasmique, favorisant ainsi la sécrétion non conventionnelle.

Conclusion

'First, do no harm'.

- Hippocrate et (507)

Les travaux présentés dans cette thèse forment un continuum avec l'hypothèse de réponse à l'insulte proposée par le Dr Russell Ross (59) et le Danger Model proposé par Polly Matzinger (508, 509). Le Danger Model propose que le système immunitaire est davantage concerné par le dommage tissulaire et il est davantage sollicité par les tissus qui envoient des signaux d'alarme que par la reconnaissance de molécules du non soi. Ce modèle propose que les APC sont activés en réponse aux signaux d'alarmes provenant des cellules stressées par des agents exogènes (LPS) et des agents endogènes ADN, ARN, HSP, INF-gamma, CD40L résultants d'infection ou de dommages mécaniques associés aux manœuvres chirurgicales. Le point le plus important est que ces signaux ne doivent pas être générés par des cellules saines ou subissant une mort physiologique (incluant l'apoptose) (507). Les récepteurs de la famille des toll-like receptors (TLR TLR2, TLR4 et TLR9) permettraient aux APC de reconnaître ces signaux d'alarmes (508, 510).

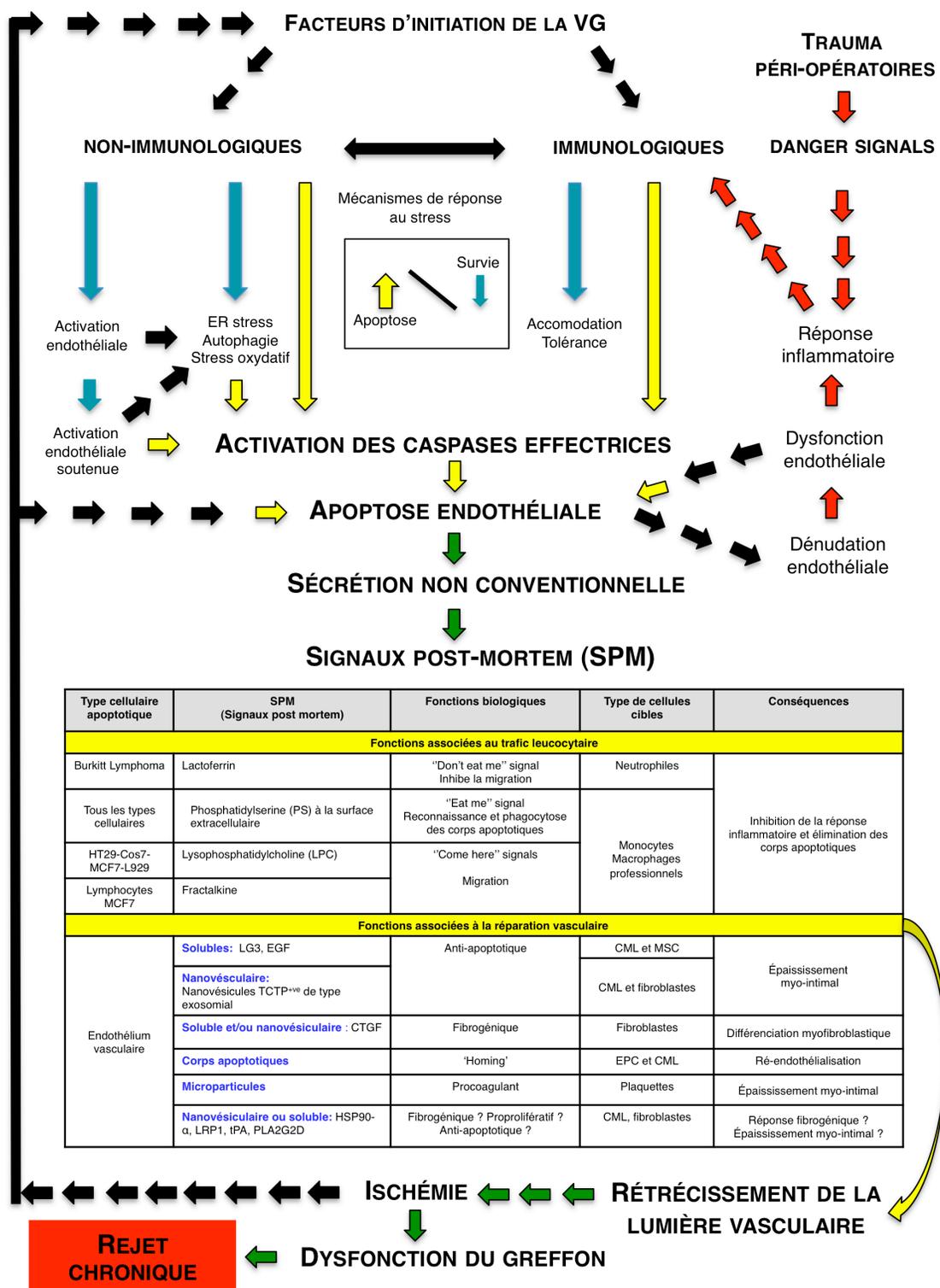
Le Danger Model permettrait d'expliquer pourquoi un fœtus qui est par définition un corps étranger, n'est pas rejeté par la mère. Compte tenu qu'un fœtus qui se développe normalement ne déploie pas de signaux d'alarmes, le système immunitaire n'est pas concerné par le fœtus. En lien avec le Danger Model, les cellules tumorales pourraient déjouer le recrutement du système immunitaire compte tenu qu'elles se répliquent, elles semblent 'saines' et n'envoient de signaux d'alarmes (507). Le Danger Model suggère une explication relative à l'effet bénéfique des greffons provenant de donneurs vivants comparativement aux greffons d'origine cadavérique. De manière évidente, les greffons d'origine cadavérique subissent des dommages tissulaires d'origines systémiques pouvant générer des signaux d'alarmes avant même d'être transplantés (511).

Les progrès réalisés entourant l'utilisation d'immunosuppresseurs et la diminution importante du rejet aigu sans toutefois d'amélioration importante concernant le rejet chronique démontre que la participation du système immunitaire représente seulement une partie du casse-tête. Mes travaux m'amènent à comprendre qu'en fait, différentes catégories de signaux sont générés avant, pendant et après la transplantation contribuant au développement de la vasculopathie du greffon. Ainsi, selon l'hypothèse de réponse à l'insulte proposée par Russell Ross, des facteurs non-immunologiques et immunologiques participent, directement ou indirectement à induire l'apoptose

des cellules vasculaires du greffon (Figure 47). Parallèlement, et de façon sous-estimée, les manœuvres péri-opératoires et l'état vivant ou cadavérique du greffon génèrent la production de signaux d'alarmes (Danger Model) sollicitant le système immunitaire à répondre aux dommages cellulaires mécaniques. Ceci a pour effet d'amplifier la participation des facteurs immunologiques dans l'initiation de la VG. Les signaux d'alarmes ne sont pas les seuls à générer des boucles d'amplification. Tel que décrit précédemment, l'apoptose endothéliale est un mécanisme d'insulte commun aux facteurs non-immunologiques et immunologiques. Afin de répondre à l'insulte et de réparer le dommage vasculaire, l'apoptose endothéliale génère un testament protéique et nanovésiculaire via des voies de sécrétion non conventionnelles. Cet aspect non canonique de la sécrétion permet entre autre de s'assurer que les signaux post-mortem (SPM) de l'apoptose endothéliale soient générés seulement lorsque la cellule a atteint un point de non retour mortel. Ces SPM incluent des molécules favorisant le recrutement de macrophages professionnels et non des neutrophiles, permettant ainsi de ne pas générer une réponse inflammatoire exhaustive et d'initier le processus de 'nettoyage' des corps apoptotiques. De plus, l'apoptose endothéliale semble générer un type particulier de SPM, des nanovésicules de type exosomal, capable de promouvoir des activités de réparation vasculaire. Ces nanovésicules offrirait plusieurs avantages, incluant une stabilisation des médiateurs impliqués dans la signalisation intercellulaire et une signalisation sur une longue distance. Les prochaines années seront riches en découvertes concernant le rôle réparateur des nanovésicules issues de l'apoptose endothéliale.

Plusieurs boucles d'amplification participent au maintien des facteurs d'initiation de la VG, illustrant ainsi la complexité de ce phénomène. Lorsque les stress initiaux sont maintenus, l'apoptose endothéliale continue de générer les SPM qui ne font que leur travail, i.e. de réparer les vaisseaux endommagés. Ainsi, ce remodelage vasculaire devient chronique et contribue à la réduction de la lumière vasculaire générant de manière répétée des épisodes d'ischémie et une dysfonction du greffon. Ces épisodes d'ischémie génèrent directement un stress apoptotique aux cellules environnantes, soutenant ainsi la production de SPM. De plus, de façon indirecte, ces épisodes ischémiques peuvent amplifier les facteurs d'initiation de la VG (immunologiques et non immunologiques) qui forment une boucle d'amplification entre eux. Conséquemment, cette schématisation permet de mieux comprendre pourquoi nous n'avons pas réussi encore à enrayer le rejet chronique seulement à l'aide d'immunosuppresseurs.

Figure 47: Schématisation des évènements participant au développement de la vasculopathie du greffon. Générée par I.S.



Légende : Suivant une période d'adaptation (flèches bleues), plusieurs facteurs initiaux participent à induire l'apoptose endothéliale (flèches jaunes). De plus, certains signaux d'alarmes (Danger Signals) contribuent parallèlement à amplifier les facteurs immunologiques initiaux impliqués dans la procédure chirurgicale de transplantation (flèches rouges). Suivant l'induction de l'apoptose endothéliale, des signaux post mortem (SPM) sécrétés via des mécanismes non conventionnels (flèches vertes) participent à initier une réponse de réparation (tableau). La maintenance des facteurs initiaux menant à l'apoptose endothéliale soutient la production de SPM contribuant au rétrécissement de la lumière vasculaire ainsi qu'à des épisodes ischémiques contribuant à la dysfonction du greffon. En retour, plusieurs boucles d'amplification (flèches noires) contribuent à soutenir les facteurs d'initiation associés au développement de la VG.

En grande conclusion, l'étude du sécrétome libéré par les CE apoptotiques m'a guidée vers la découverte de nouveaux médiateurs impliqués dans le remodelage vasculaire pathologique. Mon projet illustre un bel exemple synergique entre l'élaboration d'une hypothèse initiale et des hypothèses générées à partir de données protéomiques. Dans cette thèse, le point de départ concernait la problématique associée au rejet chronique conséquent à la vasculopathie du greffon. L'hypothèse initiale reposait sur l'importance de l'endothélium en réponse au stress apoptotique et son implication paracrine dans l'initiation de la réparation vasculaire. En adressant la question : que sécrète spécifiquement les cellules endothéliales apoptotiques, les données protéomiques ont révélé que l'apoptose génère plusieurs médiateurs de réparation vasculaire, que ces médiateurs sont sécrétés de manière non conventionnelle, que les caspases effectrices régulent potentiellement ces voies de sécrétion, et que les SPM de nature nanovésiculaire seraient particulièrement importants dans le processus de réparation vasculaire. Dépendamment du stress subit par la cellule, ses mémoires métaboliques sont inscrites dans son testament vésiculaire. Les SPM générés durant l'apoptose endothéliale seront certainement de futurs biomarqueurs associés au remodelage vasculaire pathologique.

Les connaissances évoluent, mais la vérité est immuable. Les confondre, c'est faire preuve de naïveté.

- Moïse Bendayan

Annexe 1 - La classification de Banff

Reproduit de (28) avec la permission de John Wiley and Sons, Copyright 2010.

Banff '09 Meeting Report

Table 1: Banff 97 diagnostic categories for renal allograft biopsies—Banff '09 update

-
1. Normal
 2. Antibody-mediated changes (may coincide with categories 3, 4 and 5 and 6)
Due to documentation of circulating antidonor antibody, C4d,¹ and allograft pathology
 - C4d deposition without morphologic evidence of active rejection
C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, no signs of acute or chronic TCMR or ABMR (i.e. g0, cg0, ptc0, no ptc lamination (<5 layers by electron microscopy), no ATN-like minimal inflammation). Cases with simultaneous borderline changes are considered as indeterminate
 - Acute antibody-mediated rejection²
C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of acute tissue injury, such as (Type/Grade)
 - I. ATN-like minimal inflammation
 - II. Capillary and/or glomerular inflammation (ptc/g >0) and/or thromboses
 - III. Arterial – v3
 - Chronic active antibody-mediated rejection²
C4d+, presence of circulating antidonor antibodies, morphologic evidence of chronic tissue injury, such as glomerular double contours and/or peritubular capillary basement membrane multilayering and/or interstitial fibrosis/tubular atrophy and/or fibrous intimal thickening in arteries
 3. Borderline changes: 'Suspicious' for acute T-cell mediated rejection (may coincide with categories 2 and 5, and 6)
This category is used when no intimal arteritis is present, but there are foci of tubulitis (t1, t2 or t3) with minor interstitial infiltration (i0 or i1) or interstitial infiltration (i2, i3) with mild (t1) tubulitis
 4. T-cell mediated rejection (TCMR, may coincide with categories 2 and 5 and 6)
 - Acute T-cell mediated rejection (Type/Grade:)
 - IA. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of moderate tubulitis (t2)
 - IB. Cases with significant interstitial infiltration (>25% of parenchyma affected, i2 or i3) and foci of severe tubulitis (t3)
 - IIA. Cases with mild to moderate intimal arteritis (v1)
 - IIB. Cases with severe intimal arteritis comprising >25% of the luminal area (v2)
 - III. Cases with 'transmural' arteritis and/or arterial fibrinoid change and necrosis of medial smooth muscle cells with accompanying lymphocytic inflammation (v3)
 - Chronic active T-cell mediated rejection
'chronic allograft arteriopathy' (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell infiltration in fibrosis, formation of neo-intima)
 5. Interstitial fibrosis and tubular atrophy, no evidence of any specific etiology
(may include nonspecific vascular and glomerular sclerosis, but severity graded by tubulointerstitial features)
Grade
 - I. Mild interstitial fibrosis and tubular atrophy (<25% of cortical area)
 - II. Moderate interstitial fibrosis and tubular atrophy (26–50% of cortical area)
 - III. Severe interstitial fibrosis and tubular atrophy/loss (>50% of cortical area)
 6. Other: Changes not considered to be due to rejection—acute and/or chronic (For diagnoses see table 14 in (49)); may include isolated g, cg, or cv lesions and coincide with categories 2, 3, 4, and 5
-

ATN, acute tubular necrosis.

