

Université de Montréal

**Exploration du rôle du fragment LG3 sur les cellules
souches mésenchymateuses dans le contexte du rejet
vasculaire**

par

Eve-Annie Pilon

Programme de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Science (M. Sc.)
en biologie moléculaire
option générale

Septembre 2013

© Eve-Annie Pilon, 2013

Résumé

La vasculopathie du greffon est une pathologie caractérisée par un rétrécissement progressif et oblitérant des vaisseaux sanguins menant à une ischémie et une perte de fonction du greffon. Le rétrécissement vasculaire est dû à une accumulation de matrice extracellulaire (MEC) et de cellules mononuclées positives pour l'actine musculaire lisse alpha (α SMA) dont les cellules souches mésenchymateuses, le tout formant une néointima oblitérante. Cette pathologie est la cause principale de la perte des greffons rénaux et cardiaques à long terme. Le rejet vasculaire aigu est un prédicteur de la vasculopathie du greffon.

L'équipe du Dr Hébert a démontré que l'apoptose endothéliale, qui joue un rôle important dans le développement du rejet vasculaire, initie la libération de LG3, un fragment du protéoglycan perlécan. Les taux sanguins et urinaires de LG3 sont augmentés chez les receveurs d'allogreffe rénale avec rejet vasculaire et vasculopathie du greffon. Les résultats obtenus en laboratoire durant ma maîtrise ont permis de mieux caractériser l'impact du LG3 sur un type cellulaire important participant à la formation de néointima : les cellules souches mésenchymateuses.

Mes travaux ont démontré que le LG3 induit à la fois la migration horizontale des MSC et la transmigration des MSC. Cette migration est dépendante de la voie de signalisation d'ERK1/2, précédemment identifiée comme voie centrale dans la formation de néointima. De plus, nos résultats démontrent que la kinase Src est activée en amont de l'activation de la voie MAPK. La migration horizontale et la transmigration induites par le LG3 sont aussi dépendantes des intégrines α 2 β 1, ainsi que l'activation de la voie MAPK. Dans un modèle de transplantation murin, nous avons également démontré que l'injection sérique de LG3 recombinant favorise l'accumulation de cellules positives pour α SMA dans la néointima. En outre, lorsque le receveur est déficient pour l'intégrine α 2, mais que le greffon est sauvage, la formation de néointima induite par l'injection de LG3 est diminuée dans le greffon suggérant que les cellules du receveur jouent un rôle important dans la formation de la néointima. Enfin, nous avons démontré que l'injection de LG3 augmente aussi le nombre de cellules positives pour la forme phosphorylée d'ERK1/2 (p-ERK1/2) dans la néointima du greffon et que cette accumulation est dépendante de la présence des intégrines α 2 β 1 chez les cellules du receveur.

Lorsque le receveur est sauvage, il y a une augmentation du nombre de cellules positives pour p-ERK1/2.

L'investigation de ces mécanismes dans le remodelage vasculaire expose de nouvelles opportunités pour inhiber la réponse cellulaire qui mène au remodelage inadapté lors d'un dommage vasculaire chronique et ainsi prolonger la survie du greffon.

Mots-clés : cellule souche mésenchymateuse, LG3, migration, intégration, remodelage vasculaire, néointima

Abstract

Graft vasculopathy is diseases characterized by a progressive and obliterate narrowing of the blood vessels leading to ischemia and loss of graft function. This vascular narrowing is due to an accumulation of extracellular matrix and mononuclear cells positive for alpha smooth muscle actin (α -SMA) including mesenchymal stem cells, thus forming an occlusive neointima. This condition is the leading cause of long term loss of kidney and heart transplants. Acute vascular rejection is a predictor of graft vasculopathy.

Dr. Hébert's team has demonstrated that endothelial apoptosis, which plays an important role in the development of vascular rejection, initiates the release of LG3, a fragment of the proteoglycan perlecan. Blood and urine levels of LG3 are increased in renal allograft recipients with vascular rejection and graft vasculopathy. The results obtained in the laboratory during my Master have helped to better characterize the impact of LG3 on an important cell type involved in neointima formation: the mesenchymal stem cells.

My work has shown that the LG3 induces both the horizontal migration and the transmigration of MSC. This migration is ERK1/2-dependent, previously identified as a key molecule involved in neointima formation. In addition, our results demonstrate that Src kinase is activated by upstream activation of the MAPK pathway. Horizontal migration and transmigration induced by LG3 are also dependent on α 2 β 1 integrins, and the activation of the MAPK pathway. In a murine transplantation model, we also demonstrated that intravenous injection of recombinant LG3 promotes the accumulation of α SMA positive cells in the neointima. In addition, when the recipient is deficient for the α 2 integrin but the graft is wild type, LG3 fails to induce neointima formation in the graft suggesting that recipient cells play an important role in the neointima formation. Finally, we demonstrated that intravenous injection of LG3 also increases the number of positive cells for the phosphorylated form of ERK1/2 (p-ERK1/2) in the neointima. This accumulation is dependent on the presence of α 2 β 1 integrins on recipient cells: when the recipient is wild type, there is an increase in the number of cells positive for p-ERK1/2.

The investigation of these mechanisms in vascular remodeling presents new opportunities to inhibit the cellular response that leads to inadequate remodeling during chronic vascular damage and prolong graft survival.

Keywords: mesenchymal stem cell, LG3, migration, homing, vascular remodeling, neointima

Table des matières

INTRODUCTION	1
1 Rejet d'allogreffe d'organes: particularités de la réponse vasculaire	2
1.1 Le rejet en transplantation d'allogreffe.....	2
1.2 Le rejet cellulaire aigu induit par les cellules T	4
1.3 Le rejet humoral hyperaigu.....	5
1.4 Le rejet humoral aigu.....	6
1.5 Le rejet chronique	7
2 Le dommage vasculaire et les mécanismes de réparation	9
2.1 L'hypothèse de la «réponse au dommage».....	9
2.2 L'insulte endothéliale.....	11
2.3 L'apoptose endothéliale	12
2.4 Mécanismes de réparation du dommage vasculaire.....	14
3 Cellules souches mésenchymateuses : rôle dans la réparation vasculaire et le rejet	16
3.1 Caractérisation des MSC et leur potentiel immunologique	17
3.2 Mécanismes d'intégration des MSC au site d'injure vasculaire.....	19
3.3 Rôle d'ERK1/2 dans la formation de néointima et sur le phénotype anti-apoptotique des MSC.....	20
4 Matrice extracellulaire et membrane basale vasculaire	22
4.1 La matrice extracellulaire vasculaire	22
4.2 La membrane basale vasculaire et le perlécan	24
4.3 Le remodelage de la matrice extracellulaire dans la vasculopathie du greffon	28
5 Récepteurs intégrines et signalisation en aval de leur activation.....	30
5.1 Les intégrines et la migration cellulaire.....	31
5.2 La signalisation cellulaire en aval de la liaison du ligand	32
5.3 Rôle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ en pathologie vasculaire : l'exemple de l'athérosclérose...	34
5.4 Modèle murin déficient pour l'intégrine $\alpha 2$	35
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	37
1. Prémices.....	37
2. Hypothèse et objectifs.....	37

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.....	39
Article	39
DISCUSSION.....	77
1 Évaluation du potentiel migratoire des cellules souches mésenchymateuses.....	79
1.1 Potentiel migratoire des MSC.....	79
1.2 Activation de la voie ERK1/2 nécessaire à la migration	82
1.3 Le LG3, un fragment chimiotactique.....	84
2 Le LG3 dans le remodelage vasculaire.....	85
2.1 Évaluation de l'importance des intégrines $\alpha 2\beta 1$ dans le phénotype migratoire.....	85
2.2 Le LG3 dans un modèle de rejet vasculaire.....	87
2.3 Le LG3 dans d'autres modèles de remodelage vasculaire.....	91
3 Le LG3 et la différenciation chez les cellules souches mésenchymateuses	93
3.1 La calcification vasculaire et la néphropathie chronique.....	93
3.2 Le potentiel de différenciation des MSC	93
CONCLUSION.....	95
BIBLIOGRAPHIE.....	96

Liste des tableaux

Toutes les permissions pour l'utilisation des tableaux issus d'articles de ce mémoire ont été obtenues.

Tableau 1 - Principales différences entre la vasculopathie du greffon et l'athérosclérose (1) .	11
Tableau 2 - Matricryptines des molécules de la matrice extracellulaire.....	30
Tableau 3 - Familles d'intégrines comprenant la sous-unité $\beta 1$	31
Tableau 4 - Origine des cellules néointimales dans la vasculopathie du greffon	79

Liste des figures

Toutes les permissions pour l'utilisation des tableaux issus d'articles ou de sites internet de ce mémoire ont été obtenues.

Figure 1 - Structure d'une artère	4
Figure 2 - Rejet chronique d'allogreffe rénale	8
Figure 3 - Comparaison de l'aspect morphologique de l'athérosclérose typique et de la vasculopathie du greffon.....	10
Figure 4 - Voies intrinsèque et extrinsèque d'activation des caspases.....	14
Figure 5 - La membrane basale et ses composantes	25
Figure 6 - Le perlécan et ses 5 domaines distincts.....	26
Figure 7 - Signalisation en aval des intégrines	34
Figure 8 - Schéma de la signalisation en aval des intégrines.....	87

Liste des abréviations

ALCAM: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
AP: Adaptor Protein
APAF: Apoptotic Peptidase Activating Factor
ApoE: Apolipoprotein E
ARN : Acide Ribonucléique
ATP: Adenosine Triphosphate
AVC: Arrêt Vasculaire Cérébral
Bcl-2: B-Cell lymphoma-2
Bcl-xL: B-Cell lymphoma-extra large
BMP: Bone Morphogenic Protein
CCR: C-C motif Receptor
CMH : Complexe Majeur Histocompatibilité
CVML: Cellule Vasculaire Musculaire Lisse
CXCR: C-X-C motif Receptor
dATP: deoxyadenosine Triphosphate
DISC: Death Inducing Signal Complex
DSA : Donor Specific Antibody
EGF: Epidermal Growth Factor
EPC: Endothelial Progenitor Cell
ERK1/2: Extracellular signal Regulated Kinase 1 and 2
FADD: Fas-Associated protein with Death Domain
FAK: Focal Adhesion Kinase
GAG: Glycosaminoglycan
G-CSF: Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GFP: Green Fluorescent Protein
GPCR: G-Protein Coupled Receptor
GTP: Guanosine Triphosphate
HLA : Human Leukocyte Antigen

HSPG: Heparan Sulfate Proteoglycan
ICAM: Intercellular Adhesion Molecule
IFN- γ : Interferon-gamma
Ig: Immunoglobuline
IL: Interleukin
iv: intraveineux(se)
JNK: c-Jun N-terminal Kinases
LDL: Low Density Lipoprotein
LDLR: Low-Density Lipoprotein Receptor
LFA: Lymphocyte Function-associated Antigen
LG3: 3e motif laminine G du domaine V du perlécan
MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MAPKK: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK: Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase
MCP: Monocyte Chemotactic Protein
MEC: Matrice extracellulaire
MICA: MHC class I polypeptide-related sequence A
MMP: Matrix metalloproteinases
MSC: Mesenchymal Stem Cell – Cellule souche mésenchymateuse
N-CAM: Neural Cell Adhesion Molecule
NK: Natural Killer
PDGF: Platelet Derived Growth Factor
PI3K: Phosphatidylinositide 3-kinases
PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
ROCK: Rho-associated protein kinase
SDF: Stromal Derived Factor
SEA: Sperm Enterokinase Agrin homology
SOS: Son of Sevenless
SPARC: Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
TCR: T Cell Receptor

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TIMP : Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VLA-2: Very Late Antigen 2

WT: Wild Type

α -SMA: Actine Musculaire Lisse alpha

La vérité ne se possède pas, elle se cherche
–Albert Jacquard

Remerciements

Je n'aurais jamais pu réaliser ce travail de maîtrise sans le soutien d'un grand nombre de personnes. Je veux d'abord remercier ma directrice de recherche, Marie-Josée. Je la remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir donné l'occasion de goûter à la recherche! Je la remercie pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail de maîtrise. Son souci de la perfection et ses précieux conseils m'ont permis de m'épanouir tout au long de ma maîtrise. J'espère faire fructifier ses enseignements dans ma future profession. Je tiens à remercier la « gang » de filles plus un gars (!!) du labo Hébert! Mélanie, Katia, Monique, Déborah, Julie, Bing et Luc. J'ai beaucoup aimé travailler avec vous. Je garde un excellent souvenir de nos échanges scientifiques, de nos questionnements, de nos fous rires et de nos moments d'incompréhension linguistique! Le travail de groupe n'est pas toujours facile, mais avec une équipe travaillante et sympathique comme vous, c'est beaucoup plus agréable! Finalement je veux remercier mon chéri, Rob, qui a su célébrer les bons moments avec moi et me reconforter dans les plus durs! Merci de m'avoir épaulé tout au long de cette belle aventure!

INTRODUCTION

L'échange de matériel biologique afin de prolonger ou améliorer la qualité de vie fascine l'homme. La transplantation est un phénomène récent : les avancées permettant le succès de la transplantation ayant été réalisées dans les dernières décennies. C'est au tout début du XIX^e siècle que la première transfusion sanguine d'homme à homme a été recensée. Il faut attendre près d'un siècle pour que la première transplantation d'organe sur un chien soit réalisée. C'est Alexis Carrel, considéré par plusieurs comme le père de la transplantation, qui développe l'anastomose vasculaire, technique de suture des vaisseaux sanguins permettant de restaurer la circulation sanguine, ce qui a rendu possible cette première transplantation (1). Ses travaux en chirurgie vasculaire et en transplantation d'organes lui ont valu le prix Nobel de physiologie et médecine de 1912 (1). Grâce à ses travaux, diverses équipes commencent à étudier la transplantation d'organes. Deux médecins travaillent en parallèle, mais de façon indépendante : Mathieu Jaboulay et Emerich Ullmann, sont les premiers à prélever un rein chez le porc et à le greffer à une femme; tentatives qui se révèlent infructueuses (1). Il faut attendre 1933 pour que Serguey Voronoy mette en évidence la notion de rejet immunologique en réalisant les premières allogreffes humaines rénales (1).

Par définition, le mot transplantation désigne un organe entier transplanté d'un donneur à un receveur, alors que le mot greffe fait référence à un tissu ou une partie d'organe transplanté. Il est à noter que les deux termes sont toutefois utilisés comme équivalents lorsque l'on parle de transplantation. Il s'agit d'une autogreffe si celle-ci est effectuée sur le même individu alors qu'une isogreffe désigne une greffe entre individus isogéniques. Une allogreffe est effectuée entre individus non isogéniques de la même espèce et une xénogreffe réfère à une greffe entre individus d'espèces différentes.

La réponse immunologique lors de l'allogreffe rend la transplantation d'organes plus complexe, toutefois, il n'existe que très peu d'alternatives lorsqu'un organe cesse d'être fonctionnel. Trois avancements majeurs en médecine ont permis que la transplantation devienne une technique fortement pratiquée en clinique en diminuant les risques associés :

- 1) la fine maîtrise des techniques chirurgicales pour le remplacement d'organes par les chirurgiens;
- 2) la formation d'un réseau entre centres de transplantations afin que les organes disponibles soient donnés aux receveurs les plus appropriés;
- 3) l'utilisation d'agents immunosuppresseurs puissants tels que la cyclosporine A (2).

Pourtant, malgré l'avancement de la médecine depuis l'anastomose d'Alexis Carrel aux immunosuppresseurs puissants, la vasculopathie du greffon demeure un des obstacles majeurs en transplantation d'organes solides pour la survie à long terme de l'organe transplanté. La vasculopathie du greffon est une forme de rejet vasculaire caractérisé par un épaissement néointimal des artères, artérioles et capillaires du greffon qui réduit les lumières du vaisseau et mène éventuellement à l'occlusion et l'ischémie des tissus perfusés (3). À ce jour, la vasculopathie du greffon demeure la cause majeure de perte de fonction d'allogreffe à long terme (4).

1 Rejet d'allogreffe d'organes: particularités de la réponse vasculaire

1.1 Le rejet en transplantation d'allogreffe

Tel que mentionné précédemment, le principal obstacle pour la survie à long terme de l'allogreffe est le rejet immunologique de l'organe transplanté. Le phénomène de rejet est complexe et implique des réactions d'hypersensibilité induites par des cellules et des anticorps contre les molécules d'histocompatibilité présentes sur les cellules du greffon. Le principal système génétique d'histocompatibilité est le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou human leukocyte antigen (HLA) chez l'humain (5). Avant la transplantation, un test de cross match est effectué afin de d'attribuer l'organe à un receveur n'ayant aucun anti-HLA spécifique du donneur.

Les différents types de rejet étaient traditionnellement divisés en trois grandes catégories selon le moment du rejet par rapport à celui de la transplantation : le rejet suraigu ou hyper aigu, le rejet aigu et le rejet chronique. De nos jours, la classification standardisée de Banff sépare les critères diagnostiques en cinq catégories selon la conformité du spécimen de biopsie et le score lésionnel normalisé. Le score lésionnel s'appuie sur la sévérité de la tubulite, de l'inflammation ou l'infiltration de cellules mononuclées, de la glomérulite, de l'épaississement hyalin artériolaire, de l'artérite intinale, de la glomérulopathie d'allogreffe, de la fibrose interstitielle, de l'atrophie tubulaire, de l'épaississement myo-intimal, de la capillarite périlitubulaire ainsi que du marquage C4d (6). Le score pour chacun des critères va de 0 (absence) à 3 (lésion la plus sévère).