The 2009 updates are underlined. All existing scoring categories (g, t, v, i, ptc, cg, ct, cl, cv, ah, mm) remain unchanged (45, 49).

¹Please refer to Banff 2007 classification paper (45).

²Suspicious for antibody-mediated rejection if C4d (in the presence of antibody) or alloantibody (C4d+) not demonstrated in the presence of morphologic evidence of tissue injury.

Annexe 2 - Nomenclature de la mort cellulaire

Ces 3 tableaux sont reproduits de (176) avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: Cell Death and Differentiation; copyright 2009.

Table 1 Cell death methodology

Definition	Notes	Methods of detection ³⁻⁵
<i>Molecular or morphological criteria to define dead cells</i>		
Loss of plasma membrane integrity	Plasma membrane has broken down, resulting in the loss of cell's identity	(IF) Microscopy and/or FACS to assess the exclusion of vital dyes, <i>in vitro</i>
Cell fragmentation	The cell (including its nucleus) has undergone complete fragmentation into discrete bodies (usually referred to as apoptotic bodies)	(IF) Microscopy FACS quantification of hypodiploid events (sub-G ₁ peak)
Engulfment by adjacent cells	The corpse or its fragments have been phagocytosed by neighboring cells	(IF) Microscopy FACS colocalization studies
<i>Proposed points-of-no return to define dying cells</i>		
Massive activation of caspases	Caspases execute the classic apoptotic program, yet in several instances, caspase-independent death occurs. Moreover, caspases are involved in non-lethal processes including differentiation and activation of cells	Immunoblotting FACS quantification by means of fluorogenic substrates or specific antibodies
$\Delta\Psi_m$ dissipation	Protracted $\Delta\Psi_m$ loss usually precedes MMP and cell death; however, transient dissipation is not always a lethal event	FACS quantification with $\Delta\Psi_m$ -sensitive probes Calcein-cobalt technique
MMP	Complete MMP results in the liberation of lethal catabolic enzymes or activators of such enzymes. Nonetheless, partial permeabilization may not necessarily lead to cell death	IF colocalization studies Immunoblotting after subcellular fractionation
PS exposure	PS exposure on the outer leaflet of the plasma membrane often is an early event of apoptosis, but may be reversible. PS exposure occurs also in T-cell activation, without cell death	FACS quantification of Annexin V binding
<i>Operative definition of cell death, in particular in cancer research</i>		
Loss of clonogenic survival	This method does not distinguish cell death from long-lasting or irreversible cell cycle arrest	Clonogenic assays

Abbreviations: $\Delta\Psi_m$, mitochondrial transmembrane permeabilization; FACS, fluorescence-activated cell sorter; IF, immunofluorescence; MMP, mitochondrial membrane permeabilization; PS, phosphatidylserine

Table 2 Distinct modalities of cell death

Cell death mode	Morphological features	Notes
Apoptosis	<ul style="list-style-type: none"> Rounding-up of the cell Retraction of pseudopodes Reduction of cellular and nuclear volume (pyknosis) Nuclear fragmentation (karyorrhexis) Minor modification of cytoplasmic organelles Plasma membrane blebbing Engulfment by resident phagocytes, <i>in vivo</i> 	'Apoptosis' is the original term introduced by Kerr <i>et al.</i> ¹⁴ to define a type of cell death with specific morphological features. Apoptosis is NOT a synonym of programmed cell death or caspase activation.
Autophagy	<ul style="list-style-type: none"> Lack of chromatin condensation Massive vacuolization of the cytoplasm Accumulation of (double-membraned) autophagic vacuoles Little or no uptake by phagocytic cells, <i>in vivo</i> 	'Autophagic cell death' defines cell death occurring with autophagy, though it may misleadingly suggest a form of death occurring by autophagy as this process often promotes cell survival. ^{15,16}
Cornification	<ul style="list-style-type: none"> Elimination of cytosolic organelles Modifications of plasma membrane Accumulation of lipids in F and L granules Extrusion of lipids in the extracellular space Desquamation (loss of corneocytes) by protease activation 	'Cornified envelope' formation or 'keratinization' is specific of the skin to create a barrier function. Although apoptosis can be induced by injury in the basal epidermal layer (e.g., UV irradiation), cornification is exclusive of the upper layers (granular layer and stratum corneum). ^{17,18}
Necrosis	<ul style="list-style-type: none"> Cytoplasmic swelling (oncosis) Rupture of plasma membrane Swelling of cytoplasmic organelles Moderate chromatin condensation 	'Necrosis' identifies, in a negative fashion, cell death lacking the features of apoptosis or autophagy. ⁴ Note that necrosis can occur in a regulated fashion, involving a precise sequence of signals.

Table 3 Biochemical aspects of distinct modalities of cellular catabolism

Cell death mode	Biochemical features	Methods for detection ³⁻⁶
Apoptosis	Activation of proapoptotic Bcl-2 family proteins (e.g., Bax, Bak, Bid)	IF microscopy localization studies Immunoblotting with conformation-specific antibodies
	Activation of caspases	Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays in live cells Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of lysates in microtiter plates FACS/IF microscopy quantification with antibodies specifically recognizing the active form of caspases FACS/IF microscopy quantification with antibodies specific for cleaved caspase substrates FACS/IF microscopy quantification with fluorogenic substrates Immunoblotting assessment of caspase-activation state Immunoblotting assessment of the cleavage of caspase products
	$\Delta\Psi_m$ dissipation	Calcium-cobalt technique (FACS/IF microscopy) FACS/IF microscopy quantification with $\Delta\Psi_m$ -sensitive probes Oxygen-consumption studies (polarography)
	MMP	Colorimetric techniques to assess the accessibility of exogenous substrates to IM-embedded enzymatic activities FACS-assisted detection of IMS proteins upon plasma membrane permeabilization FACS-assisted detection of physical parameters of purified mitochondria HPLC-assisted quantification of mitochondrial alterations in purified mitochondria IF microscopy colocalization studies of IMS proteins (e.g., Cyt c) with sessile mitochondrial proteins (e.g., VDAC1) IF (video) microscopy with Cyt c-GFP fusion protein Immunoblotting detection of IMS proteins (e.g., Cyt c) upon cellular fractionation
	Oligonucleosomal DNA fragmentation	DNA ladders FACS quantification of hypodiploid cells (sub-G ₁ peak) TUNEL assays
	Plasma membrane rupture	Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of culture supernatants in microtiter plates to determine the release of cytosolic enzymatic activities (e.g., LDH) FACS quantification with vital dyes
	PS exposure	FACS quantification of Annexin V binding
	ROS overgeneration	FACS/IF microscopy quantification with ROS-sensitive probes
	ssDNA accumulation	FACS quantification with ssDNA-specific antibodies
	Autophagy	Becclin-1 dissociation from Bcl-2/XL
Dependency on atlgene products		Genetic studies (e.g., knockout models, RNA interference, plasmid-driven overexpression systems)
LC3 I to LC3 II conversion		IF microscopy with GFP-LC3 fusion protein Immunoblotting with LC3-specific antibodies
p62 ^{Lck} degradation		Immunoblotting with p62-specific antibodies
Comitigation	Expression of TGs	Immunoblotting with antibodies specific for TG type 1, 3 and 5 qRT-PCR
	Expression of TG substrates	Immunoblotting with antibodies specific for TG substrates (e.g., keratin, SPR, involucrin, keratins) qRT-PCR
	Crosslinking activity	HPLC detection of K-L isodi-peptide bonds Monodansyl-cadaverine incorporation to detect TG activity in tissues Radiolabeled putrescine incorporation to detect TG activity in cell extracts
Necrosis	Activation of calpains	Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of cell lysates in microtiter plates
	Activation of cathepsins	Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays in live cells Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of cell lysates in microtiter plates
	Drop of ATP levels	Luminometric assessments of ATP/ADP ratio
	HMGB-1 release	Immunoblotting of culture medium with HMGB-1-specific antibodies
	LMP	FACS quantification with lysomorphotropic probes
	Plasma membrane rupture	Colorimetric/fluorogenic substrate-based assays of culture supernatants in microtiter plates to determine the release of cytosolic enzymatic activities (e.g., LDH) FACS quantification with vital dyes
	RIP1 phosphorylation	Immunoblotting with phosphoepitope-specific antibodies
	RIP1 ubiquitination	Immunoprecipitation with anti-RIP1 antibodies followed by immunoblotting with anti-ubiquitin antibodies
	ROS overgeneration	FACS quantification with ROS-sensitive probes
	Specific PARP1 cleavage pattern	Immunoblotting with PARP1-specific antibodies

Abbreviations: $\Delta\Psi_m$, mitochondrial transmembrane permeabilization; Cyt c, cytochrome c; FACS, fluorescence-activated cell sorter; GFP, green fluorescent protein; HPLC, high-pressure liquid chromatography; IF, immunofluorescence; IM, mitochondrial inner membrane; IMS, mitochondrial intermembrane space; LDH, lactate dehydrogenase; LMP, lysosomal membrane permeabilization; MMP, mitochondrial membrane permeabilization; PS, phosphatidylserine; qRT-PCR, real-time quantitative reverse transcription PCR; ROS, reactive oxygen species; RNAi, RNA interference; TG, transglutaminase; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling; VDAC1, voltage-dependent anion channel 1

Bibliographie

1. James T. Willerson MWM, Valentin Fuster. Russell Ross, PhD Visionary Basic Scientist in Cardiovascular Medicine. *Circulation* 2001 (203): 478.
2. Transplants of Delight. 2005 [cited 24 novembre 2010]; Available from: <http://www.smh.com.au/news/health/transplants-of-delight/2005/07/14/1120934333861.html?from=moreStories>.
3. Johnstone R. How I became a biochemist. *IUBMB Life* 2004 Feb; **56** (2): 109-111.
4. Kahan BD. Cosmas and Damian in the 20th century. *N Engl J Med* 1981 Jul 30; **305** (5): 280-281.
5. Zirm E. Eine erfolgreiche totale keratoplastik. *Arch Ophthalmol* 1906; **64**: 580-593.
6. Sade RM. Transplantation at 100 years: Alexis Carrel, pioneer surgeon. *Ann Thorac Surg* 2005 Dec; **80** (6): 2415-2418.
7. Shuster BA, Hoffman LA. An old friendship revisited: plastic surgery and transplantation. *Aesthetic Plast Surg* 1994 Spring; **18** (2): 135-139.
8. Nobelprize.org. Peter Medawar - Documentary. [cited 13 juillet 2010]; Available from: http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1960/medawar-docu.html
9. Murray JE. Reflections on the first successful kidney transplantation. *World J Surg* 1982 May; **6** (3): 372-376.
10. Murray JE, Merrill, J.P., Harrison, J.H. Renal homo-transplantation in identical twins. *Surgical Forum* 1955; **6**: 432.
11. Murray JEaW, R.E. The role of organ transplantation in biological research. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1966 (129): 585.
12. Lechler RI, Sykes M, Thomson AW, Turka LA. Organ transplantation--how much of the promise has been realized? *Nat Med* 2005 Jun; **11** (6): 605-613.
13. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, *et al.* Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999 Dec 2; **341** (23): 1725-1730.
14. Wizemann V, Benedum J. Nephrology dialysis transplantation 70th anniversary of haemodialysis--the pioneering contribution of Georg Haas (1886-1971). *Nephrol Dial Transplant* 1994; **9** (12): 1829-1831.
15. Clark B, Unsworth DJ. HLA and kidney transplantation. *J Clin Pathol* 2010 Jan; **63** (1): 21-25.

16. Tantravahi J, Womer KL, Kaplan B. Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival? *Annu Rev Med* 2007; **58**: 369-385.
17. Rose AG. Understanding the pathogenesis and the pathology of hyperacute cardiac rejection. *Cardiovasc Pathol* 2002 May-Jun; **11** (3): 171-176.
18. Janeway C. *Immunobiology : the immune system in health and disease*, 5th edn. Garland Pub.: New York, 2001, xviii, 732 p.pp.
19. Administration H-HRaS. Kidney Transplant Patient and Allograft Survival Trends. 2008 [cited; Available from: http://www.ustransplant.org/annual_reports/current/Chapter_III_AR_CD.htm?cp=4#table_III_2
20. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 2007 Apr; **18** (4): 1046-1056.
21. Solez K. History of the Banff classification of allograft pathology as it approaches its 20th year. *Curr Opin Organ Transplant* 2010 Feb; **15** (1): 49-51.
22. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, *et al*. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* 1993 Aug; **44** (2): 411-422.
23. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, *et al*. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999 Feb; **55** (2): 713-723.
24. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, *et al*. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 2003 Jun; **3** (6): 708-714.
25. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004 Oct; **4** (10): 1562-1566.
26. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, *et al*. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007 Mar; **7** (3): 518-526.
27. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, *et al*. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008 Apr; **8** (4): 753-760.
28. Sis B, Mengel M, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, *et al*. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *Am J Transplant* 2010 Mar; **10** (3): 464-471.
29. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. *Annu Rev Pathol* 2008; **3**: 189-220.

30. Zachary AA, Montgomery RA, Jordan SC, Reinsmoen NL, Claas FH, Reed EF. 14th International HLA and Immunogenetics Workshop: report on understanding antibodies in transplantation. *Tissue Antigens* 2007 Apr; **69** Suppl 1: 160-173.
31. Pei R, Lee JH, Shih NJ, Chen M, Terasaki PI. Single human leukocyte antigen flow cytometry beads for accurate identification of human leukocyte antigen antibody specificities. *Transplantation* 2003 Jan 15; **75** (1): 43-49.
32. Feucht HE, Felber E, Gokel MJ, Hillebrand G, Nattermann U, Brockmeyer C, *et al.* Vascular deposition of complement-split products in kidney allografts with cell-mediated rejection. *Clin Exp Immunol* 1991 Dec; **86** (3): 464-470.
33. Feucht HE, Schneeberger H, Hillebrand G, Burkhardt K, Weiss M, Riethmuller G, *et al.* Capillary deposition of C4d complement fragment and early renal graft loss. *Kidney Int* 1993 Jun; **43** (6): 1333-1338.
34. Murata K, Baldwin WM, 3rd. Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplant Rev (Orlando)* 2009 Jul; **23** (3): 139-150.
35. Maujiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, *et al.* Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* 2002 Mar; **13** (3): 779-787.
36. Bohmig GA, Exner M, Habicht A, Schillinger M, Lang U, Kletzmayer J, *et al.* Capillary C4d deposition in kidney allografts: a specific marker of alloantibody-dependent graft injury. *J Am Soc Nephrol* 2002 Apr; **13** (4): 1091-1099.
37. Haas M, Rahman MH, Racusen LC, Kraus ES, Bagnasco SM, Segev DL, *et al.* C4d and C3d staining in biopsies of ABO- and HLA-incompatible renal allografts: correlation with histologic findings. *Am J Transplant* 2006 Aug; **6** (8): 1829-1840.
38. Sumitran-Holgersson S. Relevance of MICA and other non-HLA antibodies in clinical transplantation. *Curr Opin Immunol* 2008 Oct; **20** (5): 607-613.
39. Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant* 2009 Nov; **9** (11): 2459-2465.
40. Robertson H, Wheeler J, Kirby JA, Morley AR. Renal allograft rejection--in situ demonstration of cytotoxic intratubular cells. *Transplantation* 1996 May 27; **61** (10): 1546-1549.
41. Einecke G, Melk A, Ramassar V, Zhu LF, Bleackley RC, Famulski KS, *et al.* Expression of CTL associated transcripts precedes the development of tubulitis in T-cell mediated kidney graft rejection. *Am J Transplant* 2005 Aug; **5** (8): 1827-1836.
42. Meehan SM, McCluskey RT, Pascual M, Preffer FI, Anderson P, Schlossman SF, *et al.* Cytotoxicity and apoptosis in human renal allografts: identification, distribution, and quantitation of cells with a cytotoxic granule protein GMP-17 (TIA-1) and cells with fragmented nuclear DNA. *Lab Invest* 1997 May; **76** (5): 639-649.
43. August C, Schmid KW, Dietl KH, Heidenreich S. Prognostic value of lymphocyte apoptosis in acute rejection of renal allografts. *Transplantation* 1999 Feb 27; **67** (4): 581-585.

44. Noronha IL, Oliveira SG, Tavares TS, Di Petta A, Dominguez WV, Perosa M, *et al.* Apoptosis in kidney and pancreas allograft biopsies. *Transplantation* 2005 May 15; **79** (9): 1231-1235.
45. Jabs WJ, Sedlmeyer A, Ramassar V, Hidalgo LG, Urmson J, Afrouzian M, *et al.* Heterogeneity in the evolution and mechanisms of the lesions of kidney allograft rejection in mice. *Am J Transplant* 2003 Dec; **3** (12): 1501-1509.
46. Mengel M, Gwinner W, Schwarz A, Bajeski R, Franz I, Brocker V, *et al.* Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am J Transplant* 2007 Feb; **7** (2): 356-365.
47. Wieczorek G, Bigaud M, Menninger K, Riesen S, Quesniaux V, Schuurman HJ, *et al.* Acute and chronic vascular rejection in nonhuman primate kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006 Jun; **6** (6): 1285-1296.
48. Choy JC, Kerjner A, Wong BW, McManus BM, Granville DJ. Perforin mediates endothelial cell death and resultant transplant vascular disease in cardiac allografts. *Am J Pathol* 2004 Jul; **165** (1): 127-133.
49. Russell PS, Chase CM, Colvin RB. Alloantibody- and T cell-mediated immunity in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis: lack of progression to sclerotic lesions in B cell-deficient mice. *Transplantation* 1997 Dec 15; **64** (11): 1531-1536.
50. Sis B, Campbell PM, Mueller T, Hunter C, Cockfield SM, Cruz J, *et al.* Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am J Transplant* 2007 Jul; **7** (7): 1743-1752.
51. Mitchell RN. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annu Rev Pathol* 2009; **4**: 19-47.
52. Robertson H, Ali S, McDonnell BJ, Burt AD, Kirby JA. Chronic renal allograft dysfunction: the role of T cell-mediated tubular epithelial to mesenchymal cell transition. *J Am Soc Nephrol* 2004 Feb; **15** (2): 390-397.
53. Valantine H. Cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: risk factors and management. *J Heart Lung Transplant* 2004 May; **23** (5 Suppl): S187-193.
54. Nordsletten DA, Blackett S, Bentley MD, Ritman EL, Smith NP. Structural morphology of renal vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006 Jul; **291** (1): H296-309.
55. Baluja P, Haragsim L, Laszik Z. Chronic allograft nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2006 Jan; **13** (1): 56-61.
56. Kasiske BL, Snyder JJ, Gilbertson DT, Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2004 Jun; **4** (6): 905-913.
57. Galliford J, Game DS. Modern renal transplantation: present challenges and future prospects. *Postgrad Med J* 2009 Feb; **85** (1000): 91-101.
58. Furukawa Y, Libby P, Stinn JL, Becker G, Mitchell RN. Cold ischemia induces isograft arteriopathy, but does not augment allograft arteriopathy in non-immunosuppressed hosts. *Am J Pathol* 2002 Mar; **160** (3): 1077-1087.
59. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol* 1977 Mar; **86** (3): 675-684.

60. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000 Sep 14; **407** (6801): 233-241.
61. Farzaneh-Far A, Rudd J, Weissberg PL. Inflammatory mechanisms. *Br Med Bull* 2001; **59**: 55-68.
62. Ferran C. Protective genes in the vessel wall: Modulators of graft survival and function. *Transplantation* 2006 Jul 15; **82** (1 Suppl): S36-40.
63. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res* 2006 Oct 13; **99** (8): 801-815.
64. Autieri MV. Allograft-induced proliferation of vascular smooth muscle cells: potential targets for treating transplant vasculopathy. *Curr Vasc Pharmacol* 2003 Mar; **1** (1): 1-9.
65. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002 Nov; **8** (11): 1249-1256.
66. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995 Sep; **77** (3): 445-465.
67. Rahmani M, McDonald PC, Wong BW, McManus BM. Transplant vascular disease: role of lipids and proteoglycans. *Can J Cardiol* 2004 Aug; **20 Suppl B**: 58B-65B.
68. Hillebrands JL, Onuta G, Rozing J. Role of progenitor cells in transplant arteriosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2005 Jan; **15** (1): 1-8.
69. Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhiya T, *et al.* Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002 Apr; **8** (4): 403-409.
70. Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000 Mar; **117** (3): 841-854.
71. Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant* 2006 Feb; **6** (2): 247-253.
72. Choy JC, Hung VH, Hunter AL, Cheung PK, Motyka B, Goping IS, *et al.* Granzyme B induces smooth muscle cell apoptosis in the absence of perforin: involvement of extracellular matrix degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004 Dec; **24** (12): 2245-2250.
73. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine. *Lab Invest* 2002 Jun; **82** (6): 673-686.
74. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Persistent rejection of peritubular capillaries and tubules is associated with progressive interstitial fibrosis. *Kidney Int* 2002 May; **61** (5): 1867-1879.

75. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Intragraft events preceding chronic renal allograft rejection in a modified tolerance protocol. *Kidney Int* 2000 Dec; **58** (6): 2546-2558.
76. Shimizu A, Yamada K, Meehan SM, Sachs DH, Colvin RB. Acceptance reaction: intragraft events associated with tolerance to renal allografts in miniature swine. *J Am Soc Nephrol* 2000 Dec; **11** (12): 2371-2380.
77. Pollman MJ, Hall JL, Mann MJ, Zhang L, Gibbons GH. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med* 1998 Feb; **4** (2): 222-227.
78. Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nishikawa T, Amano J, Kaneda Y. Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res* 2000 Feb; **45** (3): 783-787.
79. Myllarniemi LM, Rasilainen SK, Lemstrom KB, Hayry PJ. Enhanced intimal proliferation upon injury to pre-existing neointima and resistance of neointimal cells to cell death. *Cardiovasc Pathol* 1999 Nov-Dec; **8** (6): 339-347.
80. Fornas D. Solution de préservation d'organe: Descriptif, statut réglementaire et enregistrement en europe. Diplome d'état de docteur en pharmacie thesis, Université Claude Bernard = Lyon I, Lyon, 2001.
81. Lu CY. Management of the cadaveric donor of a renal transplant: more than optimizing renal perfusion? *Kidney Int* 1999 Aug; **56** (2): 756-757.
82. Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, *et al.* Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation* 1998 Jun 27; **65** (12): 1533-1542.
83. Valentine HA. Cardiac allograft vasculopathy: central role of endothelial injury leading to transplant "atheroma". *Transplantation* 2003 Sep 27; **76** (6): 891-899.
84. Gaudin PB, Rayburn BK, Hutchins GM, Kasper EK, Baughman KL, Goodman SN, *et al.* Peritransplant injury to the myocardium associated with the development of accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients. *Am J Surg Pathol* 1994 Apr; **18** (4): 338-346.
85. Schmid C, Heemann U, Tilney NL. Factors contributing to the development of chronic rejection in heterotopic rat heart transplantation. *Transplantation* 1997 Jul 27; **64** (2): 222-228.
86. Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, Pasini E, Comini L, Curello S, *et al.* Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. *Circulation* 2001 Jul 17; **104** (3): 253-256.
87. Esper E, Glagov S, Karp RB, Simonsen KK, Filer SR, Scanu AM, *et al.* Role of hypercholesterolemia in accelerated transplant coronary vasculopathy: results of surgical therapy with partial ileal bypass in rabbits undergoing heterotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1997 Apr; **16** (4): 420-435.
88. Escargueil-Blanc I, Meilhac O, Pieraggi MT, Arnal JF, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Feb; **17** (2): 331-339.

89. Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, Shimokado K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem* 1998 Apr 17; **273** (16): 9681-9687.
90. Li D, Yang B, Mehta JL. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol* 1998 Aug; **275** (2 Pt 2): H568-576.
91. Sata M, Walsh K. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998 Nov 1; **102** (9): 1682-1689.
92. Holvoet P, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J. Oxidized low density lipoprotein is a prognostic marker of transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 Mar; **20** (3): 698-702.
93. Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Krobot K, *et al.* Simvastatin initiated early after heart transplantation: 8-year prospective experience. *Circulation* 2003 Jan 7; **107** (1): 93-97.
94. Gong G, Qin Y, Huang W, Zhou S, Wu X, Yang X, *et al.* Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Chem Biol Interact* 2010 Mar 30; **184** (3): 366-375.
95. Li C, Yang CW. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2009 Sep; **5** (9): 513-519.
96. Vogt CJ, Schmid-Schonbein GW. Microvascular endothelial cell death and rarefaction in the glucocorticoid-induced hypertensive rat. *Microcirculation* 2001 Apr; **8** (2): 129-139.
97. Lin J, Valeri AM, Markowitz GS, D'Agati VD, Cohen DJ, Radhakrishnan J. Angiotensin converting enzyme inhibition in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2002 Mar 15; **73** (5): 783-788.
98. Caforio AL, Tona F, Fortina AB, Angelini A, Piaserico S, Gambino A, *et al.* Immune and nonimmune predictors of cardiac allograft vasculopathy onset and severity: multivariate risk factor analysis and role of immunosuppression. *Am J Transplant* 2004 Jun; **4** (6): 962-970.
99. Wang J, Wilcken DE, Wang XL. Cigarette smoke activates caspase-3 to induce apoptosis of human umbilical venous endothelial cells. *Mol Genet Metab* 2001 Jan; **72** (1): 82-88.
100. Tithof PK, Elgayyar M, Cho Y, Guan W, Fisher AB, Peters-Golden M. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause endothelial cell apoptosis by a phospholipase A2-dependent mechanism. *FASEB J* 2002 Sep; **16** (11): 1463-1464.
101. Terasaki PI, Cho Y, Takemoto S, Cecka M, Gjertson D. Twenty-year follow-up on the effect of HLA matching on kidney transplant survival and prediction of future twenty-year survival. *Transplant Proc* 1996 Jun; **28** (3): 1144-1145.
102. Waaga MR, AM; Tilney, NL. Early risk factors contributing to the evolution of long-term allograft dysfunction. *Transplantation Reviews* 1997; **11** (4): 208-216.

103. Kerman RH, Kimball PM, Lindholm A, Van Buren CT, Katz SM, Lewis RM, *et al.* Influence of HLA matching on rejections and short- and long-term primary cadaveric allograft survival. *Transplantation* 1993 Nov; **56** (5): 1242-1247.
104. Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Najarian JS. The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2). *Transplantation* 1994 Mar 27; **57** (6): 857-859.
105. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet* 2004 Nov 13-19; **364** (9447): 1814-1827.
106. Yamani MH, Yousufuddin M, Starling RC, Tuzcu M, Ratliff NB, Cook DJ, *et al.* Does acute cellular rejection correlate with cardiac allograft vasculopathy? *J Heart Lung Transplant* 2004 Mar; **23** (3): 272-276.
107. Yamakuchi M, Kirkiles-Smith NC, Ferlito M, Cameron SJ, Bao C, Fox-Talbot K, *et al.* Antibody to human leukocyte antigen triggers endothelial exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Jan 23; **104** (4): 1301-1306.
108. Lucchiari N, Panajotopoulos N, Xu C, Rodrigues H, Ianhez LE, Kalil J, *et al.* Antibodies eluted from acutely rejected renal allografts bind to and activate human endothelial cells. *Hum Immunol* 2000 May; **61** (5): 518-527.
109. Weyrich AS, McIntyre TM, McEver RP, Prescott SM, Zimmerman GA. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest* 1995 May; **95** (5): 2297-2303.
110. Wehner J, Morrell CN, Reynolds T, Rodriguez ER, Baldwin WM, 3rd. Antibody and complement in transplant vasculopathy. *Circ Res* 2007 Feb 2; **100** (2): 191-203.
111. Li F, Atz ME, Reed EF. Human leukocyte antigen antibodies in chronic transplant vasculopathy-mechanisms and pathways. *Curr Opin Immunol* 2009 Oct; **21** (5): 557-562.
112. Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, Hiroki J, Mukai Y, Kaibuchi K, *et al.* Long-term treatment with a specific Rho-kinase inhibitor suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice. *Circ Res* 2004 Jan 9; **94** (1): 46-52.
113. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 2010 Jan; **20** (1): 34-50.
114. Baldwin WM, 3rd, Larsen CP, Fairchild RL. Innate immune responses to transplants: a significant variable with cadaver donors. *Immunity* 2001 Apr; **14** (4): 369-376.
115. Nauta AJ, Daha MR, Tijsma O, van de Water B, Tedesco F, Roos A. The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *Eur J Immunol* 2002 Mar; **32** (3): 783-792.
116. Weiser MR, Gibbs SA, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Anti-selectin therapy modifies skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *Shock* 1996 Jun; **5** (6): 402-407.
117. Van Loo AA, Vanholder RC, Bernaert PR, Vermassen FE, Van der Vennet M, Lameire NH. Pretransplantation hemodialysis strategy influences early renal graft function. *J Am Soc Nephrol* 1998 Mar; **9** (3): 473-481.

118. el-Sawy T, Fahmy NM, Fairchild RL. Chemokines: directing leukocyte infiltration into allografts. *Curr Opin Immunol* 2002 Oct; **14** (5): 562-568.
119. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med* 2000 May; **32** (4): 274-278.
120. Wolbink GJ, Brouwer MC, Buysmann S, ten Berge IJ, Hack CE. CRP-mediated activation of complement in vivo: assessment by measuring circulating complement-C-reactive protein complexes. *J Immunol* 1996 Jul 1; **157** (1): 473-479.
121. Harris KR, Digard NJ, Lee HA. Serum C-reactive protein. A useful and economical marker of immune activation in renal transplantation. *Transplantation* 1996 Jun 15; **61** (11): 1593-1600.
122. Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, Taylor KM, Sohail M, Krausz T, *et al.* C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med* 1999 Dec 20; **190** (12): 1733-1740.
123. Collard CD, Vakeva A, Morrissey MA, Agah A, Rollins SA, Reenstra WR, *et al.* Complement activation after oxidative stress: role of the lectin complement pathway. *Am J Pathol* 2000 May; **156** (5): 1549-1556.
124. Bajtay Z, Jozsi M, Banki Z, Thiel S, Thielens N, Erdei A. Mannan-binding lectin and C1q bind to distinct structures and exert differential effects on macrophages. *Eur J Immunol* 2000 Jun; **30** (6): 1706-1713.
125. Troppmann C, Gillingham KJ, Benedetti E, Almond PS, Gruessner RW, Najarian JS, *et al.* Delayed graft function, acute rejection, and outcome after cadaver renal transplantation. The multivariate analysis. *Transplantation* 1995 Apr 15; **59** (7): 962-968.
126. Pagtalunan ME, Olson JL, Tilney NL, Meyer TW. Late consequences of acute ischemic injury to a solitary kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999 Feb; **10** (2): 366-373.
127. Herrero-Fresneda I, Torras J, Cruzado JM, Condom E, Vidal A, Riera M, *et al.* Do alloreactivity and prolonged cold ischemia cause different elementary lesions in chronic allograft nephropathy? *Am J Pathol* 2003 Jan; **162** (1): 127-137.
128. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987 Mar; **18** (3): 234-239.
129. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2007 Oct; **7** (10): 803-815.
130. Rodgers GM. Hemostatic properties of normal and perturbed vascular cells. *FASEB J* 1988 Feb; **2** (2): 116-123.
131. Sessa WC. eNOS at a glance. *J Cell Sci* 2004 May 15; **117** (Pt 12): 2427-2429.
132. Lampugnani MG, Dejana E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* 1997 Oct; **9** (5): 674-682.

133. Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* 2004 Jul; **84** (3): 869-901.
134. Feng D, Nagy JA, Pyne K, Hammel I, Dvorak HF, Dvorak AM. Pathways of macromolecular extravasation across microvascular endothelium in response to VPF/VEGF and other vasoactive mediators. *Microcirculation* 1999 Mar; **6** (1): 23-44.
135. Pober JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annu Rev Pathol* 2009; **4**: 71-95.
136. Lowenstein CJ, Morrell CN, Yamakuchi M. Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med* 2005 Nov; **15** (8): 302-308.
137. Kunsch C, Lang RK, Rosen CA, Shannon MF. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 1994 Jul 1; **153** (1): 153-164.
138. Robert C, Fuhlbrigge RC, Kieffer JD, Ayehunie S, Hynes RO, Cheng G, *et al.* Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J Exp Med* 1999 Feb 15; **189** (4): 627-636.
139. Choi J, Enis DR, Koh KP, Shiao SL, Pober JS. T lymphocyte-endothelial cell interactions. *Annu Rev Immunol* 2004; **22**: 683-709.
140. Pober JS, Cotran RS. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 1990 Oct; **50** (4): 537-544.
141. Egan K, FitzGerald GA. Eicosanoids and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 2006 (176 Pt 1): 189-211.
142. Heltianu C, Simionescu M, Simionescu N. Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules. *J Cell Biol* 1982 May; **93** (2): 357-364.
143. Soares MP, Lin Y, Sato K, Stuhlmeier KM, Bach FH. Accommodation. *Immunol Today* 1999 Oct; **20** (10): 434-437.
144. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005 Oct; **115** (10): 2679-2688.
145. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 Jun; **6** (6): 439-448.
146. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Sep; **8** (9): 741-752.
147. Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* 2006 Oct 6; **281** (40): 30299-30304.
148. Fader CM, Colombo MI. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* 2009 Jan; **16** (1): 70-78.

149. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008 Jan 11; **132** (1): 27-42.
150. Yi J, Tang XM. The convergent point of the endocytic and autophagic pathways in leydig cells. *Cell Res* 1999 Dec; **9** (4): 243-253.
151. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005 Jan 28; **120** (2): 237-248.
152. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007 Nov 15; **21** (22): 2861-2873.
153. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004 Dec 23; **432** (7020): 1032-1036.
154. Kawakami T, Inagi R, Takano H, Sato S, Ingelfinger JR, Fujita T, *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant* 2009 Sep; **24** (9): 2665-2672.
155. Kitamura M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008 Aug; **295** (2): F323-334.
156. Hoyer-Hansen M, Jaattela M. Connecting endoplasmic reticulum stress to autophagy by unfolded protein response and calcium. *Cell Death Differ* 2007 Sep; **14** (9): 1576-1582.
157. Pallet N, Bouvier N, Legendre C, Gilleron J, Codogno P, Beaune P, *et al.* Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity. *Autophagy* 2008 Aug 16; **4** (6): 783-791.
158. Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, *et al.* Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 2006 Dec; **26** (24): 9220-9231.
159. Kroemer G, Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005 Nov; **5** (11): 886-897.
160. Periyasamy-Thandavan S, Jiang M, Schoenlein P, Dong Z. Autophagy: molecular machinery, regulation, and implications for renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009 Aug; **297** (2): F244-256.
161. Yan L, Vatner DE, Kim SJ, Ge H, Masurekar M, Massover WH, *et al.* Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Sep 27; **102** (39): 13807-13812.
162. Martinet W, De Meyer GR. Autophagy in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2008 Jun; **10** (3): 216-223.
163. Pohlman TH, Harlan JM. Adaptive responses of the endothelium to stress. *J Surg Res* 2000 Mar; **89** (1): 85-119.
164. Fulda S, Gorman AM, Hori O, Samali A. Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010; **2010**: 214074.

165. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008 Jan; **214** (2): 149-160.
166. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003 Jul 25; **114** (2): 181-190.
167. Li JH, Kluger MS, Madge LA, Zheng L, Bothwell AL, Pober JS. Interferon-gamma augments CD95(APO-1/Fas) and pro-caspase-8 expression and sensitizes human vascular endothelial cells to CD95-mediated apoptosis. *Am J Pathol* 2002 Oct; **161** (4): 1485-1495.
168. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004 Aug; **15** (8): 1983-1992.
169. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997 Apr 1; **89** (7): 2429-2442.
170. Mano T, Masuyama T, Yamamoto K, Naito J, Kondo H, Nagano R, *et al.* Endothelial dysfunction in the early stage of atherosclerosis precedes appearance of intimal lesions assessable with intravascular ultrasound. *Am Heart J* 1996 Feb; **131** (2): 231-238.
171. Osto E, Tona F, De Bon E, Iliceto S, Cella G. Endothelial dysfunction in cardiac allograft vasculopathy: potential pharmacological interventions. *Curr Vasc Pharmacol* 2010 Mar; **8** (2): 169-188.
172. Glücksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews* 1951; **29**: 59-86.
173. Schweichel JU, Merker HJ. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 1973 Jun; **7** (3): 253-266.
174. Lockshin RA, Williams CM. Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm. *J Insect Physiol* 1965 Feb; **11**: 123-133.
175. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug; **26** (4): 239-257.
176. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 1999 Jan 22; **96** (2): 245-254.
177. Horvitz HR, Ellis, H.M. and Sternberg, P.W. Programmed cell death in nematode development. *Neurosci Commentaries* 1982; **1**: 56-65.
178. Coucouvanis E, Martin GR. Signals for death and survival: a two-step mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 1995 Oct 20; **83** (2): 279-287.
179. Brison DR, Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 1997 May; **56** (5): 1088-1096.

180. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 2009 Jan; **16** (1): 3-11.
181. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997 Aug 15; **326** (Pt 1): 1-16.
182. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004 Jul 30; **305** (5684): 626-629.
183. Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E, Maiuri MC, Hengartner M, Abrams JM, *et al.* No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ* 2008 Jul; **15** (7): 1113-1123.
184. Garrido C, Kroemer G. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2004 Dec; **16** (6): 639-646.
185. Raymond MA, Vigneault N, Luyckx V, Hebert MJ. Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Feb 22; **291** (2): 261-269.
186. Galluzzi L, Zamzami N, de La Motte Rouge T, Lemaire C, Brenner C, Kroemer G. Methods for the assessment of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis. *Apoptosis* 2007 May; **12** (5): 803-813.
187. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 2007 Jan; **32** (1): 37-43.
188. Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, *et al.* Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. *Methods Mol Biol* 2008; **445**: 29-76.
189. Kalai M, Van Loo G, Vanden Berghe T, Meeus A, Burm W, Saelens X, *et al.* Tipping the balance between necrosis and apoptosis in human and murine cells treated with interferon and dsRNA. *Cell Death Differ* 2002 Sep; **9** (9): 981-994.
190. Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000 Dec; **1** (6): 489-495.
191. Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 2008 Feb 16; **4** (2): 151-175.
192. Kourtis N, Tavernarakis N. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ* 2009 Jan; **16** (1): 21-30.
193. Berry DL, Baehrecke EH. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* 2007 Dec 14; **131** (6): 1137-1148.
194. Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Dec; **9** (12): 1004-1010.

195. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007 Jan; **87** (1): 99-163.
196. Jacobson MD, Burne JF, Raff MC. Programmed cell death and Bcl-2 protection in the absence of a nucleus. *EMBO J* 1994 Apr 15; **13** (8): 1899-1910.
197. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet* 2009; **43**: 95-118.
198. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; **35** (4): 495-516.
199. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Bcl-2 family members and apoptosis, taken to heart. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 Jan; **292** (1): C45-51.
200. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, *et al.* Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 1999 Apr 9; **284** (5412): 339-343.
201. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001 Apr 27; **292** (5517): 727-730.
202. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, *et al.* Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* 2005 Jun 1; **19** (11): 1294-1305.
203. Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS, *et al.* X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996 May 23; **381** (6580): 335-341.
204. Kinnally KW, Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 2007 May; **12** (5): 857-868.
205. Li JH, Pober JS. The cathepsin B death pathway contributes to TNF plus IFN-gamma-mediated human endothelial injury. *J Immunol* 2005 Aug 1; **175** (3): 1858-1866.
206. Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, *et al.* A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 1997 Jul 18; **272** (29): 17907-17911.
207. Mahrus S, Trinidad JC, Barkan DT, Sali A, Burlingame AL, Wells JA. Global sequencing of proteolytic cleavage sites in apoptosis by specific labeling of protein N termini. *Cell* 2008 Sep 5; **134** (5): 866-876.
208. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 2010 Jul; **17** (7): 1104-1114.
209. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 2005 Sep; **4** (3): 138-144.
210. Kang SJ, Wang S, Kuida K, Yuan J. Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ* 2002 Oct; **9** (10): 1115-1125.

211. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 2000 Jan 6; **403** (6765): 98-103.
212. Hu S, Snipas SJ, Vincenz C, Salvesen G, Dixit VM. Caspase-14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 1998 Nov 6; **273** (45): 29648-29653.
213. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000 Oct 12; **407** (6805): 770-776.
214. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 2003 Dec; **15** (6): 725-731.
215. Boatright KM, Renatus M, Scott FL, Sperandio S, Shin H, Pedersen IM, *et al.* A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 2003 Feb; **11** (2): 529-541.
216. Salvesen GS, Riedl SJ. Caspase mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 2008; **615**: 13-23.
217. Donepudi M, Mac Sweeney A, Briand C, Grutter MG. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* 2003 Feb; **11** (2): 543-549.
218. Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Dec 4; **98** (25): 14250-14255.
219. Chai J, Wu Q, Shiozaki E, Srinivasula SM, Alnemri ES, Shi Y. Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* 2001 Nov 2; **107** (3): 399-407.
220. Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM, Wu Q, Datta P, Alnemri ES, *et al.* Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 2001 Mar 9; **104** (5): 769-780.
221. Bose K, Clark AC. Dimeric procaspase-3 unfolds via a four-state equilibrium process. *Biochemistry* 2001 Nov 27; **40** (47): 14236-14242.
222. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004 Nov; **5** (11): 897-907.
223. Shiozaki EN, Chai J, Rigotti DJ, Riedl SJ, Li P, Srinivasula SM, *et al.* Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol Cell* 2003 Feb; **11** (2): 519-527.
224. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, *et al.* Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001 Mar 9; **104** (5): 791-800.
225. Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A, Datta P, Shiozaki E, Chai J, *et al.* A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 2001 Mar 1; **410** (6824): 112-116.

226. Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, Feuerstein D, Kaskel FJ, Tellis V, *et al.* Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury. *Transplantation* 2003 Jul 15; **76** (1): 50-54.
227. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux QL, *et al.* Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 May 11; **96** (10): 5752-5757.
228. Cao G, Minami M, Pei W, Yan C, Chen D, O'Horo C, *et al.* Intracellular Bax translocation after transient cerebral ischemia: implications for a role of the mitochondrial apoptotic signaling pathway in ischemic neuronal death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001 Apr; **21** (4): 321-333.
229. Chan PH. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochem Res* 2004 Nov; **29** (11): 1943-1949.
230. Scarabelli TM, Knight RA, Rayment NB, Cooper TJ, Stephanou A, Brar BK, *et al.* Quantitative assessment of cardiac myocyte apoptosis in tissue sections using the fluorescence-based tunel technique enhanced with counterstains. *J Immunol Methods* 1999 Aug 31; **228** (1-2): 23-28.
231. Sage E, Mercier O, Van den Eyden F, de Perrot M, Barlier-Mur AM, Dartevielle P, *et al.* Endothelial cell apoptosis in chronically obstructed and reperfused pulmonary artery. *Respir Res* 2008; **9**: 19.
232. Hall AV, Jevnikar AM. Significance of endothelial cell survival programs for renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 2003 Jun; **41** (6): 1140-1154.
233. Wang X, Zhang J, Kim HP, Wang Y, Choi AM, Ryter SW. Bcl-XL disrupts death-inducing signal complex formation in plasma membrane induced by hypoxia/reoxygenation. *FASEB J* 2004 Dec; **18** (15): 1826-1833.
234. Choy JC. Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. *Cell Death Differ* 2010 Apr; **17** (4): 567-576.
235. Heusel JW, Wesselschmidt RL, Shresta S, Russell JH, Ley TJ. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 1994 Mar 25; **76** (6): 977-987.
236. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002 Jun; **2** (6): 401-409.
237. Trapani JA, Sutton VR. Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol* 2003 Oct; **15** (5): 533-543.
238. Voskoboinik I, Smyth MJ, Trapani JA. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2006 Dec; **6** (12): 940-952.
239. Heibein JA, Goping IS, Barry M, Pinkoski MJ, Shore GC, Green DR, *et al.* Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med* 2000 Nov 20; **192** (10): 1391-1402.

240. Barry M, Heibein JA, Pinkoski MJ, Lee SF, Moyer RW, Green DR, *et al.* Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 2000 Jun; **20** (11): 3781-3794.
241. Sutton VR, Wowk ME, Cancilla M, Trapani JA. Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* 2003 Mar; **18** (3): 319-329.
242. Waterhouse NJ, Sedelies KA, Browne KA, Wowk ME, Newbold A, Sutton VR, *et al.* A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2005 Feb 11; **280** (6): 4476-4482.
243. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 Mar; **9** (3): 231-241.
244. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, *et al.* Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997 Oct 10; **278** (5336): 294-298.
245. Gerner C, Frohwein U, Gotzmann J, Bayer E, Gelbmann D, Bursch W, *et al.* The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. *J Biol Chem* 2000 Dec 15; **275** (50): 39018-39026.
246. Thiede B, Treumann A, Kretschmer A, Sohlke J, Rudel T. Shotgun proteome analysis of protein cleavage in apoptotic cells. *Proteomics* 2005 May; **5** (8): 2123-2130.
247. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 2001 Apr; **3** (4): 339-345.
248. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J, Breard J. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 2001 Apr; **3** (4): 346-352.
249. Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 1996 Dec; **135** (6 Pt 1): 1441-1455.
250. Rosenblatt J, Raff MC, Cramer LP. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr Biol* 2001 Nov 27; **11** (23): 1847-1857.
251. Mancini M, Machamer CE, Roy S, Nicholson DW, Thornberry NA, Casciola-Rosen LA, *et al.* Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol* 2000 May 1; **149** (3): 603-612.
252. Chiu R, Novikov L, Mukherjee S, Shields D. A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis. *J Cell Biol* 2002 Nov 25; **159** (4): 637-648.
253. Lowe M, Lane JD, Woodman PG, Allan VJ. Caspase-mediated cleavage of syntaxin 5 and giantin accompanies inhibition of secretory traffic during apoptosis. *J Cell Sci* 2004 Mar 1; **117** (Pt 7): 1139-1150.
254. Lane JD, Lucocq J, Pryde J, Barr FA, Woodman PG, Allan VJ, *et al.* Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J Cell Biol* 2002 Feb 4; **156** (3): 495-509.

255. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 2000 Oct 12; **407** (6805): 784-788.
256. Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* 1997 Nov 27; **390** (6658): 350-351.
257. Fadok VA, McDonald PP, Bratton DL, Henson PM. Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 1998 Nov; **26** (4): 653-656.
258. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* 1998 Feb 15; **101** (4): 890-898.
259. Weinstein JN. 'Omic' and hypothesis-driven research in the molecular pharmacology of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2002 Aug; **2** (4): 361-365.
260. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, *et al.* The sequence of the human genome. *Science* 2001 Feb 16; **291** (5507): 1304-1351.
261. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001 Feb 15; **409** (6822): 860-921.
262. Ruegg C, Tissot JD, Farmer P, Mariotti A. Omics meets hypothesis-driven research. Partnership for innovative discoveries in vascular biology and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2008 Nov; **100** (5): 738-746.
263. Cristea IM, Gaskell SJ, Whetton AD. Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* 2004 May 15; **103** (10): 3624-3634.
264. prize NoTOWSotN. MLA style: "The Nobel Prize in Chemistry 2002". Nobelprize.org. 2 Nov 2010 http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/. [cited; Available from:]
265. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003 Mar 13; **422** (6928): 198-207.
266. Carr SA, Annan RS. Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. *Curr Protoc Mol Biol* 2001 May; **Chapter 10**: Unit 10 21.
267. Luthi AU, Martin SJ. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* 2007 Apr; **14** (4): 641-650.
268. St Croix B, Rago C, Velculescu V, Traverso G, Romans KE, Montgomery E, *et al.* Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000 Aug 18; **289** (5482): 1197-1202.
269. Seaman S, Stevens J, Yang MY, Logsdon D, Graff-Cherry C, St Croix B. Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* 2007 Jun; **11** (6): 539-554.
270. Ghilardi C, Chiorino G, Dossi R, Nagy Z, Giavazzi R, Bani M. Identification of novel vascular markers through gene expression profiling of tumor-derived endothelium. *BMC Genomics* 2008; **9**: 201.

271. Bhati R, Patterson C, Livasy CA, Fan C, Ketelsen D, Hu Z, *et al.* Molecular characterization of human breast tumor vascular cells. *Am J Pathol* 2008 May; **172** (5): 1381-1390.
272. Almofti MR, Huang Z, Yang P, Rui Y. Proteomic analysis of rat aorta during atherosclerosis induced by high cholesterol diet and injection of vitamin D3. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006 Apr; **33** (4): 305-309.
273. Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang SI, Zebroski H, Claffey KP, *et al.* Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2007 Jun; **6** (6): 1088-1102.
274. Omenn GS. The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses. *Proteomics* 2004 May; **4** (5): 1235-1240.
275. Omenn GS. International collaboration in clinical chemistry and laboratory medicine: the Human Proteome Organization (HUPO) Plasma Proteome Project. *Clin Chem Lab Med* 2004 Jan; **42** (1): 1-2.
276. Ayache S, Panelli M, Marincola FM, Stroncek DF. Effects of storage time and exogenous protease inhibitors on plasma protein levels. *Am J Clin Pathol* 2006 Aug; **126** (2): 174-184.
277. Barelli S, Crettaz D, Thadikkaran L, Rubin O, Tissot JD. Plasma/serum proteomics: pre-analytical issues. *Expert Rev Proteomics* 2007 Jun; **4** (3): 363-370.
278. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 2007 May; **21** (3): 157-171.
279. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, *et al.* Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003 Jun 13; **113** (6): 717-730.
280. Bournazou I, Pound JD, Duffin R, Bournazos S, Melville LA, Brown SB, *et al.* Apoptotic human cells inhibit migration of granulocytes via release of lactoferrin. *J Clin Invest* 2009 Jan; **119** (1): 20-32.
281. Raymond MA, Desormeaux A, Laplante P, Vigneault N, Filep JG, Landry K, *et al.* Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *Faseb J* 2004 Apr; **18** (6): 705-707.
282. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM, Langelier Y, *et al.* Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005 May 1; **174** (9): 5740-5749.
283. Laplante P, Raymond MA, Labelle A, Abe J, Iozzo RV, Hebert MJ. Perlecan proteolysis induces an alpha2beta1 integrin- and Src family kinase-dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. *J Biol Chem* 2006 Oct 13; **281** (41): 30383-30392.
284. Cailhier JF, Sirois I, Laplante P, Lepage S, Raymond MA, Brassard N, *et al.* Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *J Biol Chem* 2008 Oct 3; **283** (40): 27220-27229.