La biopsie rénale peut être classée en un tableau diagnostique comme suit :

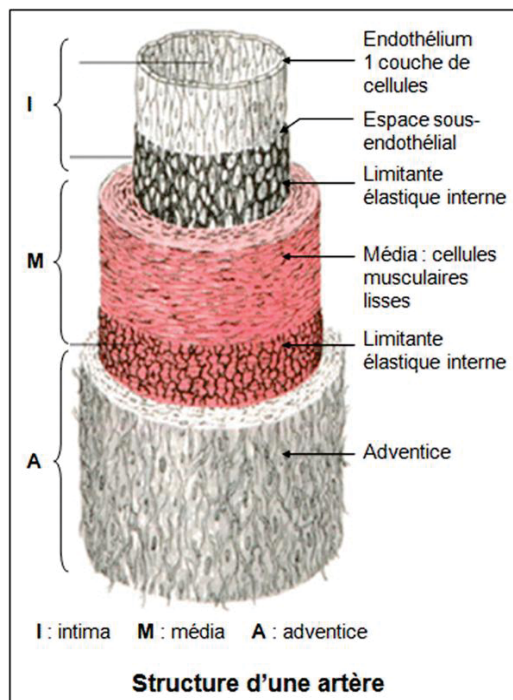
1. Normale
2. Avec rejet humoral (aigu ou chronique)
3. Avec rejet aigu induit par les cellules T suspecté (changements limites)
4. Avec rejet cellulaire T (aigu ou chronique)
5. Avec fibrose interstitielle et atrophie tubulaire (IFTA - sans étiologie spécifique)
6. Autre : changements non attribués à un rejet

Certaines biopsies peuvent se retrouver dans plusieurs de ces catégories.

Que le rejet soit de nature cellulaire ou humorale, le remodelage oblitérant au niveau du vaisseau mène à la vasculopathie du greffon (6). Je décris donc ci-après les mécanismes qui sous-tendent la vasculopathie du greffon. Les descriptions suivantes sont basées sur le contexte d'un greffon rénal, cependant des changements similaires sont observés chez les autres organes solides vascularisés. Il est à noter que le rejet vasculaire est un terme général qui signifie une inflammation au niveau artériel qui peut découler d'une atteinte cellulaire et/ou humorale.

Afin de mieux comprendre les descriptions des différents types de rejet ci-après, il est nécessaire de connaître la structure d'une artère. Une artère normale est composée des 3 couches concentriques (Figure 1) :

- L'intima, composée de l'endothélium et d'une membrane basale.
- La média, composée de matrice extracellulaire abondante en collagène et en élastine et de cellules musculaires lisses vasculaires.
- L'adventice, composé de matrice extracellulaire abondante en collagène et de fibroblastes.



http://georges.dolisi.free.fr/Physiopathologie/Physiopatho_atherosclerose.htm

Figure 1 - Structure d'une artère

1.2 Le rejet cellulaire aigu induit par les cellules T

Le rejet aigu survient à l'intérieur de quelques jours à quelques semaines suivant la transplantation chez un individu non-immunosupprimé ou peut apparaître des mois voire des années suivant la transplantation chez un receveur sous immunosuppresseurs adéquats (5). Le rejet aigu est causé par des mécanismes immunologiques cellulaires et humoraux, un ou

l'autre des mécanismes pouvant être prédominant chez un patient. Les patients qui présentent un rejet cellulaire aigu démontrent une augmentation de créatinine sérique et des signes cliniques d'insuffisance rénale (5). Avec les thérapies d'immunosuppression actuelles, dirigées contre les cellules T, l'incidence du rejet aigu est d'approximativement 5-10% dans la première année chez les patients n'ayant pas de titres de DSA avant la transplantation (3). Histologiquement, on retrouve la plupart du temps une infiltration interstitielle par des cellules T CD4 et des cellules T CD8 avec de l'œdème et une hémorragie interstitielle légère (5). La tubulite, l'invasion de l'épithélium tubulaire par les cellules T CD4, CD8 et macrophages, est une particularité caractéristique du rejet aigu cellulaire (7). Des lymphocytes exprimant l'ARN messager pour la perforine ainsi que les protéines perforines sont associés aux cellules tubulaires épithéliales (8, 9). Il y a d'ailleurs augmentation de l'apoptose des cellules tubulaires lors du rejet aigu (10, 11).

En plus de l'injure tubulaire, les cellules T CD8 peuvent endommager l'endothélium causant une endartérite (5). Les capillaires glomérulaires et péri-tubulaires sont remplis de cellules mononuclées qui peuvent aussi envahir les tubules et causer de la nécrose focale tubulaire (5). L'endartérite, qui est pathognomonique au rejet aigu induit par les cellules T (3), est caractérisée par une accumulation cellulaire sous l'endothélium de l'artère et par une infiltration intinale des cellules T CD4, CD8 et macrophages. Elle peut être accompagnée d'un épaississement myo-intimal de la microvasculature de l'organe, résultant en une diminution du diamètre de la lumière et ultimement à son occlusion.

1.3 Le rejet humoral hyperaigu

Le rejet suraigu peut survenir quelques minutes à quelques heures après la transplantation chez les patients pré-sensibilisés (qui ont des titres élevés d'anticorps anti-donneurs au moment de la greffe). Lorsqu'il survient, il est majoritairement reconnu par le chirurgien juste après que l'anastomose vasculaire ait été complétée (5). Contrairement à un rein qui normalement retrouve sa couleur rosée, sa turgescence tissulaire et rapidement sécrète de l'urine, un rein en rejet suraigu devient rapidement cyanosé, marbré et flasque et ne sécrète que quelques gouttes de liquide sanglant (5). Ce type de rejet est rare de nos jours puisque le test de cross match est utilisé avant la transplantation.

1.4 Le rejet humoral aigu

Le rejet humoral aigu est maintenant accepté comme étant cliniquement et pathologiquement distinct du rejet aigu induit par les cellules T (12), bien qu'il puisse survenir avec ou sans des composantes du rejet cellulaire. Approximativement 25% des épisodes de rejet humoral aigu sont causés en partie à cause de la présence d'anticorps contre les HLA du donneur (3). D'autres antigènes présents sur la surface des cellules endothéliales peuvent aussi être la cible pour la production d'anticorps contre le donneur, tels les antigènes des groupes sanguins (ABO) et des alloantigènes endothéliaux (13). De plus, des auto-anticorps contre le récepteur à l'angiotensine II type 1 ont été impliqués dans cette pathologie (3). Ces auto-anticorps peuvent être formés suite à la greffe ou présents avant la greffe. Cardinal *et al.* ont démontré que les titres d'anti-LG3 (un auto-anticorps contre le fragment LG3) et d'anticorps spécifiques anti-donneurs (DSA de l'anglais donor-specific antibodies) suivant la greffe sont associés à une faible survie du greffon chez des patients présentant un rejet vasculaire aigu (14). Dans un modèle de rejet vasculaire murin, ils ont aussi démontré que l'injection d'anti-LG3 augmente le remodelage vasculaire et la formation de néointima (14). L'équipe de Jurcevic *et al.* a illustré que les titres d'anti-vimentine élevés dans les deux premières années suivant la transplantation cardiaque étaient prédicteurs du développement de la vasculopathie du greffon à cinq ans (15). De plus, une étude réalisée par Sánchez-Zapardiel *et al.* s'est penchée sur l'impact de la présence d'anti-MICA avant la greffe sur la survie du greffon (16). Il est à noter que la présence de ces anti-MICA chez les patients de leur cohorte est indépendante des anti-HLA, des transplantations précédentes ou du sexe féminin (grossesses potentielles) (16). Ils ont démontré que les patients ayant des titres de HLA-MICA pré-greffe ont une faible survie de greffon rénal (16). Les anticorps formés par le receveur peuvent causer du dommage de plusieurs façons, incluant la cytotoxicité dépendante du complément, l'inflammation et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (7). La cible initiale de ces anticorps est la vasculature du greffon (7).

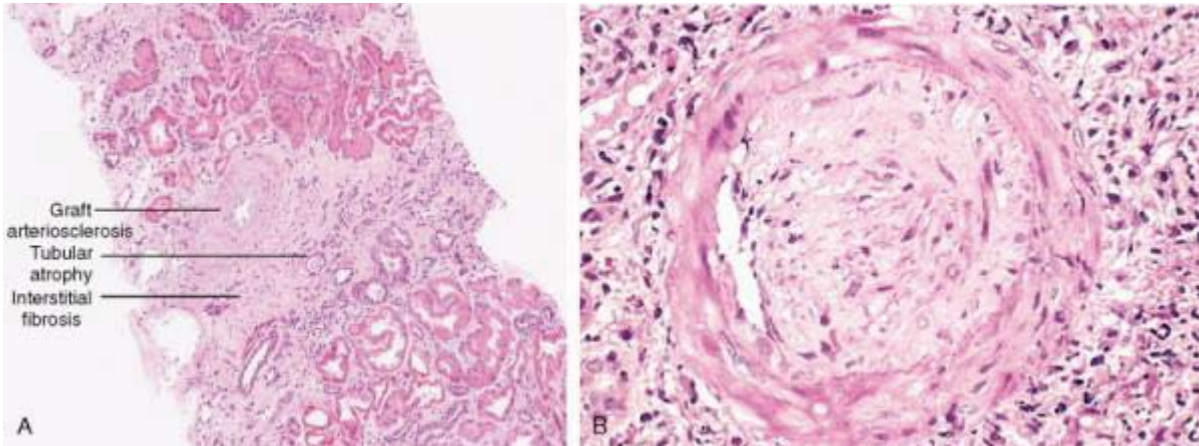
Les lésions histologiques peuvent ressembler à une vascularite nécrotique avec des cellules endothéliales nécrosées, présence d'infiltration de neutrophiles, déposition d'anticorps, du complément et de la fibrine en plus d'avoir un thrombus (5). Dans la majorité des cas, la

vascularite est moins aiguë et est caractérisée par un épaissement de l'intima causé par des fibroblastes en prolifération, des myocytes et des macrophages spumeux (5).

Les patients atteints d'un rejet humoral aigu ont une augmentation rapide des niveaux de créatinine sérique, des jours à des semaines ou des années après la transplantation. L'augmentation de la créatinine sérique est un signe de dysfonction rénale. La présentation clinique du rejet humoral aigu n'est pas distincte de celle du rejet cellulaire; une biopsie est donc nécessaire pour la confirmation du diagnostic. Un marquage de la déposition de Cd4 (fragment du complément) dans les capillaires péri-tubulaires indique un épisode de rejet humoral aigu (17).

1.5 Le rejet chronique

Le rejet chronique peut survenir des mois ou des années après la transplantation. Il peut résulter des mécanismes de rejet cellulaire et/ou humoral. Les changements chroniques sont observables au niveau du glomérule, des vaisseaux, des tubules et de l'interstitium. La glomérulopathie du transplant, la capillaropathie péri-tubulaire, l'artériopathie du transplant et la fibrose interstitielle avec atrophie tubulaire sont des caractéristiques histologiques de ce type de rejet (Figure 2A) (3). Dans la vaste majorité des cas, le rejet chronique ne répond pas aux traitements d'immunosuppression standards (5).



Kumar: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professional Edition, 8th edition 2009

Figure 2 - Rejet chronique d'allogreffe rénale

A Changements rénaux lors de rejet chronique

B Artériosclérose du transplant. La lumière du vaisseau est occupée par l'accumulation des cellules α SMA positives et de tissu conjonctif qui forment une néointima

La glomérulopathie du transplant est caractérisée histologiquement par la duplication, ou multilamination, de la membrane basale du glomérule. La microscopie électronique permet d'observer la lamination de la membrane basale, la perte de la fenestration par les cellules endothéliales et des degrés variables de l'effacement des pédicelles des podocytes. La majorité des cas sont associés avec des titres élevés d'anticorps circulants contre les antigènes HLA de classe II du donneur, parfois de classe I, et approximativement 30 à 50% de ceux-ci ont de la déposition de C4d dans les capillaires péri-tubulaires (12, 18).

Tout comme dans le cas de la glomérulopathie du transplant, la duplication de la membrane basale peut être observée dans les capillaires péri-tubulaires par microscopie électronique lorsqu'il y a capillaropathie péri-tubulaire (3). Lorsque l'endothélium est endommagé et se répare, il se forme une nouvelle membrane basale. La multilamination peut découler d'épisodes répétés de dommage à l'endothélium par des anticorps puis de réparation (3). L'accumulation de cellules mononuclées dans les capillaires péri-tubulaires est aussi caractéristique du rejet chronique.

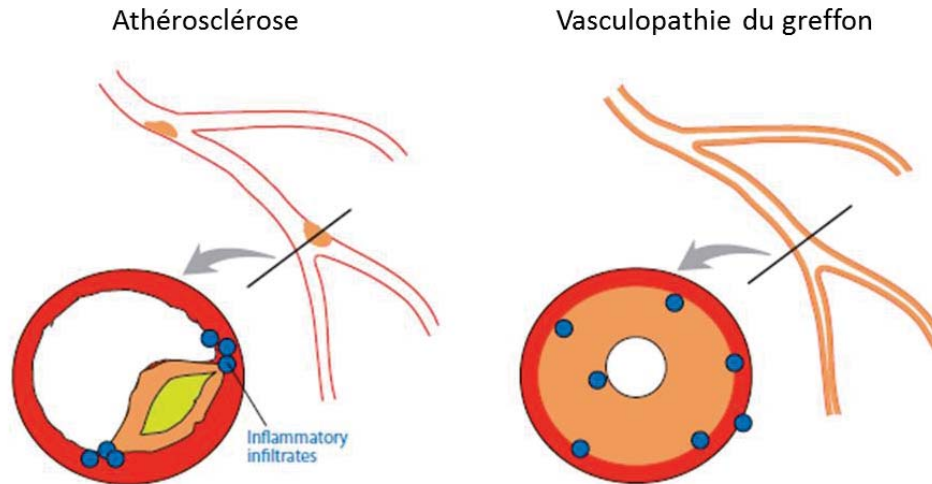
L'artériopathie du transplant, ou vasculopathie du greffon, est caractérisée par un épaissement néointimal concentrique des artères, artérioles et capillaires du greffon sans duplication de la membrane basale ou de la lamine élastique (3). La réaction myo-fibroproliférative engendre la formation d'une néointima oblitérante qui cause un rétrécissement vasculaire (Figure 2B). L'épaississement néointimal concentrique provient de l'accumulation de cellules mononuclées, de matrice extracellulaire et de cellules positives pour l'actine musculaire lisse alpha (α SMA). Cet épaissement myo-intimal sous-endothélial de la microvascularisation d'organes réduit les lumières du vaisseau et mène éventuellement à l'occlusion et l'ischémie des tissus perfusés (19). À ce jour, la vasculopathie du greffon demeure la cause majeure de perte de fonction d'allogreffe à long terme (4).

2 Le dommage vasculaire et les mécanismes de réparation

2.1 L'hypothèse de la «réponse au dommage»

L'hypothèse de la «réponse au dommage» (de l'anglais «response-to-injury») a été proposée pour la première fois par Rudolph Virchow en 1856 pour expliquer la pathogénèse de l'athérosclérose (20). Il estimait que l'athérogénèse impliquait une combinaison de réponses inflammatoires et prolifératives dans la paroi de l'artère, qui précèdent les changements dégénératifs qui avaient été depuis longtemps reconnus dans les lésions avancées de l'athérosclérose. Cette hypothèse a par la suite été complétée par plusieurs pour inclure la présence de thrombocytes ainsi que la prolifération et l'accumulation de cellules musculaires lisses dans l'intima (20).

En transplantation cardiaque, environ la moitié des patients nécessitent une greffe de cœur suite à l'insuffisance cardiaque causée par l'athérosclérose (21). En plusieurs points, la vasculopathie du greffon s'apparente à l'athérosclérose. Les deux sont caractérisées par une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion et d'infiltration leucocytaires, un profil de cytokines similaires, une accumulation de matrice extracellulaire (MEC) aberrante ainsi qu'une accumulation précoce et prolongée de lipides extracellulaires et intracellulaires (21).



Mitchell RN. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:19-47

Figure 3 - Comparaison de l'aspect morphologique de l'athérosclérose typique et de la vasculopathie du greffon

De plus, la dysfonction endothéliale, l'apoptose endothéliale, la migration de cellules musculaires lisses de l'intima ainsi que des cellules souches du receveurs jouent un rôle dans ces deux pathologies (21). Des facteurs immunologiques et non-immunologiques contribuent à l'insulte vasculaire et à l'athérogénèse (21). Plusieurs facteurs sont spécifiques à la vasculopathie du greffon : l'ischémie-reperfusion, l'âge du donneur, la qualité de l'organe, l'âge du receveur, la différence entre les HLA, la mort cérébrale du donneur (21). À l'opposé, l'hyperlipidémie, le diabète, le stress oxydatif, l'hypertension, la modulation de cytokines, l'inflammation, la protéine C-réactive, les infections et les autres facteurs environnementaux comme la cigarette sont des facteurs communs à l'athérosclérose et à la vasculopathie du greffon (21). La figure 3 illustre les différences entre l'athérosclérose typique et la vasculopathie du greffon et le tableau 1 les résume (21, 22).

Tableau 1 - Principales différences entre la vasculopathie du greffon et l'athérosclérose (1)

Athérosclérose	Vasculopathie du greffon
Lésions focales	Lésions diffuses
Lésions excentriques	Lésions concentriques
Histologie : plaque complexe avec athérome, calcification et rupture de la limitante élastique interne, infiltrats épars	Histologie : hyperplasie intimale composée de cellules positives pour α SMA; limitante élastique intacte; infiltration de cellules mononuclées variable
Incidence tardive (années)	Incidence rapide (mois)
Facteurs de risques cardiaques	Domage de nature immunologique

L'hypothèse de Medawar s'applique aussi à la pathogénèse de la vasculopathie du greffon : le dommage endothélial initial mène à une réaction fibro-proliférative, un épaissement néointimal et un remodelage vasculaire observés dans la vasculopathie du greffon (23, 24).