285. Soulez M, Sirois I, Brassard N, Raymond MA, Nicodeme F, Noiseux N, *et al.* Epidermal growth factor and perlecan fragments produced by apoptotic endothelial cells co-ordinately activate ERK1/2-dependent antiapoptotic pathways in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2010 Apr; **28** (4): 810-820.
286. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, Beliveau A, Prat A, *et al.* Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell Death Differ* 2010 Feb; **17** (2): 291-303.
287. Gennaro G, Menard C, Michaud SE, Deblois D, Rivard A. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation in injured arteries by a novel, oral mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase inhibitor. *Circulation* 2004 Nov 23; **110** (21): 3367-3371.
288. Hirata A, Igarashi M, Yamaguchi H, Suwabe A, Daimon M, Kato T, *et al.* Nifedipine suppresses neointimal thickening by its inhibitory effect on vascular smooth muscle cell growth via a MEK-ERK pathway coupling with Pyk2. *Br J Pharmacol* 2000 Dec; **131** (8): 1521-1530.
289. Pshezhetsky AV, Fedjaev M, Ashmarina L, Mazur A, Budman L, Sinnett D, *et al.* Subcellular proteomics of cell differentiation: Quantitative analysis of the plasma membrane proteome of Caco-2 cells. *Proteomics* 2007 Jul; **7** (13): 2201-2215.
290. Thery C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009 Aug; **9** (8): 581-593.
291. Amzallag N, Passer BJ, Allanic D, Segura E, Thery C, Goud B, *et al.* TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J Biol Chem* 2004 Oct 29; **279** (44): 46104-46112.
292. Yu X, Harris SL, Levine AJ. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 2006 May 1; **66** (9): 4795-4801.
293. Lespagnol A, Duflaut D, Beekman C, Blanc L, Fiucci G, Marine JC, *et al.* Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death Differ* 2008 Nov; **15** (11): 1723-1733.
294. Yoon T, Jung J, Kim M, Lee KM, Choi EC, Lee K. Identification of the self-interaction of rat TCTP/IgE-dependent histamine-releasing factor using yeast two-hybrid system. *Arch Biochem Biophys* 2000 Dec 15; **384** (2): 379-382.
295. Kim M, Min HJ, Won HY, Park H, Lee JC, Park HW, *et al.* Dimerization of translationally controlled tumor protein is essential for its cytokine-like activity. *PLoS ONE* 2009; **4** (7): e6464.
296. Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, *et al.* Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 2001 Jun 15; **166** (12): 7309-7318.
297. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2002 Aug; **2** (8): 569-579.
298. Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ, Xu SQ. Role of exosomes in immune regulation. *J Cell Mol Med* 2006 Apr-Jun; **10** (2): 364-375.

299. Chen SH, Wu PS, Chou CH, Yan YT, Liu H, Weng SY, *et al.* A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol Biol Cell* 2007 Jul; **18** (7): 2525-2532.
300. Telerman A, Amson R. The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat Rev Cancer* 2009 Mar; **9** (3): 206-216.
301. Paquet C, Sane AT, Beauchemin M, Bertrand R. Caspase- and mitochondrial dysfunction-dependent mechanisms of lysosomal leakage and cathepsin B activation in DNA damage-induced apoptosis. *Leukemia* 2005 May; **19** (5): 784-791.
302. Takeuchi H, Kanzawa T, Kondo Y, Kondo S. Inhibition of platelet-derived growth factor signalling induces autophagy in malignant glioma cells. *Br J Cancer* 2004 Mar 8; **90** (5): 1069-1075.
303. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996 Mar 1; **183** (3): 1161-1172.
304. Bendayan M. Tech.Sight. Worth its weight in gold. *Science* 2001 Feb 16; **291** (5507): 1363-1365.
305. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Sep 7; **101** (36): 13368-13373.
306. Gutwein P, Stoeck A, Riedle S, Gast D, Runz S, Condon TP, *et al.* Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2005 Apr 1; **11** (7): 2492-2501.
307. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, *et al.* Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. *J Biol Chem* 2003 Mar 28; **278** (13): 10963-10972.
308. Aronov S, Gelin-Licht R, Zipor G, Haim L, Safran E, Gerst JE. mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are cotransported with the cortical endoplasmic reticulum to the incipient bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 2007 May; **27** (9): 3441-3455.
309. Nguyen NV, Gleeson PA, Courtois-Coutry N, Caplan MJ, Van Driel IR. Gastric parietal cell acid secretion in mice can be regulated independently of H/K ATPase endocytosis. *Gastroenterology* 2004 Jul; **127** (1): 145-154.
310. Wang P, Tortorella M, England K, Malfait AM, Thomas G, Arner EC, *et al.* Proprotein convertase furin interacts with and cleaves pro-ADAMTS4 (Aggrecanase-1) in the trans-Golgi network. *J Biol Chem* 2004 Apr 9; **279** (15): 15434-15440.
311. Emeis JJ, van den Eijnden-Schrauwen Y, van den Hoogen CM, de Priester W, Westmuckett A, Lupu F. An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator. *J Cell Biol* 1997 Oct 6; **139** (1): 245-256.
312. van Niel G, Raposo G, Candalh C, Boussac M, Hershberg R, Cerf-Bensussan N, *et al.* Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology* 2001 Aug; **121** (2): 337-349.

313. Segura E, Amigorena S, Thery C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol Dis* 2005 Sep-Oct; **35** (2): 89-93.
314. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 2000 May 4; **405** (6782): 85-90.
315. Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, Dumitriu IE, *et al.* CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* 2008 Dec 15; **112** (13): 5026-5036.
316. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007 Jan; **81** (1): 1-5.
317. Oppenheim JJ, Yang D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 2005 Aug; **17** (4): 359-365.
318. Yang D, Oppenheim JJ. Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense. *Arthritis Rheum* 2004 Nov; **50** (11): 3401-3403.
319. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs, and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* 2007; **81**: 1-5.
320. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol* 2008; **3**: 99-126.
321. Yang D, de la Rosa G, Tewary P, Oppenheim JJ. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol* 2009 Nov; **30** (11): 531-537.
322. Al-Nedawi K, Meehan B, Rak J. Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle* 2009 Jul 1; **8** (13): 2014-2018.
323. Scott RE, Perkins RG, Zschunke MA, Hoerl BJ, Maercklein PB. Plasma membrane vesiculation in 3T3 and SV3T3 cells. I. Morphological and biochemical characterization. *J Cell Sci* 1979 Feb; **35**: 229-243.
324. Hoerl BJ, Scott RE. Plasma membrane vesiculation: a cellular response to injury. *Virchows Arch B Cell Pathol* 1978 Jun 19; **27** (4): 335-345.
325. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 2009 Feb; **19** (2): 43-51.
326. Simpson RJ, Jensen SS, Lim JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. *Proteomics* 2008 Oct; **8** (19): 4083-4099.
327. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 1967 May; **13** (3): 269-288.
328. Muller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, *et al.* Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003 Mar; **17** (3): 476-478.

329. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005 Sep 1; **106** (5): 1604-1611.
330. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 Mar; **288** (3): H1004-1009.
331. Leroyer AS, Tedgui A, Boulanger CM. Role of microparticles in atherothrombosis. *J Intern Med* 2008 May; **263** (5): 528-537.
332. Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood* 2004 Oct 15; **104** (8): 2543-2548.
333. Koppler B, Cohen C, Schlondorff D, Mack M. Differential mechanisms of microparticle transfer to B cells and monocytes: anti-inflammatory properties of microparticles. *Eur J Immunol* 2006 Mar; **36** (3): 648-660.
334. Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JR, Gay S, Distler O. Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 2005 Nov; **52** (11): 3337-3348.
335. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, *et al.* Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE* 2008; **3** (11): e3694.
336. Beyer C, Pisetsky DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2010 Jan; **6** (1): 21-29.
337. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 2004 Nov 1; **104** (9): 2761-2766.
338. Delves GH, Stewart AB, Cooper AJ, Lwaleed BA. Prostatomes, angiogenesis, and tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2007 Feb; **33** (1): 75-79.
339. Luchter-Wasylewska E, Wasylewski M. What are prostatomes? *IUBMB Life* 2007 Dec; **59** (12): 791-792.
340. Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Brauninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, *et al.* Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* 2005 Jul 1; **118** (Pt 13): 2849-2858.
341. Kuehn MJ, Kesty NC. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev* 2005 Nov 15; **19** (22): 2645-2655.
342. Pan BT, Teng K, Wu C, Adam M, Johnstone RM. Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *J Cell Biol* 1985 Sep; **101** (3): 942-948.
343. Couzin J. Cell biology: The ins and outs of exosomes. *Science* 2005 Jun 24; **308** (5730): 1862-1863.

344. Pan BT, Johnstone RM. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 1983 Jul; **33** (3): 967-978.
345. Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem* 1987 Jul 5; **262** (19): 9412-9420.
346. Johnstone RM. Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis* 2005 May-Jun; **34** (3): 214-219.
347. Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics* 2010 Sep 10; **73** (10): 1907-1920.
348. Hawari FI, Rouhani FN, Cui X, Yu ZX, Buckley C, Kaler M, *et al.* Release of full-length 55-kDa TNF receptor 1 in exosome-like vesicles: a mechanism for generation of soluble cytokine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Feb 3; **101** (5): 1297-1302.
349. van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem* 2006 Jul; **140** (1): 13-21.
350. de Gassart A, Geminard C, Hoekstra D, Vidal M. Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? *Traffic* 2004 Nov; **5** (11): 896-903.
351. Reggiori F, Pelham HR. Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J* 2001 Sep 17; **20** (18): 5176-5186.
352. Hemler ME. Specific tetraspanin functions. *J Cell Biol* 2001 Dec 24; **155** (7): 1103-1107.
353. Edidin M. Shrinking patches and slippery rafts: scales of domains in the plasma membrane. *Trends Cell Biol* 2001 Dec; **11** (12): 492-496.
354. Mobius W, van Donselaar E, Ohno-Iwashita Y, Shimada Y, Heijnen HF, Slot JW, *et al.* Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. *Traffic* 2003 Apr; **4** (4): 222-231.
355. White IJ, Bailey LM, Aghakhani MR, Moss SE, Futter CE. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *EMBO J* 2006 Jan 11; **25** (1): 1-12.
356. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007 Jun; **9** (6): 654-659.
357. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* 2009 Nov; **9** (21): 4997-5000.
358. Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, *et al.* Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005 Jun 15; **65** (12): 5238-5247.

359. Johnstone RM, Mathew A, Mason AB, Teng K. Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *J Cell Physiol* 1991 Apr; **147** (1): 27-36.
360. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jun 29; **101** (26): 9683-9688.
361. Fevrier B, Vilette D, Laude H, Raposo G. Exosomes: a bubble ride for prions? *Traffic* 2005 Jan; **6** (1): 10-17.
362. Robertson C, Booth SA, Beniac DR, Coulthart MB, Booth TF, McNicol A. Cellular prion protein is released on exosomes from activated platelets. *Blood* 2006 May 15; **107** (10): 3907-3911.
363. Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE. Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* 2003 Dec 26; **278** (52): 52347-52354.
364. Gould SJ, Booth AM, Hildreth JE. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Sep 16; **100** (19): 10592-10597.
365. Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M. Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* 2004 Jul; **12** (7): 310-316.
366. Andre F, Scharz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, *et al.* Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet* 2002 Jul 27; **360** (9329): 295-305.
367. Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, *et al.* Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* 1999 Nov 1; **147** (3): 599-610.
368. Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, *et al.* Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* 2005 Jun; **128** (7): 1796-1804.
369. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, *et al.* Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med* 2002 May 20; **195** (10): 1303-1316.
370. Segura E, Nicco C, Lombard B, Veron P, Raposo G, Batteux F, *et al.* ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood* 2005 Jul 1; **106** (1): 216-223.
371. Madsen JC, Superina RA, Wood KJ, Morris PJ. Immunological unresponsiveness induced by recipient cells transfected with donor MHC genes. *Nature* 1988 Mar 10; **332** (6160): 161-164.
372. Morelli AE. The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: its impact on transplantation. *Am J Transplant* 2006 Feb; **6** (2): 254-261.

373. Morelli AE, Larregina AT. Apoptotic cell-based therapies against transplant rejection: role of recipient's dendritic cells. *Apoptosis* 2010 Sep; **15** (9): 1083-1097.
374. Kurts C, Kosaka H, Carbone FR, Miller JF, Heath WR. Class I-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive CD8(+) T cells. *J Exp Med* 1997 Jul 21; **186** (2): 239-245.
375. Adler AJ, Marsh DW, Yochum GS, Guzzo JL, Nigam A, Nelson WG, *et al.* CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* 1998 May 18; **187** (10): 1555-1564.
376. Peche H, Heslan M, Usal C, Amigorena S, Cuturi MC. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* 2003 Nov 27; **76** (10): 1503-1510.
377. Peche H, Renaudin K, Beriou G, Merieau E, Amigorena S, Cuturi MC. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant* 2006 Jul; **6** (7): 1541-1550.
378. Yenofsky R, Cereghini S, Krowczynska A, Brawerman G. Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol* 1983 Jul; **3** (7): 1197-1203.
379. Chitpatima ST, Brawerman G. Shifts in configuration of the 5'-noncoding region of a mouse messenger RNA under translational control. *J Biol Chem* 1988 May 25; **263** (15): 7164-7169.
380. Chitpatima ST, Makrides S, Bandyopadhyay R, Brawerman G. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res* 1988 Mar 25; **16** (5): 2350.
381. Makrides S, Chitpatima ST, Bandyopadhyay R, Brawerman G. Nucleotide sequence for a major messenger RNA for a 40 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res* 1988 Mar 25; **16** (5): 2349.
382. Yarm FR. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol* 2002 Sep; **22** (17): 6209-6221.
383. Li F, Zhang D, Fujise K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem* 2001 Dec 14; **276** (50): 47542-47549.
384. Cans C, Passer BJ, Shalak V, Nancy-Portebois V, Crible V, Amzallag N, *et al.* Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Nov 25; **100** (24): 13892-13897.
385. Vonakis BM, Macglashan DW, Jr., Vilarino N, Langdon JM, Scott RS, MacDonald SM. Distinct characteristics of signal transduction events by histamine-releasing factor/translationally controlled tumor protein (HRF/TCTP)-induced priming and activation of human basophils. *Blood* 2008 Feb 15; **111** (4): 1789-1796.

386. Schroeder JT, Lichtenstein LM, MacDonald SM. An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J Exp Med* 1996 Mar 1; **183** (3): 1265-1270.
387. Prudovsky I, Tarantini F, Landriscina M, Neivandt D, Soldi R, Kirov A, *et al.* Secretion without Golgi. *J Cell Biochem* 2008 Apr 1; **103** (5): 1327-1343.
388. Passer BJ, Nancy-Portebois V, Amzallag N, Prieur S, Cans C, Roborel de Climens A, *et al.* The p53-inducible TSAP6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with Nix and the Myt1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Mar 4; **100** (5): 2284-2289.
389. Ahn K, Yeyeodu S, Collette J, Madden V, Arthur J, Li L, *et al.* An alternate targeting pathway for procathepsin L in mouse fibroblasts. *Traffic* 2002 Feb; **3** (2): 147-159.
390. Murakami M, Taketomi Y, Girard C, Yamamoto K, Lambeau G. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: Lessons from transgenic and knockout mice. *Biochimie* 2010 Jun; **92** (6): 561-582.
391. Koenig W, Khuseyinova N. Lipoprotein-associated and secretory phospholipase A2 in cardiovascular disease: the epidemiological evidence. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009 Feb; **23** (1): 85-92.
392. Koenig W, Vossen CY, Mallat Z, Brenner H, Benessiano J, Rothenbacher D. Association between type II secretory phospholipase A2 plasma concentrations and activity and cardiovascular events in patients with coronary heart disease. *Eur Heart J* 2009 Nov; **30** (22): 2742-2748.
393. Oorni K, Kovanen PT. Lipoprotein modification by secretory phospholipase A(2) enzymes contributes to the initiation and progression of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2009 Oct; **20** (5): 421-427.
394. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, *et al.* Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res* 2010 Aug; **51** (8): 2105-2120.
395. Hu K, Mars WM, Liu Y. Novel actions of tissue-type plasminogen activator in chronic kidney disease. *Front Biosci* 2008; **13**: 5174-5186.
396. Kitching AR, Holdsworth SR, Ploplis VA, Plow EF, Collen D, Carmeliet P, *et al.* Plasminogen and plasminogen activators protect against renal injury in crescentic glomerulonephritis. *J Exp Med* 1997 Mar 3; **185** (5): 963-968.
397. Edgton KL, Gow RM, Kelly DJ, Carmeliet P, Kitching AR. Plasmin is not protective in experimental renal interstitial fibrosis. *Kidney Int* 2004 Jul; **66** (1): 68-76.
398. Zhang G, Kernan KA, Collins SJ, Cai X, Lopez-Guisa JM, Degen JL, *et al.* Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals. *J Am Soc Nephrol* 2007 Mar; **18** (3): 846-859.
399. Yang J, Shultz RW, Mars WM, Wegner RE, Li Y, Dai C, *et al.* Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Clin Invest* 2002 Nov; **110** (10): 1525-1538.
400. Hu K, Wu C, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator promotes murine myofibroblast activation through LDL receptor-related protein 1-mediated integrin signaling. *J Clin Invest* 2007 Dec; **117** (12): 3821-3832.

401. Hu K, Yang J, Tanaka S, Gonias SL, Mars WM, Liu Y. Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* 2006 Jan 27; **281** (4): 2120-2127.
402. Hu K, Lin L, Tan X, Yang J, Bu G, Mars WM, *et al.* tPA protects renal interstitial fibroblasts and myofibroblasts from apoptosis. *J Am Soc Nephrol* 2008 Mar; **19** (3): 503-514.
403. Musial K, Szprynger K, Szczepanska M, Zwolinska D. Heat shock proteins in children and young adults on chronic hemodialysis. *Pediatr Nephrol* 2009 Oct; **24** (10): 2029-2034.
404. Musial K, Szprynger K, Szczepanska M, Zwolinska D. The heat shock protein profile in children with chronic kidney disease. *Perit Dial Int* 2010 Mar; **30** (2): 227-232.
405. Musial K, Zwolinska D. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and matrix metalloproteinases as novel stress markers in children and young adults on chronic dialysis. *Cell Stress Chaperones* 2010 Sep 19.
406. Musial K, Szczepanska M, Szprynger K, Zwolinska D. The impact of dialysis modality on serum heat shock proteins in children and young adults with chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2009; **32** (5): 366-372.
407. Li W, Li Y, Guan S, Fan J, Cheng CF, Bright AM, *et al.* Extracellular heat shock protein-90alpha: linking hypoxia to skin cell motility and wound healing. *EMBO J* 2007 Mar 7; **26** (5): 1221-1233.
408. Woodley DT, Fan J, Cheng CF, Li Y, Chen M, Bu G, *et al.* Participation of the lipoprotein receptor LRP1 in hypoxia-HSP90alpha autocrine signaling to promote keratinocyte migration. *J Cell Sci* 2009 May 15; **122** (Pt 10): 1495-1498.
409. McCready J, Sims JD, Chan D, Jay DG. Secretion of extracellular hsp90alpha via exosomes increases cancer cell motility: a role for plasminogen activation. *BMC Cancer* 2010; **10**: 294.
410. Liao DF, Jin ZG, Baas AS, Daum G, Gygi SP, Aebersold R, *et al.* Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2000 Jan 7; **275** (1): 189-196.
411. Cheng CF, Fan J, Fedesco M, Guan S, Li Y, Bandyopadhyay B, *et al.* Transforming growth factor alpha (TGFalpha)-stimulated secretion of HSP90alpha: using the receptor LRP-1/CD91 to promote human skin cell migration against a TGFbeta-rich environment during wound healing. *Mol Cell Biol* 2008 May; **28** (10): 3344-3358.
412. Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* 2008 Jul; **88** (3): 887-918.
413. Moestrup SK, Gliemann J. Purification of the rat hepatic alpha 2-macroglobulin receptor as an approximately 440-kDa single chain protein. *J Biol Chem* 1989 Sep 15; **264** (26): 15574-15577.
414. Gliemann J, Davidsen O, Moestrup SK. Characterization, size estimation and solubilization of alpha-macroglobulin complex receptors in liver membranes. *Biochim Biophys Acta* 1989 Apr 28; **980** (3): 326-332.

415. May P, Herz J. LDL receptor-related proteins in neurodevelopment. *Traffic* 2003 May; **4** (5): 291-301.
416. Bu G, Maksymovitch EA, Geuze H, Schwartz AL. Subcellular localization and endocytic function of low density lipoprotein receptor-related protein in human glioblastoma cells. *J Biol Chem* 1994 Nov 25; **269** (47): 29874-29882.
417. Bu G, Maksymovitch EA, Nerbonne JM, Schwartz AL. Expression and function of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) in mammalian central neurons. *J Biol Chem* 1994 Jul 15; **269** (28): 18521-18528.
418. May P, Woldt E, Matz RL, Boucher P. The LDL receptor-related protein (LRP) family: an old family of proteins with new physiological functions. *Ann Med* 2007; **39** (3): 219-228.
419. May P, Rohlmann A, Bock HH, Zurhove K, Marth JD, Schomburg ED, *et al.* Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol Cell Biol* 2004 Oct; **24** (20): 8872-8883.
420. Polavarapu R, An J, Zhang C, Yepes M. Regulated intramembrane proteolysis of the low-density lipoprotein receptor-related protein mediates ischemic cell death. *Am J Pathol* 2008 May; **172** (5): 1355-1362.
421. Orr AW, Pedraza CE, Pallero MA, Elzie CA, Goicoechea S, Strickland DK, *et al.* Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin coreceptor that signals focal adhesion disassembly. *J Cell Biol* 2003 Jun 23; **161** (6): 1179-1189.
422. Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 2003 Jul 15; **116** (Pt 14): 2917-2927.
423. Herz J, Strickland DK. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* 2001 Sep; **108** (6): 779-784.
424. Loukinova E, Ranganathan S, Kuznetsov S, Gorlatova N, Migliorini MM, Loukinov D, *et al.* Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem* 2002 May 3; **277** (18): 15499-15506.
425. Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 2003 Apr 11; **300** (5617): 329-332.
426. Zhou L, Takayama Y, Boucher P, Tallquist MD, Herz J. LRP1 regulates architecture of the vascular wall by controlling PDGFRbeta-dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation. *PLoS ONE* 2009; **4** (9): e6922.
427. Boucher P, Li WP, Matz RL, Takayama Y, Auwerx J, Anderson RG, *et al.* LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PLoS ONE* 2007; **2** (5): e448.
428. Boucher P, Herz J. Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond. *Biochem Pharmacol* 2010 Oct 8.

429. Gorovoy M, Gaultier A, Campana WM, Firestein GS, Gonias SL. Inflammatory mediators promote production of shed LRP1/CD91, which regulates cell signaling and cytokine expression by macrophages. *J Leukoc Biol* 2010 Oct; **88** (4): 769-778.
430. Liu Q, Zhang J, Tran H, Verbeek MM, Reiss K, Estus S, *et al.* LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol Neurodegener* 2009; **4**: 17.
431. Quinn KA, Pye VJ, Dai YP, Chesterman CN, Owensby DA. Characterization of the soluble form of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Exp Cell Res* 1999 Sep 15; **251** (2): 433-441.
432. Stoeck A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, *et al.* A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* 2006 Feb 1; **393** (Pt 3): 609-618.
433. Blobel G. Unidirectional and bidirectional protein traffic across membranes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995; **60**: 1-10.
434. Nickel W, Rabouille C. Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 Feb; **10** (2): 148-155.
435. The Universal Protein Resource (UniProt) in 2010. *Nucleic Acids Res* 2010 Jan; **38** (Database issue): D142-148.
436. Lopez-Casillas F, Payne HM, Andres JL, Massague J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 1994 Feb; **124** (4): 557-568.
437. Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, *et al.* Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *J Cell Biol* 2001 Nov 12; **155** (4): 661-673.
438. Le Gall SM, Auger R, Dreux C, Mauduit P. Regulated cell surface pro-EGF ectodomain shedding is a zinc metalloprotease-dependent process. *J Biol Chem* 2003 Nov 14; **278** (46): 45255-45268.
439. Flieger O, Engling A, Bucala R, Lue H, Nickel W, Bernhagen J. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS Lett* 2003 Sep 11; **551** (1-3): 78-86.
440. Chen KG, Valencia JC, Gillet JP, Hearing VJ, Gottesman MM. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2009 Dec; **22** (6): 740-749.
441. Liegeois S, Benedetto A, Garnier JM, Schwab Y, Labouesse M. The V0-ATPase mediates apical secretion of exosomes containing Hedgehog-related proteins in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 2006 Jun 19; **173** (6): 949-961.
442. Gonzales PA, Pisitkun T, Hoffert JD, Tchapyjnikov D, Star RA, Kleta R, *et al.* Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol* 2009 Feb; **20** (2): 363-379.