2.2 L'insulte endothéliale

Le dommage initial à l'endothélium du greffon, lors de la procédure chirurgicale, induit par des facteurs indépendants des allo-antigènes cause l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion chez les cellules endothéliales telles que P-sélectine, E-sélectine, la molécule d'adhésion vasculaire 1 (VCAM-1) et la molécule d'adhésion intercellulaire a (ICAM-1) (23). Par conséquent, l'interaction des neutrophiles polymorphonucléaires et des lymphocytes avec cet endothélium est augmentée (25, 26). De plus, les chimiokines produites par l'endothélium et les cellules interstitielles promeuvent la liaison des lymphocytes et des macrophages à l'endothélium (27, 28). La diapédèse des neutrophiles polymorphonucléaires augmente l'arrivée des macrophages dans l'espace sous-endothélial qui peuvent être activés par IFN- γ (23). Les macrophages activés produisent à leur tour plusieurs molécules pro-

inflammatoires telles qu'IL-1, IL-6, IFN- γ et TNF- α ainsi que des chimiokines telles qu'IL-8, MCP-1, MIP-1 α et MIP-1 β (23). Ces molécules activent à leur tour l'endothélium créant une boucle de rétroaction positive qui endommage celui-ci avant même que les facteurs allogéniques n'entrent en jeu (23).

En plus d'être capable d'attirer et d'activer les macrophages, l'endothélium peut activer les cellules T alloréactives par la voie d'allo-reconnaissance directe de la présentation d'antigène (23). Des données *in vitro* ont démontré que les cellules endothéliales expriment les HLA de classe I et II suite à la stimulation par IFN- γ , en plus d'être capables de directement activer les cellules T (29, 30). En plus de l'expression des HLA, les cellules endothéliales peuvent exprimer les molécules co-stimulatrices nécessaires pour l'activation complète des cellules T telle que LFA-3 qui interagit avec CD2 sur la cellule T (30).

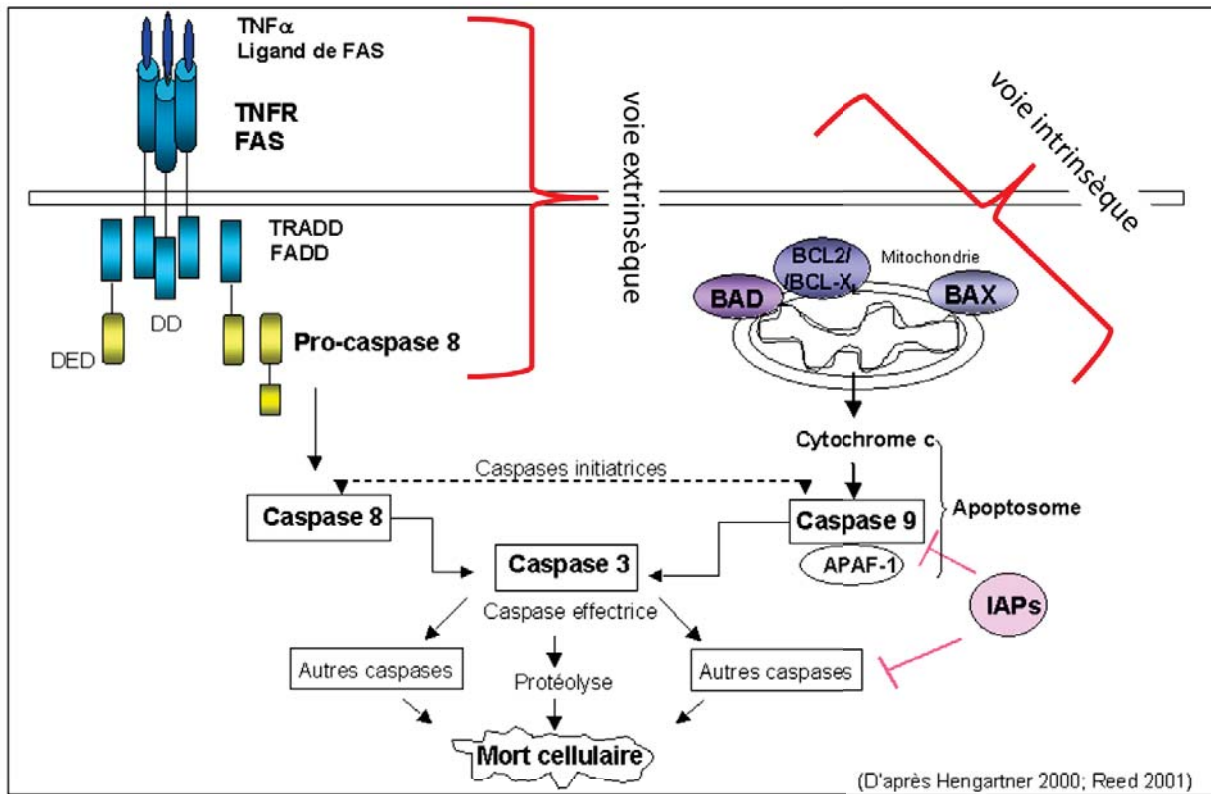
2.3 L'apoptose endothéliale

L'apoptose des cellules endothéliales est décrite dans la littérature comme centrale dans la vasculopathie du greffon. Cette mort cellulaire programmée est caractérisée par des changements morphologiques qui incluent le rétrécissement de la cellule, la condensation de la chromatine, la formation de corps apoptotiques et le détachement de la cellule de la MEC (31). Les cellules T, les anticorps et les cytokines participent à l'induction de l'apoptose endothéliale dans le rejet vasculaire aigu et la vasculopathie du greffon (3, 32). L'activation de protéases cystéines spécifiques, les caspases, et le clivage de substrats spécifiques par les caspases effectrices sont responsables des changements morphologiques durant l'apoptose (31). L'activation des caspases effectrices peut se faire de deux façons non mutuellement exclusives : la voie intrinsèque (mitochondriale) et la voie extrinsèque (31) (Figure 4). La première est déclenchée par une multitude de stimuli immuns (voie du complément) et non-immuns (hypoxie, stress oxydatif) qui mènent à une augmentation de la disponibilité mitochondriale de protéines pro-apoptotiques membres de la famille Bcl-2, tel que Bax (32). Ceci a pour effet d'initier la perméabilité membranaire de la mitochondrie et la libération cytosolique des plusieurs protéines notamment le cytochrome C (31). Le cytochrome C, lorsque libre dans le cytosol, lie et active la protéine APAF1 qui, en présence d'ATP/dATP,

induit la formation de l'apoptosome et active une caspase initiatrice (caspase-9). L'activation de la caspase-9 active les caspases effectrices (caspases-3,6 et 7) (31).

Dans la voie extrinsèque, l'initiation se fait au niveau de la liaison d'un récepteur membranaire de mort cellulaire, tel que Fas, avec son ligand (Fas-ligand). Il est à noter que pendant le développement du rejet aigu et chronique de greffons solides, les cellules T et les macrophages expriment Fas à leur surface (33). Suite à la liaison, il y a recrutement de molécules adaptatrices comme FADD (Fas-Associated Death Domain) et la caspase-8 qui forment un complexe oligomérique de signalisation de mort (DISC) (31). La formation du DISC conduit à l'activation de la caspase-8, ce qui peut directement activer la caspase-3 (31). Il peut y avoir un échange entre les deux voies pour produire l'activation des caspases effectrices et celui-ci peut se produire via le clivage de Bid (aussi membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) par la caspase-8 (32).

L'équipe du Dr Hébert a démontré *in vitro* que lorsque la caspase-3 est activée, lors de l'apoptose des cellules endothéliales, des protéases telle que la cathepsine-L sont libérées et peuvent cliver des substrats présents dans la MEC (34). Le perlécan est une cible de la cathepsine-L et son clivage par celle-ci génère la libération du fragment C-terminal LG3 (34). L'activité biologique de ce fragment sera discutée plus loin dans ce mémoire. En plus du rôle sur la MEC des médiateurs libérés lors de l'apoptose endothéliale, l'activation des caspases chez les cellules endothéliales régule aussi la libération de vacuoles autophagiques, des nanovésicules différentes des corps apoptotiques (35).



Guasch G., *Dérégulation moléculaire et cancer: prolifération, survie et inhibition de l'apoptose*. In: IMGT Education
 IMGT®, the international ImMunoGeneTics information system®, <http://www.imgt.org>

Figure 4 - Voies intrinsèque et extrinsèque d'activation des caspases

Chez l'humain, des cellules apoptotiques ont été observées dans des artères coronariennes de patients ayant eu une greffe de cœur et démontrant des signes précoces de vasculopathie du greffon (36, 37). Dans un modèle de rejet vasculaire aigu avec développement de la vasculopathie du greffon chez des cochons miniatures, la durabilité de la réponse initiale de l'apoptose endothéliale est corrélée avec le développement de la vasculopathie du greffon (38, 39).

2.4 Mécanismes de réparation du dommage vasculaire

L'insulte vasculaire, avec perte de cellules endothéliales ou seulement la dysfonction de celles-ci, stimule la prolifération des CVML médiales et la synthèse de matrice associée ce qui

épaissit l'intima (7). La guérison d'un vaisseau sanguin est analogue à la guérison de d'autres tissus endommagés; dans les vaisseaux il en résulte une néointima (7). Lors de la guérison de plaies cutanées, par exemple, les fibrocytes du mésenchyme entourant la plaie se différencient en fibroblastes et leur activité de sécrétion est réactivée afin d'activer la guérison (40). En revanche, pendant le processus de guérison du vaisseau, les cellules endothéliales qui recouvrent les zones de dénudation peuvent migrer de zones adjacentes non-injuriées, ou peuvent dériver de précurseurs dans la circulation (7). Les CVML de la média ou des précurseurs de CVML circulants peuvent migrer vers l'intima, proliférer et synthétiser de la MEC (7). La néointima résultante est typiquement recouverte de cellules endothéliales (7). Cette réponse néointimale se développe suite à tous les dommages vasculaires ou dysfonctions, indépendamment de la cause (7). Par conséquent, l'épaississement néointimal est le résultat d'une réponse stéréotypée des parois du vaisseau à l'injure (7). Il est néanmoins important de savoir que le phénotype des CVML néointimales est distinct du phénotype des CVML médiales; les CVML néointimales ne sont pas capable de se contracter comme les cellules de la média, mais elles sont capables de se diviser (7). Dans la vasculopathie du greffon, ces CVML acquièrent aussi un phénotype anti-apoptique, ce qui empêche leur élimination (41). Bien que ces cellules néointimales aient longtemps été considérées comme des cellules dérivées de la dé-différenciation et migration des CVML de la média, plusieurs indices provenant de modèles animaux pointent vers un apport considérable de cellules dérivées de précurseurs circulants du receveur (42-45).

L'incorporation de cellules souches aux sites d'injure vasculaire et leur différenciation en cellules contractiles favorisent l'oblitération vasculaire. À l'opposé, l'incorporation de cellules souches provenant du receveur à l'endothélium, mécanisme appelé «accommodation», peut prévenir le remodelage obstructif vasculaire en bloquant l'attaque immunitaire contre les parois du vaisseau (46). Medawar a proposé en 1965 que l'endothélium du greffon puisse être remplacé par les cellules du receveur et ainsi induire la tolérance envers ce greffon (47). Plusieurs études avec des modèles animaux et chez l'humain confirment cette hypothèse de ré-endothélialisation. Dans un modèle murin de transplantation aortique, deux équipes ont démontré que la majorité des cellules endothéliales de la néointima provenait du receveur et que de 20 à 30% de celles-ci proviennent de la moelle osseuse (43, 48). Chez l'humain, la

détection du chromosome Y dans les greffons de cœur et de rein, avec un donneur de sexe féminin, a permis de démontrer que de 1 à 66% des cellules endothéliales de la néointima proviennent aussi du receveur (49-52). Les facteurs spécifiques et les voies de signalisation impliquées qui régulent la balance entre l'accommodation et le remodelage obstructif sont encore méconnus et mal définis. Les cellules endothéliales progénitrices et les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont deux types cellulaires impliqués dans la ré-endothélialisation (46).

Le terme cellule endothéliale progénitrice (EPC) englobe une population hétérogène de cellules progénitrices qui expriment une panoplie de marqueurs de surfaces incluant CD34, VEGFR2 et CD133, et qui ont le potentiel de se différencier en cellules endothéliales (46). Les EPC, qui se trouvent dans la moelle osseuse, sont mobilisées dans la circulation sanguine afin d'aller vers les sites de néovascularisation et d'injure endothéliale (53). Dans un modèle d'injure vasculaire induite mécaniquement chez le rat, le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) augmente la ré-endothélialisation et le nombre d'EPC circulantes en plus de diminuer la formation de néointima (54).

Dans un modèle d'injure vasculaire induite mécaniquement suite à une transplantation de MSC positives pour la protéine de fluorescence verte (GFP), la participation des MSC à la ré-endothélialisation a été évaluée (55). Trois semaines après l'injure vasculaire, les cellules GFP positives à l'interface du vaisseau exprimait le marqueur endothélial CD31, indice de la capacité des MSC de se différencier en cellules endothéliales au site d'injure (55).

3 Cellules souches mésenchymateuses : rôle dans la réparation vasculaire et le rejet

Tel que mentionné précédemment, la néointima est composée de cellules contractiles qui expriment l'actine musculaire lisse alpha (α SMA), mais qui ont un phénotype hétérogène (46). Cette hétérogénéité s'explique en partie par l'origine diversifiée des cellules formant la néointima (46). Les cellules vasculaires musculaires lisses (CVML) migrant de la média vers la néointima ont été les premières cellules considérées pour l'explication de l'accumulation de cellules positives pour α SMA. Depuis plusieurs années, de nouvelles études démontrent

l'importance des cellules souches dans la formation de néointima en vasculopathie du greffon ainsi que dans d'autres formes de remodelage vasculaire (42, 44, 45, 56). Des études sur trois types d'injure vasculaire différents chez la même souche de souris démontrent que l'origine des cellules formant la néointima est diverse et la contribution des cellules de la moelle osseuse corrèle avec la durée et l'intensité de l'injure (57).

Suite à une insulte endovasculaire mécaniquement causée par un fil de métal, Tanaka *et al.* ont trouvé un nombre significatif de cellules de la néointima et de la média provenant de la moelle osseuse (57). Ce modèle d'insulte vasculaire cause la dénudation complète de l'endothélium ainsi que l'apoptose des cellules médiales (57). À l'opposé, lorsque la lésion est induite le remplacement des menottes périvasculaires (perivascular cuff replacement), peu de cellules proviennent de la moelle osseuse (57). Similairement, peu de cellules néointimales proviennent de la moelle osseuse lorsque l'artère carotide est ligaturée (57). Dans ces deux derniers modèles, les cellules endothéliales et médiales demeurent relativement intactes en exprimant peu de MCP-1, SDF-1 et VEGF (57). Les résultats de ces études suggèrent que le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse au site de remodelage vasculaire implique l'inflammation vasculaire et que plus l'insulte est sévère, plus les cellules dérivées de la moelle osseuse contribuent à la néointima (57).

3.1 Caractérisation des MSC et leur potentiel immunologique

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) se distinguent par leur capacité de différenciation en différents types cellulaires. Elles proviennent de la moelle osseuse, du périoste de l'os et du tissu adipeux (58). Elles contribuent à la régénération des os, du cartilage et du stroma de la moelle hématopoïétique (58). Lorsqu'elles sont cultivées dans les conditions appropriées *in vitro*, elles se différencient classiquement en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (59). Elles possèdent également le potentiel de différenciation en cellules musculaires lisses et en cellules endothéliales, deux types cellulaires particulièrement importants dans la réparation vasculaire et la formation de néointima (60, 61). En culture cellulaire, elles adhèrent au plastique. Elles expriment une panoplie de marqueurs, aucun n'étant spécifique aux MSC, tels que CD105, CD73 ET CD90 et elles sont négatives pour les marqueurs hématopoïétiques CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a, CD19 et HLA-DR (62).

L'observation de variations au niveau de l'expression des marqueurs peut être expliquée par l'origine tissulaire des cellules, la méthode d'isolation et de culture ainsi que les différences entre espèces (62).

Les MSC sont décrites dans la littérature comme non-immunogéniques (MHC I⁺, MHC II⁻, CD40⁻, CD80⁻, CD86⁻) et donc leur transplantation chez un receveur allogénique ne nécessite pas d'immunosuppression (62). Comme les MSC ne possèdent pas les molécules co-stimulatrices nécessaires à l'activation des cellules T, plusieurs équipes ont démontré que les MSC possèdent des propriétés immunosuppressives indépendantes de la compatibilité des MHC entre les cellules T et les MSC (63, 64). Certaines données semblent démontrer que le contact direct entre les cellules est nécessaire pour l'activité suppressive des MSC (65), alors que d'autres ont démontré que cette activité semble provenir des facteurs solubles (64, 66). Il a aussi été constaté que les MSC diminuent la maturation et les fonctions des cellules dendritiques et qu'elles inhibent, *in vitro*, la prolifération des lymphocytes B, leur différenciation et leur chimiotactisme (67-70).

Il n'y a pas que le mécanisme immunosuppresseur des MSC *in vitro* qui soit sujet de désaccord; les études *in vivo* qui tentent de démontrer le potentiel immuno-modulateur des MSC le sont aussi. L'administration de MSC provenant de babouins chez d'autres babouins MHC incompatibles et immunocompétents prolonge la survie de greffon de peau (63). De plus, des MSC injectées suite à une transplantation hématopoïétique allogénique améliore la survie du greffon (71). Aussi, l'injection systémique de MSC murines à des souris souffrant d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (un modèle de sclérose en plaque) résulte en l'amélioration notable des symptômes induite par la tolérance périphérique (72). Il semblerait donc que les MSC aient un effet thérapeutique grâce à leur effet immunosuppresseur. Cependant, un modèle murin d'arthrite induite par le collagène (un modèle établi d'arthrite rhumatoïde) explore les effets des MSC sur la progression de la maladie : aucun bénéfice n'est observé chez les souris recevant des MSC, au contraire, la réponse des lymphocytes T auxiliaires est accentuée (73). De plus, des expériences *in vitro* démontrent que le facteur de nécrose α (TNF α) à lui seul est capable de renverser les effets immunosuppresseurs des MSC sur la prolifération des cellules T (73). Plus récemment en rejet aigu du rein chez le rat, une équipe a démontré que l'utilisation des MSC conjointement avec la darbopoïétine, une forme

synthétique de l'érythropoïétine, améliore la capacité rénale suite au rejet aigu induit par l'ischémie (74). Ces résultats paradoxaux sur le rôle direct ou indirect des MSC sur l'immuno-modulation suggèrent qu'elles n'induisent pas le rejet aigu, mais pourraient participer aux phénomènes de remodelage vasculaire caractéristiques du rejet chronique.

3.2 Mécanismes d'intégration des MSC au site d'injure vasculaire

Afin d'intégrer la néointima, les MSC doivent migrer vers l'espace sous-endothélial et survivre dans un environnement hostile. Les mécanismes qui sous-tendent la migration des MSC et leur intégration au site d'injure vasculaire sont encore obscurs. Il semble que les tissus atteints expriment des récepteurs spécifiques ou des ligands qui permettent la circulation, l'intégration et l'infiltration des MSC au site d'injure (62). Les MSC sont capables de se mobiliser dans la circulation sanguine en réponse à des injures telles qu'une brûlure aiguë, une injure musculo-squelettique ou en réponse à l'hypoxie (75-77). Le LG3, fragment C-terminal du perlécan, induit un phénotype anti-apoptique des MSC en augmentant l'expression de Bcl-xL, une protéine inhibitrice de l'activation des caspases (78).

L'apoptose des CVML de la média, caractéristique de la vasculopathie du greffon, induit la sécrétion du facteur SDF-1 α (Stromal-cell Derived Factor 1 α) par les cellules viables avoisinantes ce qui promeut le recrutement et la prolifération des MSC (79). Il semble que, tout comme les leucocytes, les MSC expriment des récepteurs chimiokines en plus d'exprimer certaines molécules impliquées dans la migration des leucocytes, mais les résultats sont variables (62). Le récepteur CXCR4, étudié sur les MSC humaines, est présent sur moins de 1% des MSC étudiées alors que de hauts niveaux intracellulaires ont été observés (83-98%) (80). Une autre équipe a rapporté observer l'expression des récepteurs CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5 ET CCR10 (CXCR4 absent) et ces récepteurs sont capables d'induire la migration des MSC (81). D'autres ont observé l'expression de CCR2, CCR3, CCR4 et CXCR4 chez les MSC et ont démontré que le TNF α augmente l'expression de ces récepteurs sauf CXCR4 (82). Ainsi, les MSC peuvent exprimer plusieurs récepteurs de chimiokines comme le démontrent les études citées ci-haut. L'hétérogénéité de l'expression des MSC peut provenir de l'hétérogénéité des cultures des MSC, qui est caractéristique de ces cellules (62). Ces résultats

suggèrent tout de même un potentiel d'intégration tissulaire important, ces récepteurs de cytokines étant impliqués dans le chimiotactisme et la migration cellulaire (62).

Plusieurs molécules impliquées dans l'attachement, le roulement, l'adhésion et la transmigration des leucocytes de la circulation vers le tissu sont exprimées chez les MSC (62). Les intégrines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ et les molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3, ALCAM, et CD105 (endogline) sont exprimées chez les MSC. P-sélectine et VCAM-1 sont fonctionnellement importantes pour la migration des MSC vers l'endothélium (83). Toutefois, les MSC n'expriment pas CD31, molécule importante pour la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium (83). De plus, L-sélectine n'est pas exprimée chez les MSC et le rôle d'E-sélectine n'a pas encore été exploré chez les MSC, deux molécules importantes pour le roulement des leucocytes (83). Certaines similitudes des mécanismes existent entre les leucocytes et les MSC, mais des différences spécifiques subsistent et restent à être élucidées.

3.3 Rôle d'ERK1/2 dans la formation de néointima et sur le phénotype anti-apoptotique des MSC

ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) est une kinase faisant partie de la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase) qui contrôle plusieurs processus cellulaires fondamentaux comme la prolifération, la survie, la différenciation, l'apoptose, la migration et la réponse au stress (84). L'activation de la cascade de signalisation ERK1/2 se fait principalement à la membrane plasmique via plusieurs récepteurs tels que les récepteurs tyrosine kinase (85), les récepteurs couplés à la protéine G, les canaux ioniques et l'intégrine $\beta 1$ (41, 78, 84). Ces récepteurs transmettent leur signal en recrutant des protéines à la membrane, par exemple Grb2, et des facteurs d'échanges, comme SOS, qui peuvent activer Ras à la membrane plasmique ou à la membrane d'autres organelles (84). Lorsqu'activé, Ras est lié au GTP et émet un signal à une protéine de la famille des Rafs (MAPKKK : Raf-1, B-Raf, A-Raf) qui peuvent ensuite phosphoryler MEK1/2 (MAPKK) qui phosphoryle à son tour ERK (MAPK) (84). ERK phosphoryle alors de nombreux substrats à la fois dans le cytosol, le noyau ainsi que dans des compartiments membranaires pour induire les nombreuses fonctions de cette voie de signalisation (84).

L'activation de la voie ERK1/2 est impliquée dans la formation de néointima dans l'athérosclérose ainsi que dans le dommage vasculaire mécanique. Cette voie régule la prolifération, la survie, la différenciation et la migration des cellules impliquées dans la formation de néointima (86). *In vitro*, des cellules endothéliales endommagées sécrètent rapidement le facteur FGF-2 qui active la voie ERK1/2 ce qui résulte en la migration des cellules endothéliales vers la zone dénudée (86). Dans plusieurs modèles de dommage vasculaire, l'inhibition de cette voie, en utilisant un inhibiteur biochimique sélectif (PD0185625), à l'aide de dominants négatifs ou à l'aide d'oligonucléotides antisenses, diminue la formation de néointima (86-89). Deux études dans des modèles de vasculopathie du greffon montrent que l'inhibition de la voie ERK1/2 à l'aide d'oligonucléotides antisenses diminue également la formation de néointima (90, 91), en plus de démontrer que ce traitement diminue le nombre de cellules positives pour l' α SMA dans la néointima *in vivo* et *in vitro* (91).

L'équipe du Dr Hébert étudie la mort cellulaire par apoptose des cellules impliquées dans la formation de néointima. *In vitro*, il a été démontré que l'activation de la voie ERK1/2 favorise l'augmentation de l'expression de Bcl-xL chez les CVML ce qui inhibe l'apoptose (92). Plus récemment, il a été démontré que l'activation des intégrines β 1 par le LG3 active la voie ERK1/2, qui coopère avec la voie de l'EGF (Epithelial Growth Factor) activée par la liaison de l'EGF à son récepteur pour augmenter les niveaux protéiques de Bcl-xL et diminuer le clivage de l'ADP-ribose polymérase résultant en une diminution de l'apoptose des MSC (78). De plus, *in vitro* le LG3 induit la migration des CVML de rats et humaines de façon ERK1/2-dépendante (41). Dans un modèle *in vivo* de transplantation d'allogreffe aortique orthotopique, l'équipe du Dr Hébert a démontré qu'ERK1/2 est présent dans la néointima aortique de greffons de 3 et 9 semaines post-transplantation (41). La voie ERK1/2 aurait donc un rôle central dans le développement de la néointima dans le dommage vasculaire par ses effets sur la migration et la survie des CVML et MSC de la néointima.

4 Matrice extracellulaire et membrane basale vasculaire

La matrice extracellulaire (MEC) occupe l'espace extracellulaire et forme un réseau complexe composé de protéines et polysaccharides variés sécrétés localement. La MEC est hautement organisée et associée aux surfaces cellulaires des cellules qui la produisent (93).

4.1 La matrice extracellulaire vasculaire

La MEC vasculaire est composée de fibres de collagène et de fibres élastiques intégrées à un gel visqueux composés de protéoglycans, d'acide hyaluronique, de glycoprotéines et d'eau (94). Ces composantes interagissent pour former un réseau de polymère bio-mécaniquement actif : il transmet la force, l'élasticité, la compressibilité, et la viscoélasticité aux parois vasculaires. De plus, ce réseau interagit avec les cellules vasculaires et participe à la régulation de l'adhésion, de la migration et de la prolifération cellulaire. Cette régulation implique les interactions moléculaires qui gouvernent l'attachement des cellules vasculaires aux composantes spécifiques de la MEC, leur détachement de ceux-ci, et le remodelage de la MEC qui permet aux cellules leur changement de conformation pendant la mitose et la migration (94). En outre, les composantes de la MEC vasculaire peuvent lier les protéines plasmatiques, facteurs de croissance, cytokines et enzymes; ces interactions modulent des événements clés de la physiologie vasculaire.

La composition de la MEC est contrôlée par la régulation coordonnée et différentielle de la synthèse et du renouvellement des composantes. Il y a donc des différences dans la composition de la MEC vasculaire durant le développement, entre les différents lits vasculaires et dans les différentes formes de maladies vasculaires (94). La MEC de l'intima est riche en protéoglycans et en acide hyaluronique ce qui lui confère sa compressibilité et sa viscoélasticité. Quant à elle, la MEC de l'adventice est riche en collagène fibrillaire ce qui lui donne sa rigidité. Le maintien de l'équilibre des composantes de chaque couche vasculaire est critique afin de maintenir l'intégrité vasculaire.

4.1.1 Le collagène

La famille des collagènes comprend au moins 19 types de protéines génétiquement distinctes classifiées selon leurs différentes compositions en acide aminé et la proportion de molécules

qui participent à la formation de la triple hélice (94). Les principaux types de collagènes qui ont été identifiés dans des vaisseaux sanguins sains et malades sont : I, III, IV, V, VI et VIII. Les types I et III, qui se retrouvent environ dans 80 à 90% de tous les vaisseaux sanguins sont organisés en faisceaux fibrillaires distincts (94).

La principale source de collagène de l'intima et de la média est la cellule vasculaire musculaire lisse (CVML). La modulation de la synthèse de collagène par ces cellules accompagne souvent un changement phénotypique. La cellule quiescente ou contractile d'un vaisseau normal devient synthétique ou proliférative et sécrète alors le collagène de type I, ce qui est caractéristique d'un phénotype athérotrombotique (94). Plusieurs facteurs extrinsèques peuvent réguler la synthèse de collagène par les CVML, tels que des facteurs de croissance, des cytokines et la MEC qui entoure ces cellules (94). Les cytokines et les facteurs de croissance augmentent généralement la synthèse du collagène type I, III et V; le TGF- β (transforming growth factor β) étant le facteur le plus puissant (94). Les CVML résident dans la média des vaisseaux sanguins, entourées de molécules de collagène. Ces dernières participent en tant que protéines d'attachement aux CVML en plus d'influencer leur comportement cellulaire.

Les cellules endothéliales sont capables d'exprimer les gènes codant pour les types I, III, IV et VIII qui peuvent aussi influencer leur comportement cellulaire. Le collagène est reconnu pour avoir un rôle dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (angiogénèse) (94).

4.1.2 Les fibres élastiques

Les fibres élastiques constituent une composante structurale importante de la MEC vasculaire. Elles assurent le support longitudinal et circonférentiel aux vaisseaux. Ensemble avec les fibres de collagènes, elles donnent la force et l'élasticité nécessaires afin d'accommoder les changements de pression sanguine ainsi que les changements hémodynamiques (94). La structure de la fibre élastique est composée d'une sous-unité de tropoélastine hydrophobique associée à des glycoprotéines hydrophiles et des enzymes responsables de la liaison des peptides d'élastine. La synthèse de l'élastine se fait en majorité durant les phases de croissance prénatale et postnatale précoce. La cellule musculaire lisse artérielle est la principale source de

production (95). En absence de pathologie artérielle, l'élastine est très stable et dure longtemps; il n'y a d'ailleurs que très peu de renouvellement de l'élastine chez l'adulte (94).

Les fibres élastiques forment des lamelles concentriques qui séparent les différentes couches vasculaires. En plus de former une barrière entre chaque couche de CVML du vaisseau, les lamelles élastiques séparent l'intima de la média (lamelle élastique interne) ainsi que la média de l'adventice (lamelle élastique externe).

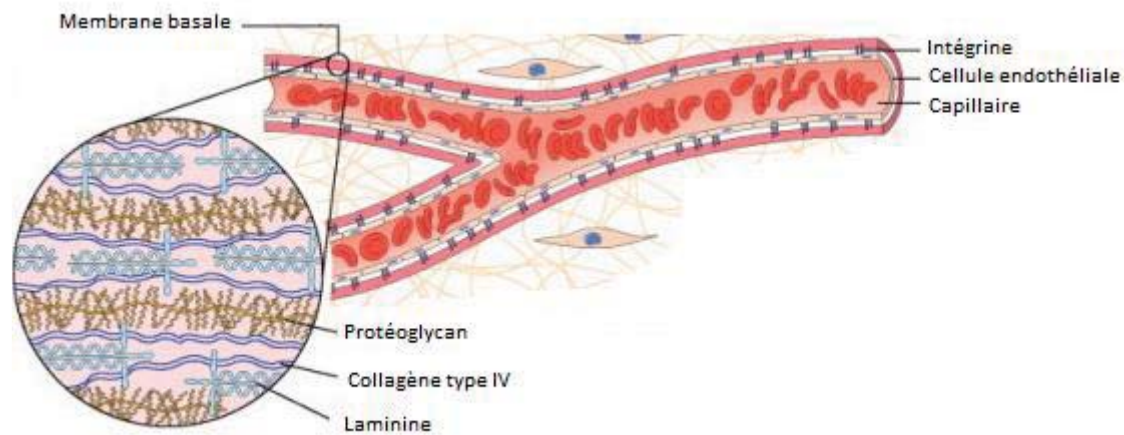
4.1.3 Les protéoglycans

Les protéoglycans sont des polysaccharides qui partagent une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycans (GAG) attachées de façon covalente à une glycoprotéine centrale (94). Les chaînes de GAG sont des polymères linéaires qui sont formés de la répétition de disaccharides qui contiennent une hexosamine et soit un carboxylate ou soit un sulfate d'ester ou les deux (94). Règle générale, les GAG n'existent pas sous leur forme libre non liée dans les tissus, mais plutôt attachés à une glycoprotéine centrale pour former des familles de protéoglycans (94). L'exception est l'hyaluronan, ou l'acide hyaluronique, qui est un GAG qui s'auto-polymérise dans la MEC. Les protéoglycans sont des molécules hydrophiles qui interagissent avec plusieurs molécules de la MEC dans l'espace interstitiel afin de créer la viscoélasticité et la turgescence tissulaire (94). Ces macromolécules participent à la régulation de la perméabilité vasculaire, au métabolisme lipidique, à l'hémostase et à la thrombose (94). Les protéoglycans vasculaires sont retrouvés à quatre endroits : dans la MEC interstitielle, dans la membrane basale, dans la membrane cellulaire et à l'intérieur des cellules. Les protéoglycans retrouvés dans chacun de ces endroits partagent des caractéristiques structurales communes qui partiellement déterminent leur rôle à ces endroits. Toutes les cellules vasculaires sont capables de synthétiser les protéoglycans bien que la source principale de synthèse soit la CVML (94).

4.2 La membrane basale vasculaire et le perlécan

La membrane basale est une forme spécialisée de la MEC. Elle permet la formation de microenvironnements : elle sert de barrière entre l'épithélium et le tissu conjonctif sous-jacent en plus de former l'appareil de filtration dans le glomérule du rein (7). Le maintien de la

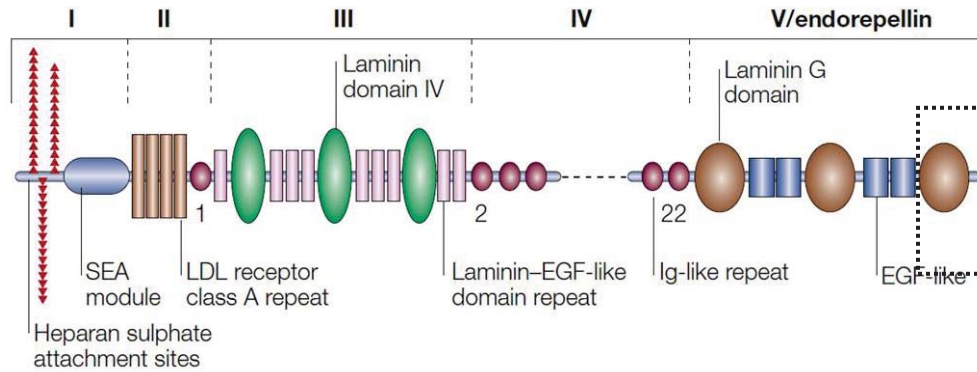
structure tissulaire repose sur la membrane basale. L'intégrité de celle-ci est essentielle afin d'organiser la régénération tissulaire (7). La membrane basale vasculaire est composée de collagène de type IV, de laminine et de protéoglycan (Figure 5) (7). La laminine est la glycoprotéine la plus abondante dans la membrane basale (94). Elle possède un domaine de liaison à la MEC et aux récepteurs de surface (7). Dans la membrane basale, elle forme des polymères avec le collagène de type IV générant des réseaux serrés. Elle peut aussi jouer au niveau de l'attachement cellulaire avec les substrats du tissu conjonctif (7).