443. Christine Kuslich GP, Michael Klass, inventor CARIS MPI, INC. (445 North Fifth Street - 3rd Floor, Phoenix, AZ, 85004, US)
KUSLICH, Christine (1185 W. Spur Avenue, Gilbert, AZ, 85233, US)
POSTE, George (P.O. Box 681, Cave Creek, AZ, 85327, US)
KLASS, Michael (11554 N. Verch Way, Oro Valley, AZ, 85737, US) assignee. METHODS AND SYSTEMS OF USING EXOSOMES FOR DETERMINING PHENOTYPES États-Unis. 2010.
444. Schotman H, Karhinen L, Rabouille C. dGRASP-mediated noncanonical integrin secretion is required for Drosophila epithelial remodeling. *Dev Cell* 2008 Feb; **14** (2): 171-182.
445. Clayton A, Turkes A, Dewitt S, Steadman R, Mason MD, Hallett MB. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins. *FASEB J* 2004 Jun; **18** (9): 977-979.
446. Knipe L, Meli A, Hewlett L, Bierings R, Dempster J, Skehel P, *et al.* A revised model for the secretion of tPA and cytokines from cultured endothelial cells. *Blood* 2010 Sep 23; **116** (12): 2183-2191.
447. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992 Apr 30; **356** (6372): 768-774.
448. Burns K, Martinon F, Tschopp J. New insights into the mechanism of IL-1beta maturation. *Curr Opin Immunol* 2003 Feb; **15** (1): 26-30.
449. Fatal N, Suntio T, Makarow M. Selective protein exit from yeast endoplasmic reticulum in absence of functional COPII coat component Sec13p. *Mol Biol Cell* 2002 Dec; **13** (12): 4130-4140.
450. Karhinen L, Bastos RN, Jokitalo E, Makarow M. Endoplasmic reticulum exit of a secretory glycoprotein in the absence of sec24p family proteins in yeast. *Traffic* 2005 Jul; **6** (7): 562-574.
451. Baldwin TA, Ostergaard HL. Developmentally regulated changes in glucosidase II association with, and carbohydrate content of, the protein tyrosine phosphatase CD45. *J Immunol* 2001 Oct 1; **167** (7): 3829-3835.
452. Baldwin TA, Ostergaard HL. The protein-tyrosine phosphatase CD45 reaches the cell surface via golgi-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 2002 Dec 27; **277** (52): 50333-50340.
453. Jourdan N, Maurice M, Delautier D, Quero AM, Servin AL, Trugnan G. Rotavirus is released from the apical surface of cultured human intestinal cells through nonconventional vesicular transport that bypasses the Golgi apparatus. *J Virol* 1997 Nov; **71** (11): 8268-8278.
454. Yoo JS, Moyer BD, Bannykh S, Yoo HM, Riordan JR, Balch WE. Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem* 2002 Mar 29; **277** (13): 11401-11409.
455. Wang X, Matteson J, An Y, Moyer B, Yoo JS, Bannykh S, *et al.* COPII-dependent export of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from the ER uses a di-acidic exit code. *J Cell Biol* 2004 Oct 11; **167** (1): 65-74.

456. Temmerman K, Ebert AD, Muller HM, Sinning I, Tews I, Nickel W. A direct role for phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in unconventional secretion of fibroblast growth factor 2. *Traffic* 2008 Jul; **9** (7): 1204-1217.
457. Pellegrini L. Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signalling: a structural view. *Curr Opin Struct Biol* 2001 Oct; **11** (5): 629-634.
458. Zehe C, Engling A, Wegehingel S, Schafer T, Nickel W. Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Oct 17; **103** (42): 15479-15484.
459. Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Mol Biol Cell* 1999 May; **10** (5): 1463-1475.
460. Andrei C, Margiocco P, Poggi A, Lotti LV, Torrisi MR, Rubartelli A. Phospholipases C and A2 control lysosome-mediated IL-1 beta secretion: Implications for inflammatory processes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jun 29; **101** (26): 9745-9750.
461. Mambula SS, Calderwood SK. Heat shock protein 70 is secreted from tumor cells by a nonclassical pathway involving lysosomal endosomes. *J Immunol* 2006 Dec 1; **177** (11): 7849-7857.
462. Petrilli V, Dostert C, Muruve DA, Tschopp J. The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2007 Dec; **19** (6): 615-622.
463. Muruve DA, Petrilli V, Zaiss AK, White LR, Clark SA, Ross PJ, *et al.* The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response. *Nature* 2008 Mar 6; **452** (7183): 103-107.
464. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 2008 Mar 7; **132** (5): 818-831.
465. Jackson A, Friedman S, Zhan X, Engleka KA, Forough R, Maciag T. Heat shock induces the release of fibroblast growth factor 1 from NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Nov 15; **89** (22): 10691-10695.
466. Hirai Y, Nelson CM, Yamazaki K, Takebe K, Przybylo J, Madden B, *et al.* Non-classical export of epimorphin and its adhesion to alphaV-integrin in regulation of epithelial morphogenesis. *J Cell Sci* 2007 Jun 15; **120** (Pt 12): 2032-2043.
467. Peterson EA, Sutherland MR, Nesheim ME, Pryzdial EL. Thrombin induces endothelial cell-surface exposure of the plasminogen receptor annexin 2. *J Cell Sci* 2003 Jun 15; **116** (Pt 12): 2399-2408.
468. Chapman LP, Epton MJ, Buckingham JC, Morris JF, Christian HC. Evidence for a role of the adenosine 5'-triphosphate-binding cassette transporter A1 in the externalization of annexin I from pituitary folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 2003 Mar; **144** (3): 1062-1073.

469. Angelini G, Gardella S, Ardy M, Ciriolo MR, Filomeni G, Di Trapani G, *et al.* Antigen-presenting dendritic cells provide the reducing extracellular microenvironment required for T lymphocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Feb 5; **99** (3): 1491-1496.
470. Mouta Carreira C, Landriscina M, Bellum S, Prudovsky I, Maciag T. The comparative release of FGF1 by hypoxia and temperature stress. *Growth Factors* 2001; **18** (4): 277-285.
471. Shin JT, Opalenik SR, Wehby JN, Mahesh VK, Jackson A, Tarantini F, *et al.* Serum-starvation induces the extracellular appearance of FGF-1. *Biochim Biophys Acta* 1996 Jun 5; **1312** (1): 27-38.
472. Matsunaga H, Ueda H. Voltage-dependent N-type Ca²⁺ channel activity regulates the interaction between FGF-1 and S100A13 for stress-induced non-vesicular release. *Cell Mol Neurobiol* 2006 May; **26** (3): 237-246.
473. Deora AB, Kreitzer G, Jacovina AT, Hajjar KA. An annexin 2 phosphorylation switch mediates p11-dependent translocation of annexin 2 to the cell surface. *J Biol Chem* 2004 Oct 15; **279** (42): 43411-43418.
474. Sellke FW, Li J, Stamler A, Lopez JJ, Thomas KA, Simons M. Angiogenesis induced by acidic fibroblast growth factor as an alternative method of revascularization for chronic myocardial ischemia. *Surgery* 1996 Aug; **120** (2): 182-188.
475. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 1998 Feb 24; **97** (7): 645-650.
476. Buehler A, Martire A, Strohm C, Wolfram S, Fernandez B, Palmén M, *et al.* Angiogenesis-independent cardioprotection in FGF-1 transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2002 Sep; **55** (4): 768-777.
477. Wegehingel S, Zehe C, Nickel W. Rerouting of fibroblast growth factor 2 to the classical secretory pathway results in post-translational modifications that block binding to heparan sulfate proteoglycans. *FEBS Lett* 2008 Jul 9; **582** (16): 2387-2392.
478. Xu W, Boadle R, Dear L, Cvejic M, Emmanuel C, Zoellner H. Ultrastructural changes in endothelium during apoptosis indicate low microembolic potential. *J Vasc Res* 2005 Sep-Oct; **42** (5): 377-387.
479. Bendayan M, Rasio EA. Evidence of a tubular system for transendothelial transport in arterial capillaries of the rete mirabile. *J Histochem Cytochem* 1997 Oct; **45** (10): 1365-1378.
480. Savina A, Fader CM, Damiani MT, Colombo MI. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* 2005 Feb; **6** (2): 131-143.
481. Fader CM, Sanchez D, Furlan M, Colombo MI. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* 2008 Feb; **9** (2): 230-250.
482. Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 2004 Sep; **28** (1-2): 101-105.
483. Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004 Oct; **287** (4): C817-833.

484. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 2006 Jan; **86** (1): 369-408.
485. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, *et al.* Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006 Oct; **8** (10): 1124-1132.
486. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Apr; **8** (4): 275-283.
487. Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, *et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006 Jul 14; **126** (1): 121-134.
488. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Aug; **8** (8): 622-632.
489. Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Feb; **2** (2): 107-117.
490. Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009 Aug; **10** (8): 513-525.
491. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, *et al.* Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol* 2010 Jan; **12** (1): 19-30; sup pp 11-13.
492. Fader CM, Colombo MI. Multivesicular bodies and autophagy in erythrocyte maturation. *Autophagy* 2006 Apr-Jun; **2** (2): 122-125.
493. Simonsen A, Tooze SA. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol* 2009 Sep 21; **186** (6): 773-782.
494. Molmeret M, Zink SD, Han L, Abu-Zant A, Asari R, Bitar DM, *et al.* Activation of caspase-3 by the Dot/Icm virulence system is essential for arrested biogenesis of the Legionella-containing phagosome. *Cell Microbiol* 2004 Jan; **6** (1): 33-48.
495. Savina A, Vidal M, Colombo MI. The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 2002 Jun 15; **115** (Pt 12): 2505-2515.
496. Lapierre LA, Dorn MC, Zimmerman CF, Navarre J, Burnette JO, Goldenring JR. Rab11b resides in a vesicular compartment distinct from Rab11a in parietal cells and other epithelial cells. *Exp Cell Res* 2003 Nov 1; **290** (2): 322-331.
497. Okada M, Nozaki T. New insights into molecular mechanisms of phagocytosis in *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. *Arch Med Res* 2006 Feb; **37** (2): 244-252.
498. Ang F, Wong AP, Ng MM, Chu JJ. Small interference RNA profiling reveals the essential role of human membrane trafficking genes in mediating the infectious entry of dengue virus. *Virology* 2010; **7**: 24.

499. Scapin SM, Carneiro FR, Alves AC, Medrano FJ, Guimaraes BG, Zanchin NI. The crystal structure of the small GTPase Rab11b reveals critical differences relative to the Rab11a isoform. *J Struct Biol* 2006 Jun; **154** (3): 260-268.
500. Khvotchev MV, Ren M, Takamori S, Jahn R, Sudhof TC. Divergent functions of neuronal Rab11b in Ca²⁺-regulated versus constitutive exocytosis. *J Neurosci* 2003 Nov 19; **23** (33): 10531-10539.
501. Chen W, Feng Y, Chen D, Wandinger-Ness A. Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol Biol Cell* 1998 Nov; **9** (11): 3241-3257.
502. Essmann F, Wieder T, Otto A, Muller EC, Dorken B, Daniel PT. GDP dissociation inhibitor D4-GDI (Rho-GDI 2), but not the homologous rho-GDI 1, is cleaved by caspase-3 during drug-induced apoptosis. *Biochem J* 2000 Mar 15; **346 Pt 3**: 777-783.
503. McDowall MD, Scott MS, Barton GJ. PIPs: human protein-protein interaction prediction database. *Nucleic Acids Res* 2009 Jan; **37** (Database issue): D651-656.
504. Scott MS, Barton GJ. Probabilistic prediction and ranking of human protein-protein interactions. *BMC Bioinformatics* 2007; **8**: 239.
505. Fukuda M. Regulation of secretory vesicle traffic by Rab small GTPases. *Cell Mol Life Sci* 2008 Sep; **65** (18): 2801-2813.
506. Chen Y, Deng Y, Zhang J, Yang L, Xie X, Xu T. GDI-1 preferably interacts with Rab10 in insulin-stimulated GLUT4 translocation. *Biochem J* 2009 Sep 1; **422** (2): 229-235.
507. Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 2002 Apr 12; **296** (5566): 301-305.
508. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; **12**: 991-1045.
509. Fuchs EJ, Matzinger P. Is cancer dangerous to the immune system? *Semin Immunol* 1996 Oct; **8** (5): 271-280.
510. Gallucci S, Matzinger P. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 2001 Feb; **13** (1): 114-119.
511. D'Alessandro AM, Pirsch JD, Knechtle SJ, Odorico JS, Van der Werf WJ, Collins BH, *et al*. Living unrelated renal donation: the University of Wisconsin experience. *Surgery* 1998 Oct; **124** (4): 604-610; discussion 610-601.
512. Gonzalez-Begne M, Lu B, Han X, Hagen FK, Hand AR, Melvin JE, *et al*. Proteomic analysis of human parotid gland exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *J Proteome Res* 2009 Mar; **8** (3): 1304-1314.
513. Bette-Bobillo P, Vidal M. Characterization of phospholipase A2 activity in reticulocyte endocytic vesicles. *Eur J Biochem* 1995 Feb 15; **228** (1): 199-205.

514. Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganthan S, Lawrence DA, Strickland D, *et al.* Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* 2007 Apr 15; **109** (8): 3270-3278.
515. Looze C, Yui D, Leung L, Ingham M, Kaler M, Yao X, *et al.* Proteomic profiling of human plasma exosomes identifies PPARgamma as an exosome-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 Jan 16; **378** (3): 433-438.
516. Dubreuil V, Marzesco AM, Corbeil D, Huttner WB, Wilsch-Brauninger M. Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *J Cell Biol* 2007 Feb 12; **176** (4): 483-495.