Kumar: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, Professionnal Edition, 8th edition 2009

Figure 5 - La membrane basale et ses composantes

Le perlécan, le protéoglycan le plus abondant de la membrane basale, fait partie de la famille des protéoglycans héparans sulfates (HSPG) (96). Il interagit avec les composantes de la membrane basale et contribue à la perméabilité de celle-ci, sert de substrat aux cellules vasculaires et retient les facteurs de croissance impliqués dans le remodelage vasculaire et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (96). Il est présent dans la membrane basale des couches intima et média. Il est composé de cinq domaines distincts (Figure 6).



Iozzo RV. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(8):646-56

Figure 6 - Le perlécan et ses 5 domaines distincts

Ig : immunoglobulin ; EGF : epidermal growth factor ; LDL : low-density lipoprotein ; SEA : sperm, enterokinase, agrin homology. Le fragment C-terminal LG3 est encadré en pointillé.

D'abord isolé d'une tumeur murine Engelbreth-Holm-Swarm, il a ensuite été identifié dans toutes les membranes basales ainsi que les tissus du mésenchyme et conjonctif (97). La protéine centrale de 467 kDa consiste en cinq domaines, chacun partageant une homologie avec d'autres molécules impliquées dans le métabolisme des nutriments, dans la prolifération cellulaire et dans l'adhésion incluant les laminines, les récepteurs à faible densité lipoprotéiques (LDL), le facteur de croissance épidermal (EGF) et la molécule d'adhésion cellulaire neurale (N-CAM) (97).

Suite aux procédés protéolytiques et l'activité d'épissage alternatif, des fragments de la protéine centrale sont générés et sont actifs biologiquement (97). En effet, bien que le perlécan complet ait une activité angiogénique en liant des molécules angiogéniques (97); l'endorepelline a, quant à elle, une activité anti-angiogénique (98). L'endorepelline est le cinquième domaine du perlécan. Ce domaine de 85 kDa en C-terminal du perlécan contient trois domaines globulaires similaires à la laminine (LG) séparés par deux répétitions similaires à l'EGF (96). Il a été démontré que l'endorepelline inhibe l'adhésion de plusieurs types cellulaires en plus d'inhiber la migration des cellules endothéliales, la formation de tubules à

l'intérieur d'une matrice de collagène de type I ainsi que l'angiogénèse de la membrane chorioallantoïque chez le poulet (98). L'interaction du fragment C-terminal de l'endorepelline nommé LG3 avec le récepteur intégrine $\alpha 2\beta 1$ entraîne le désassemblage des fibres de stress d'actine et des foci d'adhésion chez les cellules endothéliales *in vitro* (99). La cathepsin-L a été identifiée comme protéase pouvant cliver le domaine cinq du perlécan, générant ainsi un fragment C-terminal LG3 de 23kDa (encadré en pointillé sur la figure 5) (34). En plus de la cathepsin-L, la protéine BMP-1 (pour bone morphogenetic protein-1), une métalloprotéase, est capable de cliver le fragment LG3 à partir de l'endorepellin recombinante ainsi que cliver le fragment LG3 du perlécan endogène de cellules murines et humaines *in vitro* (100).

Le fragment LG3 est biologiquement actif sur les fibroblastes, les CVML et les MSC. Il interagit avec les récepteurs intégrines $\alpha 2\beta 1$ sur les fibroblastes pour induire un phénotype anti-apoptotique de façon Src-dépendante et pyk2-dépendante (101). Il a aussi été démontré qu'il interagit avec les intégrines $\beta 1$ sur les MSC (78) et sur les CVML (41) pour induire l'augmentation de Bcl-xL et ainsi induire un phénotype anti-apoptotique. De plus, l'injection intraveineuse du LG3 recombinant suite à une transplantation d'allogreffe chez la souris augmente significativement la formation de néointima et le nombre de cellules positives pour α SMA dans celle-ci (41).

Ces résultats corrélerent avec les observations cliniques du rôle du LG3 dans le rejet vasculaire. Il a été démontré que chez les patients transplantés rénaux ayant un rejet vasculaire aigu, les niveaux de LG3 sériques sont élevés par rapport aux patients ayant une fonction rénale normale ou avec un rejet tubulo-interstitiel (41). Ces niveaux élevés de LG3 sérique corrélerent avec une faible survie d'allogreffe à long terme (41). De plus, O'Riordan *et al.* ont démontré que la vasculopathie du greffon est associée à l'augmentation de la dégradation du perlécan et de l'excrétion urinaire de ses fragments, tel que le LG3, suggérant que le LG3 est un marqueur urinaire de rejet chronique (102). Les niveaux urinaires de LG3 ne sont pas seulement associés à un rejet chronique, mais aussi à des maladies glomérulaires rénales. Dans la néphropathie à IgA, une maladie auto-immune attaquant les reins, Surin *et al.* ont démontré une diminution significative des niveaux de LG3 urinaires chez les patients atteints de cette maladie; la

relation entre le LG3 et la filtration glomérulaire étant inverse (103). Leurs résultats suggèrent que le fragment LG3 de l'endorepellin peut être associé à la sévérité de la néphropathie à IgA et qu'il pourrait être impliqué dans la pathogénèse de cette maladie (103).

4.3 Le remodelage de la matrice extracellulaire dans la vasculopathie du greffon

Le remodelage de la MEC est observé dans la vasculopathie du greffon (104). En plus d'agir comme support physique pour les cellules, la MEC participe directement à la réparation d'une plaie, à la protection ainsi qu'aux événements de signalisation induisant la prolifération cellulaire, la migration et l'apoptose (105). Les sites matricryptiques sont des sites biologiquement actifs sur des protéines et des GAG de la MEC qui ne sont pas «exposés» ou «disponibles» lorsque ces molécules sont sécrétées dans la MEC (106). Ces sites deviennent actifs seulement lorsque la conformation structurale est modifiée. Les matricryptines sont le plus souvent produites par dégradation enzymatique. Un exemple de fragment matricryptique est le fragment LG3; il provient de la dégradation du protéoglycan perlécan et clivé, il a une activité propre qui diffère de celle de la protéine d'où il origine (41). Le collagène, la fibronectine et les fragments d'élastine peuvent stimuler directement la migration cellulaire des leucocytes, influencer la prolifération cellulaire, induire le désassemblage des adhésions focales en plus d'induire la vasodilatation artériolaire (106, 107).

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont les principales enzymes qui dégradent la MEC. Elles forment une famille de protéases dépendantes du zinc qui sont capables de dégrader les composantes de la MEC tels que le collagène, la laminine, la fibronectine ainsi que des facteurs de croissance et des récepteurs cellulaires (105). Elles sont sécrétées sous leur forme inactive pro-enzymatique et doivent donc être clivées en N-terminal afin d'être activées (108). Puisque leur activité de dégradation est importante, la régulation de leur expression et leur activation se fait à plusieurs niveaux : transcription génique, modification post-transcriptionnelle, activation protéolytique et l'interaction avec des inhibiteurs circulants spécifiques pour limiter leur activité (108).

Les MMP jouent un rôle dans l'hyperplasie intimale et le remodelage constrictif suite à une injure artérielle, notamment lorsque le dommage endothélial résulte d'une angioplastie ou d'un pontage aortocoronarien (108). Dans un modèle d'injure artérielle, les souris n'ayant pas de MMP-9 développent moins de néointima. De plus, MMP-2 dérivé de plaquettes joue un rôle dans le développement de la thrombose suite à une injure artérielle (109).

L'augmentation de la perméabilité vasculaire lorsque l'endothélium est endommagé cause le recrutement de protéines dérivées du plasma dans la MEC telles que la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène (110). De plus, les cellules présentes au site d'injure synthétisent et/ou sécrètent de nouvelles composantes de la MEC incluant l'ostéoponine, SPARC, la thrombosponine et la ténascine afin de réguler la réparation tissulaire (107). En outre, les protéines présentes dans la MEC peuvent contenir des sites cryptiques biologiquement actifs (matricryptiques) qui peuvent être important pour la signalisation (106, 107).

Le tableau 2 résume de façon non-exhaustive les molécules ayant une activité matricryptique, leurs fonctions natives (de la protéine non-clivée) ainsi que leurs activités une fois les fragments matricryptiques générés (106, 107, 111) .

Tableau 2 - Matricryptines des molécules de la matrice extracellulaire

Molécule	Fonctions natives	Fonctions du fragment matricryptique
Laminine	Inhibition de la formation de vaisseau	Augmentation mobilité tumorale et adhésion cellulaire
Collagène type XVIII (endostatine)	Structure de la membrane basale	Inhibiteur d'angiogénèse
Fibrine/Facteur I	Coagulant	Polymérisation de la fibrine; augmentation de la perméabilité vasculaire
Perlécane	Liaison des composantes de la MEC (attachement)	Inhibition de l'angiogénèse; activité angiostatique (endorepelline et LG3); résistance à l'apoptose (LG3)

5 Récepteurs intégrines et signalisation en aval de leur activation

Les cellules sécrètent la MEC, l'organisent et la dégradent. Mais la MEC influence aussi les cellules à son tour, principalement via des membranes transmembranaires d'adhésion qui jouent le rôle de récepteur. Ces récepteurs ancrent la cellule dans sa MEC, mais leur rôle est beaucoup plus important que cette simple tâche passive d'attachement : la cellule reçoit des signaux externes provenant de la MEC ou autre qui affectent son comportement (93). Plusieurs molécules peuvent servir de récepteur ou co-récepteur tels que les protéoglycans transmembranaires. Toutefois, les intégrines sont les récepteurs principaux médiant l'attachement aux protéines de la MEC (93). Les membres de cette grande famille de récepteurs transmembranaires dimériques homologues ont une capacité exceptionnelle à transmettre les signaux tant à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur. Les intégrines sont non seulement capable de transmettre un signal mécanique et moléculaire, mais aussi de convertir l'un vers l'autre type de signal (93).

5.1 Les intégrines et la migration cellulaire

Il existe 24 intégrines chez l'humain, toutes composées de 2 sous-unités glycoprotéiques liées de façon non-covalente appelées α et β (93). Le tableau 3 énumère différentes familles d'intégrines formées par la liaison de la sous-unité $\beta 1$ à une sous-unité α (93). Les 2 sous-unités traversent la membrane basale : elles ont un domaine C-terminal intracellulaire court et un domaine N-terminal extracellulaire long. La portion N-terminale du dimère lie les séquences d'acides aminés spécifiques à leur ligand. Les ligands peuvent être soit des protéines de la MEC comme les laminines ou la fibronectine, soit des ligands à la surface des cellules avoisinantes (93). Le domaine intracellulaire est responsable de la transduction du signal ou de l'attachement au cytosquelette. La liaison du domaine extracellulaire engendre la liaison de ligands spécifiques à l'intérieur de la cellule.

Tableau 3 - Familles d'intégrines comprenant la sous-unité $\beta 1$

Récepteur de collagène	$\alpha 1\beta 1$
	$\alpha 2\beta 1$
	$\alpha 10\beta 1$
	$\alpha 11\beta 1$
Récepteur spécifique leucocytaire	$\alpha 4\beta 1$
	$\alpha 9\beta 1$
Récepteur de laminine	$\alpha 3\beta 1$
	$\alpha 6\beta 1$
	$\alpha 7\beta 1$
Récepteur séquence RGD	$\alpha 5\beta 1$
	$\alpha 8\beta 1$

Pour que la migration cellulaire puisse avoir lieu, il faut que les attachements cellule-MEC soit défait et refait de façon rapide et coordonnée. De plus, une force doit être appliquée là où c'est nécessaire : la création et le désassemblage des attachements extracellulaires doivent être couplés à l'assemblage et au désassemblage des protéines du cytosquelette intracellulaire (93).

La base du phénomène dynamique est la régulation allostérique : lorsqu'une intégrine lie son ligand, des changements de conformation ont lieu ce qui influence les domaines intra et extracellulaires. Lorsqu'inactifs, les domaines α et β extracellulaires de l'intégrine sont repliés et adhèrent entre eux (93). Lorsque les domaines extracellulaires se déplient lors de la liaison au ligand, leur contact est défait et les domaines intracellulaires se séparent permettant la liaison active à la taline. Cette liaison permet l'assemblage de filaments d'actine liés aux intégrines pour qu'une force puisse être induite au site d'attachement.

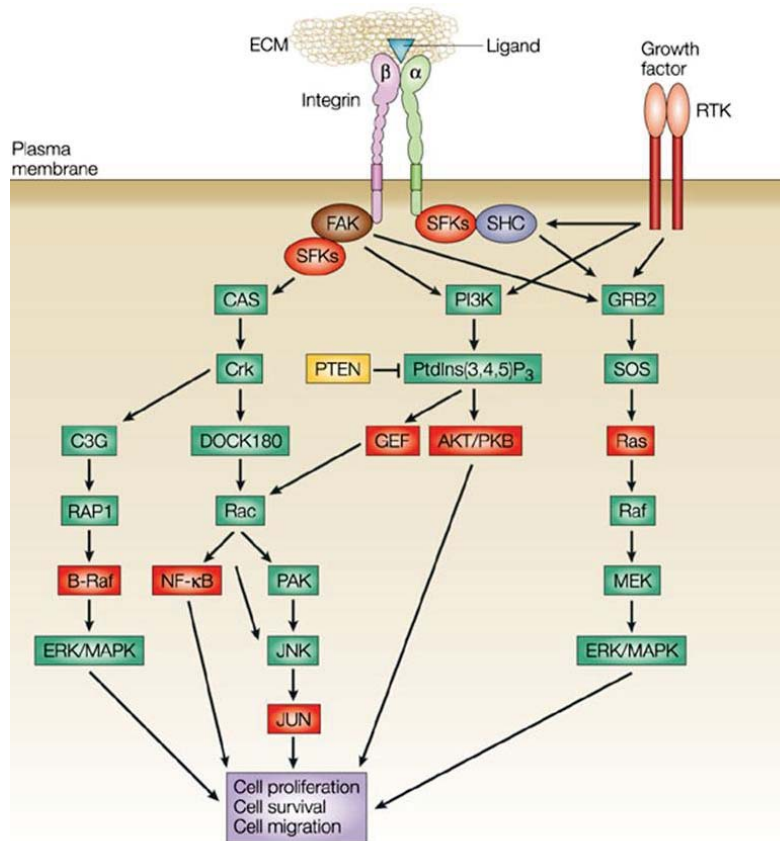
Des molécules intracellulaires, telle que PIP2 produite suite à un signal extracellulaire via le récepteur couplé à la protéine G (GPCR) ou un récepteur tyrosine kinase, peuvent contrôler l'activation des intégrines (93). Tel que mentionné précédemment, le LG3, fragment du protéoglycan perlécan, agit sur les intégrines $\alpha2\beta1$ pour induire un phénotype anti-apoptotique chez les fibroblastes (101), les MSC (78) et les CVML (41) et sur les intégrines $\beta1$ pour induire la migration cellulaire chez les CVML (41). C'est également le fragment C-terminal LG3 qui confère l'activité biologique au domaine cinq du perlécan, l'endorepelline (96). L'interaction du fragment C-terminal de l'endorepelline, LG3, avec le récepteur intégrine $\alpha2\beta1$ entraîne le désassemblage des fibres de stress d'actine et des foci d'adhésion chez les cellules endothéliales *in vitro* (99). Elle inhibe également l'adhésion de plusieurs types cellulaires en plus d'inhiber la migration des cellules endothéliales, la formation de tubules à l'intérieur d'une matrice de collagène de type I ainsi que l'angiogénèse de la membrane chorioallantoïque chez le poulet (98).

5.2 La signalisation cellulaire en aval de la liaison du ligand

Les signaux d'intégrines régulent la protrusion et l'adhésion des cellules en migration (112). Ces signaux proviennent de l'adhésion et des molécules chimioattractantes qui sont détectées dans les régions de protrusions cellulaires. Les multiples signaux présents convergent généralement vers les Rho GTPases telles que Rac, Rho et Cdc42 (112). En revanche, les cibles de ces Rho GTPases sont des régulateurs de la polymérisation de l'actine (complexe Arp2/3 et les formines), du désassemblage de l'actine (cofiline et kinase LIM), de l'activation ou l'inactivation de la myosine II (chaînes légères de myosine II, phosphatases et kinases) et de la dynamique des microtubules (113-116). Par exemple, lorsque les RhoGTPases sont

activées, elles peuvent activer ROCK (protéine kinase associée à Rho) qui elle active la myosine II en phosphorylant les chaînes légères et en inhibant les phosphatases des chaînes légères (112).

Le renouvellement des adhésions focales dans les protrusions est régulé par les kinases d'adhésion focale (Focal Adhesion Kinase FAK) et par les tyrosines kinases Src (117). La signalisation de FAK et/ou Src est en amont des Rho GTPases qui régulent l'adhésion et l'organisation de l'actine. L'inhibition de FAK à l'aide de dominants négatifs, d'inhibiteurs biochimiques et de shRNA chez des cellules endothéliales humaines diminue leur prolifération et leur migration (118). La signalisation de FAK et/ou Src active la Rho-GAP p190, ce qui diminue l'activité de Rho et qui recrute un complexe protéique incluant Rac et PAK. Cela a pour effet d'augmenter le renouvellement des adhésions et donc induire la migration (119). La figure 7 récapitule les protéines de signalisation en aval des intégrines.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Nature Reviews Molecular Cell Biology 5, 816-826 (October 2004)

Figure 7 - Signalisation en aval des intégrines

5.3 Rôle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ en pathologie vasculaire : l'exemple de l'athérosclérose

La formation d'agrégats de plaquettes est essentielle pour l'hémostase normale suite à une injure vasculaire (120). Plusieurs études suggèrent que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est un médiateur important de l'adhésion des plaquettes au collagène à l'intérieur des vaisseaux (121). La formation d'agrégats est aussi responsable de la pathologie aiguë de l'infarctus du myocarde et de l'accident vasculaire cérébral (AVC) (120). Des modèles robustes pour étudier les procédés d'athérosclérose sont des modèles dans lesquels les gènes *APOE* ou *LDLR* sont inactivés. Les animaux déficients pour ApoE ou LDLR peuvent, selon leur diète et le temps d'évaluation, développer des lésions athérosclérotiques semblables à celles observées chez l'humain. Pour

bien cerner le rôle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ dans la pathogénèse de l'athérosclérose, le modèle $\alpha 2\beta 1^{-/-}$ a été jumelé au modèle ApoE $^{-/-}$ par l'équipe du Dr Zutter (120). L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ contrôle l'adhésion des plaquettes au collagène, ce qui mène à l'activation des plaquettes et subséquemment à la formation de thrombus (122, 123). Les résultats de l'équipe du Dr Zutter suggèrent que l'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ n'est pas nécessaire pour le développement de l'athérosclérose dans une souris sans injure vasculaire ayant une déficience pour le gène *APOE* (120). Ces résultats sont en accord avec les études qui démontrent que les intégrines $\alpha 2\beta 1$ ne sont pas nécessaires pour la formation de thrombus et d'embolus pulmonaire suivant l'injection intravasculaire de collagène (121). En revanche, dans un modèle d'injure endothéliale de la carotide, l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ joue un rôle central dans la thrombose à l'interface du vaisseau sanguin sous des conditions de flux sanguins (121). Effectivement, les souris déficientes pour $\alpha 2$ développent l'occlusion artérielle deux fois plus lentement que les souris sauvages. L'analyse des carotides démontrent que l'initiation des thrombus se fait normalement dans les deux souches de souris, alors que les thrombus sont moins stables ou se développent moins rapidement chez la souris transgénique (121). Ainsi, l'adhésion ferme du collagène en présence d'une pression sanguine nécessite l'intégrine $\alpha 2\beta 1$. De plus, la liaison de l'intégrine au collagène doit se faire alors que ce dernier est non-circulant afin que le thrombus soit résistant au site d'injure (121).

5.4 Modèle murin déficient pour l'intégrine $\alpha 2$

L'utilisation d'un modèle animal murin offre plusieurs avantages en recherche; la souris possède 99% d'homologie génétique avec l'homme et permet l'isolation de variables afin de mesurer scientifiquement l'importance de gènes ou de protéines spécifiques. La souris déficiente pour la sous-unité de l'intégrine $\alpha 2$ a été générée par l'équipe du Dr Marie M Zutter à l'École de Médecine de l'Université de Washington au Missouri. Pour isoler le rôle de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ *in vivo*, ils ont créé une souris génétiquement modifiée dans laquelle l'expression de cette intégrine est complètement éliminée (124). La souris $\alpha 2\beta 1^{-/-}$ est viable, fertile et se développe normalement (124).

L'intégrine $\alpha2\beta1$ sert de récepteur au collagène sur les plaquettes et les fibroblastes ainsi que de récepteur à collagène et laminine sur les cellules endothéliales et épithéliales (124). Cette intégrine est impliquée dans une variété de procédés biologiques tels que le fonctionnement des plaquettes et l'hémostase (122, 123). Une littérature abondante suggère qu'*in vitro*, la liaison de $\alpha2\beta1$ dans l'épithélium rénal, pulmonaire, gastro-intestinal et mammaire participe à la signalisation de la morphogénèse des branchements (124). De façon intéressante, des expériences sur des cultures d'explants et sur des gels de collagène tridimensionnels ont démontré que l'intégrine $\alpha2\beta1$ joue un rôle au niveau de la migration des kératinocytes et de la contraction des fibroblastes pendant la réparation de plaie (125). En effet, la migration des kératinocytes $\alpha2^{-/-}$ est diminuée comparativement à celle des kératinocytes sauvages lors d'essais de migration *in vitro* (125). De plus, chez la souris déficiente pour $\alpha2\beta1$, l'augmentation de l'angiogénèse est observée lors d'expériences sur la guérison de plaies cutanées *in vivo* (125).

Le dommage vasculaire induit un remodelage de la MEC dans diverses pathologies telles que l'athérosclérose et le rejet vasculaire, ce dernier étant discuté dans ce mémoire. Le remodelage implique la dégradation localisée de molécules de la MEC par diverses enzymes; les leucocytes recrutés ainsi que les cellules de la paroi vasculaire peuvent produire de telles enzymes. Ce processus libère de nouveaux médiateurs, tel que le LG3 qui possède diverses activités biologiques participant à la formation de néointima. S'il est bien démontré que les cellules provenant du receveur jouent un rôle important dans le remodelage vasculaire, les mécanismes permettant la migration et l'intégration des cellules souches mésenchymateuses aux sites de néointima sont encore mal définis.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

1. Prémices

La vasculopathie du greffon est une forme progressive de vaso-occlusion de l'arbre vasculaire de l'organe transplanté qui résulte en l'ischémie et la perte de fonction du greffon à long terme (3, 21, 32). Cette pathologie est associée à une accumulation de cellules mononuclées positives pour l' α SMA et de matrice extracellulaire (41). Les niveaux sériques de LG3 sont élevés chez les patients ayant un rejet vasculaire aigu et ils sont associés à une faible survie du greffon à long terme (41). De plus, l'injection intraveineuse de LG3 recombinant dans un modèle de transplantation aortique orthotopique d'allogreffe augmente significativement la formation de néointima ainsi que le nombre de cellules positives pour α SMA (41). Le LG3 a été démontré comme fragment bioactif sur les fibroblastes, les cellules vasculaires musculaires lisses et les cellules mésenchymateuses, trois types cellulaires impliqués dans la formation de néointima (41, 78, 101). Ce fragment C-terminal interagit avec les intégrines α 2 β 1 sur les fibroblastes ainsi qu'avec les intégrines β 1 sur les cellules souches mésenchymateuses et les cellules vasculaires musculaires lisses pour induire un phénotype anti-apoptotique nécessaire à la survie des cellules dans un environnement hostile (41, 78, 101). Les protéines pyk2, Src, Fyn et PI3K ont été impliquées dans la signalisation en aval de l'interaction du LG3 avec les intégrines α 2 β 1 chez les fibroblastes (101). Par contre, chez les CVML et les MSC, le signal anti-apoptotique en aval des intégrines est indépendant de PI3K mais dépendant d'ERK1/2 (41, 78). Le LG3 facilite aussi la migration des CVML de façon ERK1/2-dépendante (41).

2. Hypothèse et objectifs

Étant donné l'importance connue de la migration pour l'accumulation de MSC menant à la formation de néointima durant le rejet d'allogreffe et la présence de taux sériques et/ou urinaires élevés de LG3 chez les receveurs d'allogreffe rénale présentant un rejet vasculaire, nous émettons l'hypothèse que le LG3 induit la migration et la transmigration des cellules souches mésenchymateuses du receveur de façon dépendante de la voie de signalisation

ERK1/2 ce qui contribue à l'intégration de ces cellules au site de néointima durant la vasculopathie du greffon.

Les objectifs de ma maîtrise étaient les suivants :

- 1) Caractériser l'importance des intégrines $\alpha2\beta1$, Src et ERK1/2 dans la migration et la transmigration des MSC exposées au LG3 *in vitro*
- 2) Définir l'importance des intégrines $\alpha2\beta1$ dans la formation de néointima induite par le LG3 *in vivo*

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Article

Titre : LG3 Regulates Mesenchymal Stem Cell Migration, Homing and Neointima Formation in Vascular Rejection

Auteurs : Pilon EA, Dieudé M, Qi S, Hamelin K, Durocher Y, Zutter M, Coutu D, Perreault C, Hébert MJ

Article en préparation pour une première soumission

Contribution des auteurs :

Eve-Annie Pilon a élaboré les hypothèses de travail avec Marie-Josée Hébert. Elle a planifié et réalisé les expériences de cet article. Elle a analysé et interprété les résultats générés. Enfin, elle a participé à la rédaction du manuscrit avec Marie-Josée Hébert.

Mélanie Dieudé a récolté les aortes lors des sacrifices des souris et a également participé l'élaboration de la stratégie expérimentales et à la correction du manuscrit.

Shijie Qi a réalisé les transplantations murines.

Katia Hamelin a contribué aux expériences in vivo ainsi qu'à la gestion et phénotypage des souris $\alpha 2^{-/-}$.

Yves Durocher a produit le LG3 recombinant.

Marie Zutter a fourni les souris génétiquement modifiées $\alpha 2^{-/-}$.

Daniel Coutu a enseigné la technique d'isolation de cellules souches mésenchymateuses murines et a participé à la caractérisation des cellules souches mésenchymateuses murines.

Claude Perreault a fourni les souris transgéniques pour la 'green fluorescent protein' (GFP).

Marie-Josée Hébert a dirigé et supervisé l'ensemble de ce travail, de la génération des hypothèses à la rédaction du manuscrit.

ABSTRACT

Rationale: Transplant vasculopathy (TV) is associated with neointimal accumulation of recipient-derived progenitor cells. Higher levels of circulating and urinary LG3, a C-terminal fragment of perlecan, are found in rejecting renal transplant patients and LG3 fosters vascular remodeling in a murine model of TV.

Objective: We aimed to evaluate whether LG3 regulates the migration and homing of mesenchymal stem cells (MSCs) and mediates the accumulation of recipient-derived neointimal cells.

Methods and Results: In vitro, mouse and human MSC showed increased horizontal migration and transmigration when exposed to LG3 in association with increased ERK 1/2 phosphorylation. Neutralising $\beta 1$ integrin antibodies or use of MSC from $\alpha 2$ integrin $^{-/-}$ mice were associated with decreases in migratory response to LG3 and in ERK 1/2 phosphorylation. Mice were transplanted with a fully-MHC mismatched aortic graft followed by intravenous injection of recombinant LG3 or vehicle. Increased intima-media ratios and neointimal accumulation of α -smooth muscle actin (SMA) positive cells were observed in LG3-injected recipients. When green fluorescent protein (GFP)-transgenic mice were used as recipients, LG3 injection favored neointimal accumulation of GFP $^{+}$ cells. To assess the importance of LG3/ $\alpha 2\beta 1$ integrin interactions in LG3-induced neointima formation, $\alpha 2^{-/-}$ or wild-type recipients of an allogeneic aortic transplant received intravenous LG3 injections for 3 weeks. Reduced intima-media ratios and decreased numbers of neointimal cells showing ERK 1/2 phosphorylation were found in $\alpha 2^{-/-}$ recipients.

Conclusion: These results highlight a novel role for LG3 in controlling migration and homing of MSCs and attracting recipient-derived α SMA positive cells to sites of immune-mediated vascular injury.

Key words: Transplant vasculopathy, mesenchymal stem cells, neointima, remodelling.

INTRODUCTION

Transplant vasculopathy (TV) is an obliterative form of vascular remodeling that represents a major cause of long-term allograft loss in most if not all types of transplanted organs¹. In TV, immunological injury and maladaptive repair processes concur to the accumulation of immune and α smooth muscle actin (α SMA) positive cells and extracellular matrix components within the vessel wall, resulting in progressive lumen narrowing^{1,2}. In the last decade, a growing body of evidence has delineated the importance of sub-endothelial accumulation of recipient cells for lumen narrowing in TV^{2,3}. In murine aortic and heart transplant models, α SMA-positive intimal cells included a large percentage of recipient-derived cells⁴⁻⁶. In human renal transplant patients with TV, recipient-derived cells were also shown to colonize the allograft and accumulate within the neointima^{7,8}. In TV, unlike other forms of vascular remodelling processes, bone-marrow derived mesenchymal stem cells (MSC) have been identified as an important neointimal cellular constituent^{2,5,9}. Mounting evidence suggests that sustained immunological attack resulting in persistent vascular cell death and inflammation are important triggers for recruitment and accumulation of recipient-derived progenitor cells in TV.

Mesenchymal stem cells (MSC) are adult multipotent cells found in the bone marrow, the bone periosteum and the adipose tissue¹⁰. They also have a broad capacity to differentiate *in vivo* into other cell lineages including α SMA positive cells and endothelial cells, two types of particular importance in neointima formation and vascular repair^{2,9,11}. Many studies indicate that MSC can mobilize into peripheral blood in response to injury^{2,12,13} and migrate from the blood across the endothelial monolayer and into tissues^{14,15}. The severity of vascular injury appears to play a central role for the recruitment of bone-marrow derived stem cells, the more severe the insult resulting in enhanced recruitment of bone-marrow derived MSC^{16,17}. Yet, the specific mediators that support homing and accumulation of recipient cells within a hostile and inflamed vascular environment still remain ill-characterized.

LG3 is a C-terminal fragment of perlecan released during vascular injury and endothelial apoptosis in association with extracellular matrix proteolysis^{1,18,19}. We and others have demonstrated increased circulating and urinary LG3 levels in renal transplant patients in

association with immune-mediated acute and chronic vascular injury and renal dysfunction²⁰⁻²². We also showed that increasing circulating LG3 levels in a murine model of TV through injection of recombinant LG3 leads to enhanced neointima formation²⁰. LG3 favours the acquisition of an anti-apoptotic phenotype in human MSC, which could contribute to their survival and accumulation at sites of vascular injury²³. Here we aimed at evaluating the function of LG3 in the regulation of migration and homing of MSC and recipient-derived α SMA+ cells during neointima formation in TV. We show that LG3 enhances homing and migration of MSC and neointimal accumulation of recipient-derived cells through α 2 β 1 integrin-dependent pathways leading to Src and ERK 1/2 activation.

METHODS

Cell Culture and Reagents

Human Mesenchymal Stem Cells (hMSC, Lonza, Allendale, NJ, USA) were grown in Mesenchymal Stem Cell Growth Medium Bulletkit (Lonza) and used at passages 3 through 7. Cells were seeded at 5,000 cells/cm² and passaged weekly or at 80% confluence whichever came first. Murine MSCs (mMSCs) from C57Bl/6 WT were obtained from Gibco (Invitrogen, Burlington, ON, CA), grown in α MEM (Gibco) with 10% FBS MSC-competent (Gibco) and used from passage 2 to 4. Murine MSCs were also obtained from C57Bl/6 WT or α 2 KO mice. These MSCs were isolated from the periosteal fraction of the bone marrow as described previously²⁴. Briefly, iliac and femur bones were collected from the animals and the periosteal fraction was digested with PBS 1X (Wisent, St-Bruno, QC, CA), 2% FBS (Gibco), Collagenase I (Sigma, Oakville, ON, CA), Collagenase II (Worthington, Lakewood, NJ, USA) and Dispase (Gibco) for an hour at 37°C. The digestion mixed was neutralized with complete medium and the periosteal fraction was centrifuged and washed from the digestion mix. These cells were grown in DMEM High Glucose (Wisent) with 10% FBS (Gibco) and 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen) supplemented with 5 ng/mL FGF-2 (Sigma) and 5 U/mL of sodium heparin (Pharmaceutical Partners of Canada Inc., Richmond Hill, ON, CA) was used as its co-factor. Cells were passaged at 5,000 cells/cm² weekly or at 80% confluence whichever came first. MSCs were cultured at 37°C with 5% CO₂. To confirm the pluripotency of hMSCs and mMSCs, we induced adipogenic and osteogenic differentiation, as described previously²⁵ (Supplementary Figure 1). The recombinant C-terminal perlecan fragment, LG3, was produced as described previously²³. Its purity and endotoxin levels were also assessed as described previously²⁰. The anti- β 1 integrin blocking antibody (clone 4B4) was purchased from Beckman Coulter (Mississauga, ON, Canada).

Assessment of Migration and Transmigration

Horizontal migration of confluent hMSC and mMSC was measured by an adapted wound assay as described before²⁰. Briefly, cells were incubated for 48 hours after the wounding at 37°C 5% CO₂, then fixed and stained with a Crystal Violet-30% Acetic Acid solution. RPMI (Gibco) was used as control for all experiments. Transmigration of hMSC and mMSC was

measured by a modified Boyden Chamber Assay (Costar plates, Fisher Scientific, Saint-Laurent, QC, CA). Cells were washed from complete medium, counted and resuspended in RPMI in top chambers. The bottom chambers contained the RPMI alone, with LG3 or PDGF-BB (Sigma). After 16 hours at 37°C 5%CO₂, membranes were stained with Hematoxylin Harris Modified (Sigma) and mounted on glass slides (Fisher Scientific) for light microscopy. For experiment in presence of biochemical inhibitors, PD98059 (Calbiochem/EMD Millipore, Billerica, MA, USA), or vehicle DMSO (Sigma) was loaded in the top chamber and transmigration assessed as described above.

Immunoblotting

Proteins were extracted, separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed as described before²⁶. Phosphorylated ERK1/2 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), phosphorylated Src (Cell Signaling), total Src (Upstate/EMD Millipore) were used as primary antibodies.

Animals and Aorta Transplantation Procedures

Aortas from BALB/c donors were transplanted into fully MHC-mismatched C57Bl/6 recipients as described elsewhere with minor modifications^{4,21}. In brief, prior to their resection, the aorta was clamped for 15 minutes to induce warm ischemia and 1 ml of heparinized saline (50µl/ml) was injected into the vena cava to flush each aorta. A 6-mm segment of abdominal aorta from below the renal arteries to just above the aortic bifurcation was excised and soaked in ice-cold 0.9% normal saline. The grafts were then sutured in the orthotopic position with end-to-end anastomoses, using 11-0 nylon interrupted sutures. The transplantations were performed in absence of immunosuppression. Whenever mentioned, the animals received tail vein I.V. injections of either 50 µg recombinant LG3 or phosphate-buffered saline (PBS, vehicle). Injections were given every other day during the first 3 weeks post-transplantation for a total of 8 doses. Transplanted and adjacent native aortas were harvested at 3 weeks post-transplantation, embedded in paraffin, and processed for light microscopy with haematoxylin and eosin (H&E) staining. For C57Bl/6-GFP recipient mice, aortas were harvested and snap frozen in liquid nitrogen, and then processed on slides for analysis. Digital images of H&E-stained tissues were captured by Leica DMLS microscope

and Olympus DP71 camera (Center Valley, PA, USA). Intimal and medial areas of the aortic grafts were outlined and quantified with a digital image analysis program (ImageJ 1.42q, NIH, Bethesda, MD, USA).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections were stained with antibodies against phosphorylated ERK1/2 (Cell Signaling) and α SMA (Clone 1A4, Dako North America, Carpinteria, CA, USA) on Discovery XT automated IHC (Ventana Medical Systems, Roche group, Tucson, AZ, USA) using the DAB-HRP detection kit (DABmap detection kit, Ventana). Online Supplemental Figure (Supplementary Figure 2) shows immune and non-immune (in the absence of primary antibody) staining of all antibodies.

Confocal microscopy

Cryopreserved sections of aortic allografts from WT or GFP+ recipient mice were put onto slides for laser confocal scanning microscopy. Micrographs were taken using an Olympus multiphoton FV-1000 MER microscope. The images were taken with a UPlanSApo 40X/0.95W objective lens. The 488nm line of an Argon laser was used to excite GFP and its emission was detected at 520nm. Differential interference contrast images were captured using the transmission light detector of the confocal microscope.

Statistical Analysis

The results are expressed as mean \pm SEM. Student *t* tests (when only 2 variables) or ANOVA with Newman-Keuls Multiple Comparison post-tests were done using GraphPad Prism 3.0. $P \leq 0.05$ was considered to be significant for all tests.

RESULTS

LG3 induces an ERK1/2-dependent promigratory phenotype in MSC

LG3 has been implicated in neointima formation in TV²⁰. As MSC are recognized as an important neointimal constituent in TV^{3,9}, we evaluated the functional activity of LG3 on migration of human (hMSC) and murine MSCs (mMSC). In both hMSCs and mMSCs, horizontal migration assessed by scratch assays, increased significantly in the presence of LG3 (Figure 1A-B, 1D-E). LG3 did not induce proliferation of MSCs, as measured by a BrdU incorporation assay (Supplementary Figure 3), indicating that the increased number of cells migrating within the denuded area in the presence of LG3 do not result from increased proliferation. To further define the potential impact of LG3 on MSC homing, we also evaluated its chemotactic potential using Boyden Chambers. Transmigration of MSC increased dose-dependently when LG3 was added to the lower chamber (Figure 1C, F). Collectively, these results highlight a novel role for LG3 in homing and migration of MSCs.

We next aimed at characterizing the signaling pathways underlying LG3-induced migration of MSC. LG3 is known to induce an anti-apoptotic response in MSC through ERK1/2-dependent pathways. Hence, we evaluated the impact of ERK 1/2 activation in regulation of MSC homing and migration. At pro-migratory concentrations, LG3 dose-dependently increased ERK1/2 phosphorylation in MSC (Figure 2A). Blocking ERK 1/2 activation with a MEK1 biochemical inhibitor (PD98059) significantly decreased horizontal migration of MSC in presence of LG3 (Figure 2B-C). Moreover, LG3-induced transmigration was also significantly reduced in presence of PD98059 (Figure 2D). These results suggest that LG3-induced migratory phenotypes develop through ERK-1/2-dependent pathways. Src has been implicated in LG3-dependent signaling in fibroblasts¹⁹ and can participate in ERK 1/2 activation²⁷. Consistent with a role for LG3-dependent Src-signaling in MSC, we observed increased Src phosphorylation in MSC exposed to LG3 (Figure 3A). Inhibiting Src activation with PP2 significantly reduced ERK1/2 phosphorylation in MSC exposed to LG3 (Figure 3B), and also decreased LG3-induced horizontal migration (Figure 3C-D). These results suggest that LG3-induced Src activation is an upstream regulator of ERK1/2-dependent migration in MSC.

Central role of $\alpha 2\beta 1$ Integrins in LG3-induced MSC migration

LG3 is known to interact with $\alpha 2\beta 1$ integrins in different cell types^{19,23}. To assess the importance of LG3- $\beta 1$ integrin interactions on the migratory and chemotactic responses, hMSC were exposed to LG3 in presence of either a $\beta 1$ -integrin blocking antibody or an isotype control. $\beta 1$ integrin neutralization significantly reduced hMSC migration (Figure 4A-B). To further characterize the importance of $\alpha 2\beta 1$ integrins in LG3-dependent MSC migration, MSC were isolated from $\alpha 2$ knock-out mice which fail to express $\alpha 2\beta 1$ integrins²⁸⁻³⁰. LG3 did not increase horizontal migration or transmigration of $\alpha 2^{-/-}$ MSC (Figure 4C-D and Figure 5A). However, horizontal migration of $\alpha 2^{-/-}$ MSC was significantly increased when incubated in normal medium, as compared with MSC exposed to serum-free medium (Supplementary Figure 4A). Also, $\alpha 2^{-/-}$ MSC showed increased transmigration when exposed to PDGF (Supplementary Figure 4B), a known chemotactic factor for MSC. These results suggest that failure to respond to LG3 in $\alpha 2^{-/-}$ MSC is not caused by a generalized migration defect. Consistent with an upstream role for $\alpha 2\beta 1$ integrins in conveying ERK 1/2-dependent migration signals, we also observed that ERK1/2 phosphorylation was abolished in $\alpha 2^{-/-}$ mMSCs exposed to LG3 (Figure 5B). Collectively these results demonstrate the importance of LG3- $\alpha 2\beta 1$ integrin interactions for initiating ERK1/2-dependent migration of MSC.

LG3 fosters accumulation of recipient-derived neointimal cells during vascular rejection

As LG3 circulating and urinary levels are increased in human renal transplant patients with immune-mediated vascular injury and LG3 accelerates neointima formation in a mouse model of allograft vascular rejection, we sought to evaluate the contribution of recipient-derived α -SMA positive cells to LG3-induced neointima formation in vivo. To this end, we used a murine model of TV based on the transplantation of a fully-MHC mismatched aortic graft in absence of immunosuppression. In this model, neointima formation progresses over 9 weeks²⁰. Injection of recombinant LG3 in recipients of allogeneic allografts leads to accelerated neointima formation with increased intima-media ratios and accumulation of α -SMA positive cells in the allogeneic aortic segment 3 weeks after transplantation (Figure 6A and Supplementary Figure 5). This was associated with loss of medial α -SMA expression in LG3-

injected recipients. Injection of recombinant LG3 did not however induce neointima formation in the isogenic aortic aorta adjacent to the allograft (data not shown).

To assess the origin of α -SMA positive neointimal cells, GFP⁺ transgenic mice were used as recipients. In GFP⁺ recipients of an allogeneic aortic graft injected with recombinant LG3 or vehicle, the vast majority of neointimal cells were found to be GFP(+) whereas neointimal areas were largely non-fluorescent in WT recipients (Figure 6B). Collectively, these results are consistent with previous work demonstrating an important role for recipient-derived α -SMA positive cells in neointima formation at sites of vascular injury and suggest that LG3-induced vascular narrowing is also dependent on neointimal accumulation of recipient-derived α -SMA positive cells.

LG3- α 2 β 1 integrin interactions are central to neointima formation in transplant vasculopathy

We then sought to evaluate whether α 2 β 1 integrin expression in the recipient was critical for LG3-induced neointima formation in this model. We performed allogeneic aorta transplantation in α 2^{-/-} recipients or wild-type controls followed by injection of recombinant LG3 or vehicle. WT recipients of an allogeneic aortic graft injected with recombinant LG3 showed significantly increased intima/media ratios as compared to vehicle (Figure 7A and 7B). Neointima formation and intima-media ratios were significantly reduced in α 2^{-/-} recipients injected with recombinant LG3 as compared with wild-type controls (Figure 7A and 7B). These results highlight the importance of LG3/ α 2 β 1 integrin interactions in recipient cells for enhanced neointima formation.

Since we found that LG3 fosters ERK1/2-dependent migration and homing of MSC in vitro, we then assessed ERK 1/2 phosphorylation in neointimal cells in wild-type and α 2^{-/-} recipients injected with recombinant LG3. In wild-type recipients, LG3 injection significantly increased the number of neointimal cells showing evidence of ERK 1/2 phosphorylation as compared with wild-type recipients injected with vehicle (Figure 8 A and B). In α 2^{-/-} recipients injected with recombinant LG3, neointimal ERK 1/2 phosphorylation was significantly reduced as compared with wild-type controls injected with LG3 (Figure 8 A and

B). Collectively, these results highlight a novel role for LG3- $\alpha 2\beta 1$ integrin interactions in fostering neointimal ERK 1/2 phosphorylation and accumulation of recipient-derived neointimal cells at sites of vascular injury.

DISCUSSION

Stem cells display immunomodulatory functions of potential benefit for preventing allo-immune responses. However, integration and accumulation of recipient-derived progenitor cells at sites of vascular injury and inflammation has been implicated in the development of TV^{4-6,31}. Characterizing novel mediators and pathways of importance in controlling the accumulation of recipient-derived stem cells during development of TV bears the hope of defining new targets for controlling the potential downside of stem cell therapy and preventing their long term incorporation within the allograft vasculature. Emerging data point to a complex interplay of mediators and pathways that coordinates the various phases of homing, migration and accumulation of recipient-derived stem cells which, when sustained, culminate into obliterative vascular remodeling. Local injury appears to be a central permissive factor for attraction and accumulation of stem cells.

In TV, increased apoptosis of the endothelium is an important initiating event for the release of various paracrine signals setting in motion maladaptive repair processes^{1,32-34}. Among the different mediators produced at sites of vascular injury and of importance in fostering maladaptive vascular repair processes, mounting evidence from our group and others suggests that LG3 is of special interest. Endothelial caspase-3 activation, a characteristic of the apoptotic endothelium in TV, triggers the release of LG3^{18,20}. Circulating and urinary levels of LG3 are increased in renal transplant patients with either acute or chronic immune-mediated vascular injury^{20,22}. Enhanced LG3 levels foster obliterative vascular remodeling in a murine model of TV²⁰. LG3 favors the acquisition of an anti-apoptotic phenotype in human MSC in vitro with enhanced expression of the neointimal marker Bcl-xl²³. In the present work we provide further evidence highlighting novel LG3-dependent mechanisms of importance in progressive vascular narrowing during TV. LG3 favors homing and migration of MSC and neointimal accumulation of recipient-derived cells through $\alpha 2\beta 1$ integrin-dependent pathways leading to Src and ERK 1/2 activation.

LG3 induces MSC migration through $\alpha 2\beta 1$ -dependent signaling pathways leading to sequential Src and ERK 1/2-activation. These results are consistent with the central role for $\alpha 2\beta 1$ integrins as a major receptor for LG3 in other cell types such as endothelial cells and

fibroblasts^{19,35,36}. The present work also highlights the importance of the ERK 1/2 pathways as a downstream integrator of LG3-dependent migratory signals triggered through $\alpha 2\beta 1$ integrin interactions. Mesenchymal stem cells exposed to recombinant LG3 in vitro showed a clear dependence on ERK 1/2 activation for increasing migration. Also, injection of recombinant LG3 in allogeneic aortic recipients led to an increased number of neointimal cells showing evidence of ERK phosphorylation. Absence of LG3/ $\alpha 2\beta 1$ integrin interactions in $\alpha 2^{-/-}$ recipients injected with LG3 translated into reduced numbers of neointimal cells showing ERK phosphorylation. Also, it should be noted that LG3 does not trigger neointima formation in the isogenic aorta adjacent to the allograft²⁰ (data not shown), suggesting that vascular injury is necessary for activation of $\alpha 2\beta 1$ integrin-dependent homing pathways that may be synergized by high levels of LG3 but that are not *per se* initiated by LG3. These results are in line with the many known functions of integrin family members, which integrate outside-in signaling from cell and matrix components but also synergize signals from growth factors to induce robust activation of various signaling cascades including ERK 1/2³⁷.

We also show that LG3 enhances vascular narrowing in a model of TV at least in part through enhanced accumulation of recipient-derived α SMA+ neointimal cells. Both GFP+ transgenic and $\alpha 2\beta 1$ deficient models concur to highlighting the central contribution of LG3/ $\alpha 2\beta 1$ interactions in recruitment of recipient-derived cells within the neointima. When GFP+ recipients of an allogeneic aortic allograft were injected with recombinant LG3, a majority of neointimal cells were found to be GFP+, demonstrating the participation of recipient cells in vascular remodeling. This technique has certain limitations. As it can be appreciated on the representative images in Figure 6B, it is difficult to notice the media decellularization since the elastic laminae of the WT aortas are auto-fluorescent, hence the WT controls. Since MSC do not express ubiquitous markers, we could not specifically identify them at neointimal sites. However, on the cellular level, we assessed the GFP expression in MSC isolated from GFP+ mice by FACS (data not shown). Therefore we refer to these neointimal GFP+-cells as recipient cells. Further experiments will be needed to assess their phenotype. Also, $\alpha 2^{-/-}$ recipients injected with LG3 showed reduced allograft neointima formation, indicating the importance of $\alpha 2\beta 1$ integrins in the LG3-dependant neointima formation. Collectively, these results suggest that the LG3 favors neointima formation largely through interactions with $\alpha 2\beta 1$

integrin receptors in recipient-derived cells. These results, by characterizing the receptor and signaling cascade triggered by LG3 in MSC, open new potential therapeutic avenues for targeting effectors of vascular obliteration.

Recent publications have questioned the relevance of progenitor cells in the sustained and long-term accumulation of neointimal cells^{38,39}. In wire-injury, homing and accumulation of progenitor cells is likely to represent an early event associated with the initial phases of vascular damage, enhanced cell death and inflammation whereas long-term participation of progenitor cells appears an exceedingly uncommon event¹⁶. However, in contrast to the acute vascular damage associated with wire injury, TV is characterized by sustained pro-apoptotic and inflammatory responses that perpetuate pathways of importance in attracting progenitor cells. A large body of evidence in animal-models of TV and in human transplant recipient biopsy samples has conclusively demonstrated the importance of recipient-derived progenitors cells in allograft neointima formation^{3,8,9}. The present work adds further support to the central role of recipient-derived cells in alloimmune-mediated neointima formation. We found that, in GFP+ transgenic recipients, a majority of neointimal cells were GFP+, and in all types of allogeneic recipients, whether GFP+ or wild-type, the vast majority of neointimal cells were α SMA+. The importance of α 2B1 integrins in neointima formation in our model also highlights major mechanistic differences between non-immune models of vascular remodeling and TV. Indeed, α 2^{-/-} apoE^{-/-} mice are not protected from development of atherosclerotic lesions³⁰ whereas α 2^{-/-} allograft recipients show a significant resistance to the pro-remodeling activity of LG3 injections.

Our results do not allow characterizing the specific cell lineages in the recipient that give rise to neointimal α SMA+ cells following LG3 injection. Nonetheless, the present work and previous publications highlight two likely and non-mutually exclusive cellular contributors. First, recipient-derived MSC which, following exposure to LG3, show increased migratory capacity and develop a state of resistance to apoptosis favoring their accumulation within a hostile environment, are a likely candidate. Also, we showed previously that VSMC show enhanced migration after exposure to LG3. It is conceivable that, in this model, VSMC

derived from isogenic adjacent aorta migrate towards the allograft and populate areas of neointima formation.

The pathways regulating the production, release and increased circulating levels of LG3 are only beginning to be unravelled. Increased circulating and urinary LG3 levels have been reported in renal failure patients even before transplantation²¹. Whether LG3 can modulate abnormal vascular repair in other vascular disease states, such as the accelerated atherosclerotic disease and vascular calcification sustained by uremic patients, will be the scope of future investigation. Nonetheless, the present results highlight the importance of recipient-derived cells in LG3-induced neointima formation of allografts and characterize the central role of $\alpha 2\beta 1$ integrin in transducing LG3-dependent ERK-dependent migratory responses. Characterizing the receptor and signaling pathways triggered by LG3 in neointimal cells provides novel potential therapeutic targets for controlling maladaptive vascular remodeling of allogeneic solid organ transplants.

BIBLIOGRAPHY

1. Pallet N, Dieude M, Cailhier J, Hebert M. The molecular legacy of apoptosis in transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. Jun 2012;12(6):1378-1384.
2. Hillebrands JL, Onuta G, Rozing J. Role of progenitor cells in transplant arteriosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine*. Jan 2005;15(1):1-8.
3. Zheng Q, Liu S, Song Z. Mechanism of arterial remodeling in chronic allograft vasculopathy. *Frontiers of medicine*. Sep 2011;5(3):248-253.
4. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth- muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nature medicine*. Jun 2001;7(6):738-741.
5. Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. Jun 2001;107(11):1411-1422.
6. Sata M, Saiura A, Kunisato A, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nature medicine*. Apr 2002;8(4):403-409.
7. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, et al. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *The New England journal of medicine*. Jul 12 2001;345(2):93-97.
8. Onuta G, van Ark J, Rienstra H, et al. Development of transplant vasculopathy in aortic allografts correlates with neointimal smooth muscle cell proliferative capacity and fibrocyte frequency. *Atherosclerosis*. Apr 2010;209(2):393-402.
9. Tsai TN, Kirton JP, Campagnolo P, et al. Contribution of stem cells to neointimal formation of decellularized vessel grafts in a novel mouse model. *The American journal of pathology*. Jul 2012;181(1):362-373.
10. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.

11. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. Jan 18 2005;111(2):150-156.
12. Ramirez M, Lucia A, Gomez-Gallego F, et al. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury. *British journal of sports medicine*. Aug 2006;40(8):719-722.
13. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem cells*. Oct 2006;24(10):2202-2208.
14. Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. Apr 2001;32(4):1005-1011.
15. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Experimental hematology*. Feb 2001;29(2):244-255.
16. Tanaka K, Sata M, Hirata Y, Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circulation research*. Oct 17 2003;93(8):783-790.
17. Wan M, Li C, Zhen G, et al. Injury-activated transforming growth factor beta controls mobilization of mesenchymal stem cells for tissue remodeling. *Stem cells*. Nov 2012;30(11):2498-2511.
18. Cailhier JF, Sirois I, Laplante P, et al. Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *The Journal of biological chemistry*. Oct 3 2008;283(40):27220-27229.
19. 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. *The Journal of biological chemistry*. Oct 13 2006;281(41):30383-30392.
20. Soulez M, Pilon EA, Dieude M, et al. The perlecan fragment LG3 is a novel regulator of obliterative remodeling associated with allograft vascular rejection. *Circulation research*. Jan 6 2012;110(1):94-104.

21. Cardinal H, Dieude M, Brassard N, et al. Antiperlecan antibodies are novel accelerators of immune-mediated vascular injury. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. Apr 2013;13(4):861-874.
22. O'Riordan E, Addabbo F, Goligorsky MS. Urine proteomics--prospects for future diagnostics. *Acta physiologica Hungarica*. Mar 2007;94(1-2):133-141.
23. Soulez M, Sirois I, Brassard 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*. Apr 2010;28(4):810-820.
24. Coutu DL, Francois M, Galipeau J. Inhibition of cellular senescence by developmentally regulated FGF receptors in mesenchymal stem cells. *Blood*. Jun 23 2011;117(25):6801-6812.
25. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British journal of haematology*. Apr 2003;121(2):368-374.
26. Raymond MA, Desormeaux A, Laplante P, et al. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. Apr 2004;18(6):705-707.
27. Li Z, Hosoi Y, Cai K, et al. Src tyrosine kinase inhibitor PP2 suppresses ERK1/2 activation and epidermal growth factor receptor transactivation by X-irradiation. *Biochemical and biophysical research communications*. Mar 10 2006;341(2):363-368.
28. Chen J, Diacovo TG, Grenache DG, Santoro SA, Zutter MM. The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *The American journal of pathology*. Jul 2002;161(1):337-344.
29. Grenache DG, Zhang Z, Wells LE, Santoro SA, Davidson JM, Zutter MM. Wound healing in the alpha2beta1 integrin-deficient mouse: altered keratinocyte biology and

- dysregulated matrix metalloproteinase expression. *The Journal of investigative dermatology*. Feb 2007;127(2):455-466.
30. Grenache DG, Coleman T, Semenkovich CF, Santoro SA, Zutter MM. Alpha2beta1 integrin and development of atherosclerosis in a mouse model: assessment of risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Nov 1 2003;23(11):2104-2109.
 31. Li J, Han X, Jiang J, et al. Vascular smooth muscle cells of recipient origin mediate intimal expansion after aortic allotransplantation in mice. *The American journal of pathology*. Jun 2001;158(6):1943-1947.
 32. Choy JC, Kerjner A, Wong BW, McManus BM, Granville DJ. Perforin mediates endothelial cell death and resultant transplant vascular disease in cardiac allografts. *The American journal of pathology*. Jul 2004;165(1):127-133.
 33. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Intragraft events preceding chronic renal allograft rejection in a modified tolerance protocol. *Kidney international*. Dec 2000;58(6):2546-2558.
 34. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Persistent rejection of peritubular capillaries and tubules is associated with progressive interstitial fibrosis. *Kidney international*. May 2002;61(5):1867-1879.
 35. Bix G, Fu J, Gonzalez EM, et al. Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin. *The Journal of cell biology*. Jul 5 2004;166(1):97-109.
 36. Mongiat M, Sweeney SM, San Antonio JD, Fu J, Iozzo RV. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *The Journal of biological chemistry*. Feb 7 2003;278(6):4238-4249.
 37. Li X, Ishihara S, Yasuda M, et al. Lung Cancer Cells That Survive Ionizing Radiation Show Increased Integrin alpha2beta1- and EGFR-Dependent Invasiveness. *PloS one*. 2013;8(8):e70905.
 38. Daniel JM, Bielenberg W, Stieger P, Weinert S, Tillmanns H, Sedding DG. Time-course analysis on the differentiation of bone marrow-derived progenitor cells into smooth muscle cells during neointima formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Oct 2010;30(10):1890-1896.

39. Høglund VJ, Dong XR, Majesky MW. Neointima formation: a local affair. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Oct 2010;30(10):1877-1879.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. LG3 induces a promigratory phenotype in human and murine MSC. (A) Assessment of migration of hMSC exposed for 48 hours to serum-free RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (0.5, 2.5 and 5 μ g/mL; n> 3; p \leq 0.001). (B) Representative micrographs of migration assay in hMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (0.5, 2.5 and 5 μ g/mL). (C) Assessment of transmigration of hMSC exposed for 16 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (bottom chamber) (0.5, 1 and 2.5 μ g/mL; n=6; p \leq 0.001). (D) Assessment of migration of mMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (5 μ g/mL; n=3; p \leq 0.01). (E) Representative micrographs of migration assay in mMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (5 μ g/mL). (F) Assessment of transmigration of mMSC exposed for 16 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (0.5 and 5 μ g/mL; n=4; p \leq 0.05).

Figure 2. The promigratory phenotype induced by LG3 in MSC is ERK1/2-dependent. (A) Immunoblotting analysis of phosphorylated ERK1/2 and total ERK2 in hMSC exposed for 1 hour to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (0.5 and 2.5 μ g/mL). Autoradiographs were quantified by densitometric scanning for the ERK1/2-phosphorylated form relative to the amount of total ERK2 (n=5; p \leq 0.01). (B) Assessment of migration of hMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (2.5 μ g/mL) alone or with PD98059 (50 μ mol/L), or vehicle (DMSO) (n=3; SS vs. LG3 p \leq 0.001; n=3; PD98059 vs. vehicle p \leq 0.05). (C) Representative micrographs of migration assay in hMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (2.5 μ g/mL) alone or with PD98059 (50 μ mol/L), or vehicle (DMSO). (D) Assessment of transmigration of hMSC exposed for 16 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (2.5 μ g/mL) alone or with PD98059 (50 μ mol/L), or vehicle (DMSO) (bottom chamber) (n=6; SS vs. LG3 p \leq 0.001; n=6; PD98059 vs. vehicle p \leq 0.05).

Figure 3. Src kinase is involved in the promigratory phenotype induced by LG3. (A) Upper panel: Immunoblotting analysis of phosphorylated Src and total Src in hMSC exposed for 1 hour to SS alone or supplemented with LG3 (2.5 μ g/mL). Lower panel: Autoradiographs

were quantified by densitometric scanning for the Src-phosphorylated form relative to the amount of total Src (n=3; $p \leq 0.02$). **(B)** Upper panel: Immunoblotting analysis of phosphorylated ERK1/2 and total ERK2 in hMSC exposed for 45 mins to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (2.5 μ g/mL) alone or with PP2 (10 μ mol/L), or control (PP3). Lower panel: Autoradiographs were quantified by densitometric scanning for the ERK1/2-phosphorylated form relative to the amount of total ERK2 (n=3; SS vs. LG3 $p \leq 0.01$; n=3; PP2 vs. PP3 $p \leq 0.05$). **(C)** Assessment of migration of hMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (2.5 μ g/mL) alone or with PP2 (10 μ mol/L), or control (PP3) (n=8; SS vs. LG3 $p \leq 0.001$; n=8; PP2 vs. PP3 $p \leq 0.001$). **(D)** Representative micrographs of migration assay in hMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (2.5 μ g/mL) alone or with PP2 (10 μ mol/L), or control (PP3).

Figure 4. LG3- α 2 β 1 interactions are required for LG3-induced promigratory phenotype in MSC. **(A)** Assessment of migration of hMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (2.5 μ g/mL) alone or with an anti- β 1 neutralizing antibody (10 μ g/mL), or isotype matched control antibody (n=3; SS vs. LG3 $p \leq 0.001$; n=3; antibody vs. control $p \leq 0.001$). **(B)** Representative micrographs of migration assay in hMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (2.5 μ g/mL) alone or with β 1 neutralizing antibody (10 μ g/mL), or isotype matched control antibody. **(C)** Assessment of migration of WT or α 2 $^{-/-}$ mMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (5 μ g/mL) (n=3; SS vs. LG3 $p \leq 0.01$). **(D)** Representative micrographs of migration assay in WT or α 2 $^{-/-}$ mMSC exposed for 48 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (5 μ g/mL).

Figure 5. Transmigration and ERK1/2 activation are dependent on LG3- α 2 β 1 interactions in MSC. **(A)** Assessment of transmigration of WT or α 2 $^{-/-}$ mMSC exposed for 16 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (0.5, 5 and 10 μ g/mL) (bottom chamber) (n=4; SS vs. LG3 5 μ g/mL $p \leq 0.05$; n=4; SS vs. LG3 10 μ g/mL $p \leq 0.01$). **(B)** **Upper panel:** Immunoblotting analysis of phosphorylated ERK1/2 and total ERK2 in WT or α 2 $^{-/-}$ mMSC exposed for 45 mins to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3

(5 μ g/mL). **Lower** panel: Autoradiographs were quantified by densitometric scanning for the ERK1/2-phosphorylated form relative to the amount of total ERK2 (n=3; p \leq 0.02).

Figure 6. Injection of recombinant LG3 enhances the accumulation of recipient-derived neointimal cells. (A) Aortic allograft sections stained for α SMA in WT mice injected with vehicle or LG3 for 3 weeks post-transplantation. (B) **Upper left:** Representative aortic allograft section of a GFP+ transgenic recipient mice injected with recombinant LG3 magnification X400, **Upper right:** Representative aortic allograft section of a WT recipient injected with vehicle magnification X400, **Lower left:** Representative aortic allograft section of a GFP+ transgenic recipient mice injected with vehicle magnification X400. **M:** Media **I:** Intima

Figure 7. LG3 fuels neointima formation through its interaction via α 2 β 1 integrins. (A) H&E-stained aortic allografts from WT or α 2-/- mice injected IV with vehicle (upper panels) or LG3 (lower panels). **Left** panels: magnification X200. **Right** panels: magnification X400. The square insert indicates the magnified area. (B) Intima/media ratios in WT or α 2 -/- mice injected with vehicle or LG3 (WT PBS n=8; WT LG3 n=7; α 2-/- PBS n=7; α 2-/- LG3 n=8; p \leq 0.04). **M:** Media **I:** Intima

Figure 8. LG3- α 2 β 1 interactions are required for accumulation of ERK1/2 positive cells in neointima. **Upper** panel: Assessment of number of ERK1/2 positive cells within neointima in WT or α 2-/- mice injected with vehicle or LG3 for 3 weeks post-transplantation (WT PBS n=5; WT LG3 n=4; α 2-/- PBS n=5; α 2-/- LG3 n=5; WT PBS vs. WT LG3 p \leq 0.001; WT LG3 vs. α 2-/- LG3 p \leq 0.001). **Lower** panel: Aortic sections stained for phosphorylated ERK1/2 in WT or α 2-/- mice injected with vehicle or LG3 for 3 weeks post-transplantation. **Top** panels: magnification X200. **Bottom** panels: magnification X400. **M:** Media **I:** Intima

Figure 9. LG3 fosters neointima formation through increased migration and homing of recipient-derived cells. At the site of endothelial injury, LG3 is cleaved from perlecan creating a gradient that can attract mesenchymal stem cells. Through α 2 β 1 integrins, LG3

induces phosphorylation of Src and ERK1/2 which increase the migration of MSC. Thus, LG3 favours migration and homing of recipient-derived cells, including MSC.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Assessment of proliferation

Measurement of BrdU incorporation during DNA synthesis was performed in subconfluent hMSC using cell proliferation ELISA BrdU (colorimetric) kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) according to the protocol provided by the manufacturer.

Supplementary Figure 1. Representative micrographs of mMSC WT 3 weeks after the initiation of differentiation incubated either with complete growth medium or differentiation medium. Alizarin Red S solution, used to stain the calcium deposition, is visible in cells incubated with the osteogenic differentiation medium. Oil Red, used to stain the lipid deposition, is visible in cells incubated with the adipogenic differentiation medium.

Supplementary Figure 2. (A) Immune and non-immune staining of donor aortic allografts for α SMA (magnification x200). (B) Immune and non-immune staining of donor aortic allografts for phosphorylated ERK1/2 (magnification x200).

Supplementary Figure 3. Assessment of BrdU incorporation in hMSC exposed for 16 hours to complete medium, RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with LG3 (1, 5 and 10 μ g/mL) or supplemented with PDGF (0.4 μ g/mL) n> 3; SS vs N p \leq 0.001; SS vs PDGF p \leq 0.05.

Supplementary Figure 4. (A) Representative micrographs of migration assay in α 2^{-/-} mMSC exposed for 48 hours to complete medium or RPMI medium (ctrl) alone. (B) Assessment of transmigration of α 2^{-/-} mMSC exposed for 16 hours to RPMI medium (ctrl) alone or supplemented with PDGF (0.4 μ g/mL) (bottom chamber) (n=4; p \leq 0.001).

Supplementary Figure 5. Intima/media ratios in WT recipient mice injected with vehicle or LG3 (WT PBS n=8; WT LG3 n=7; p \leq 0.04).

Figure 1

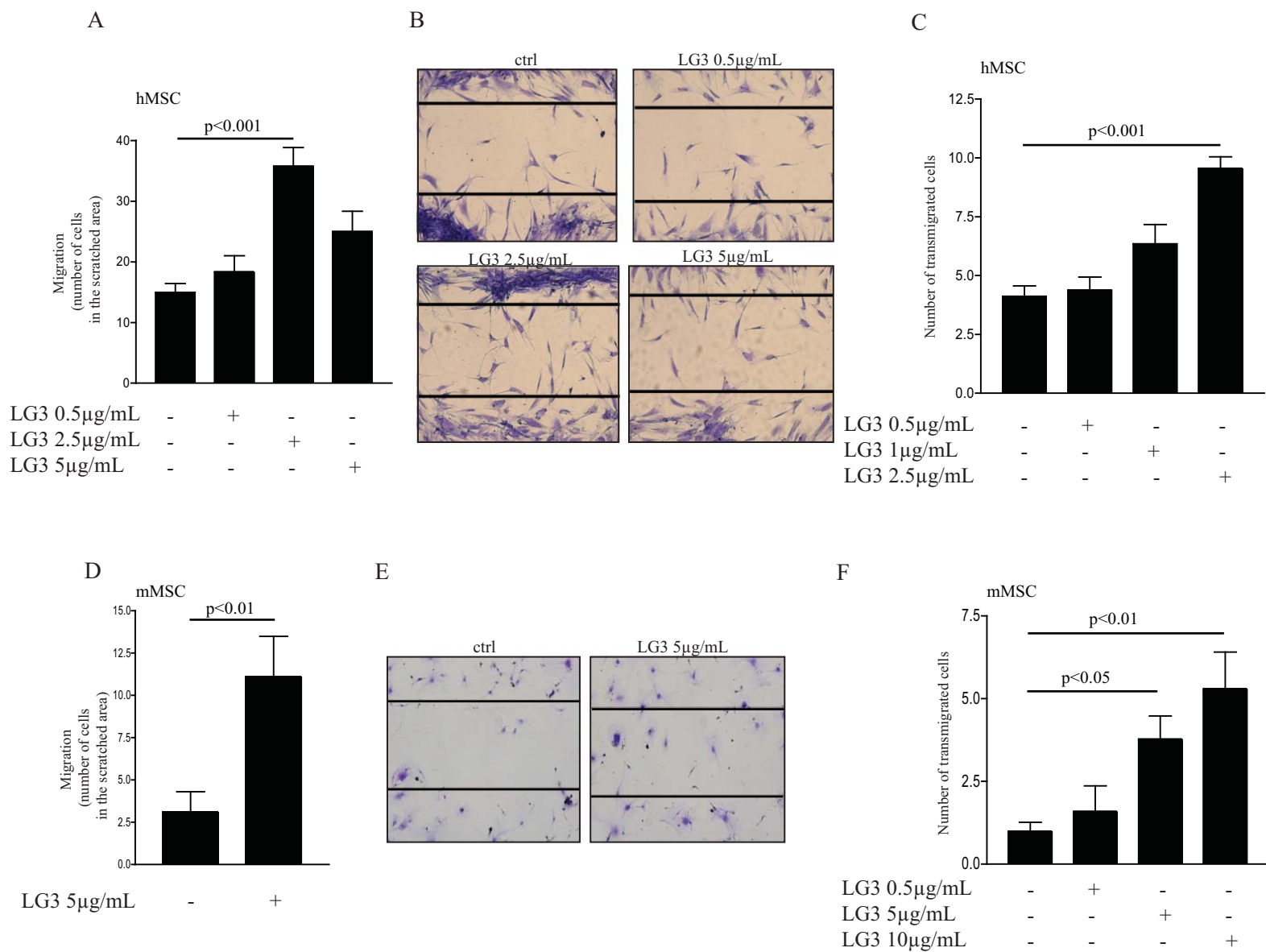


Figure 2

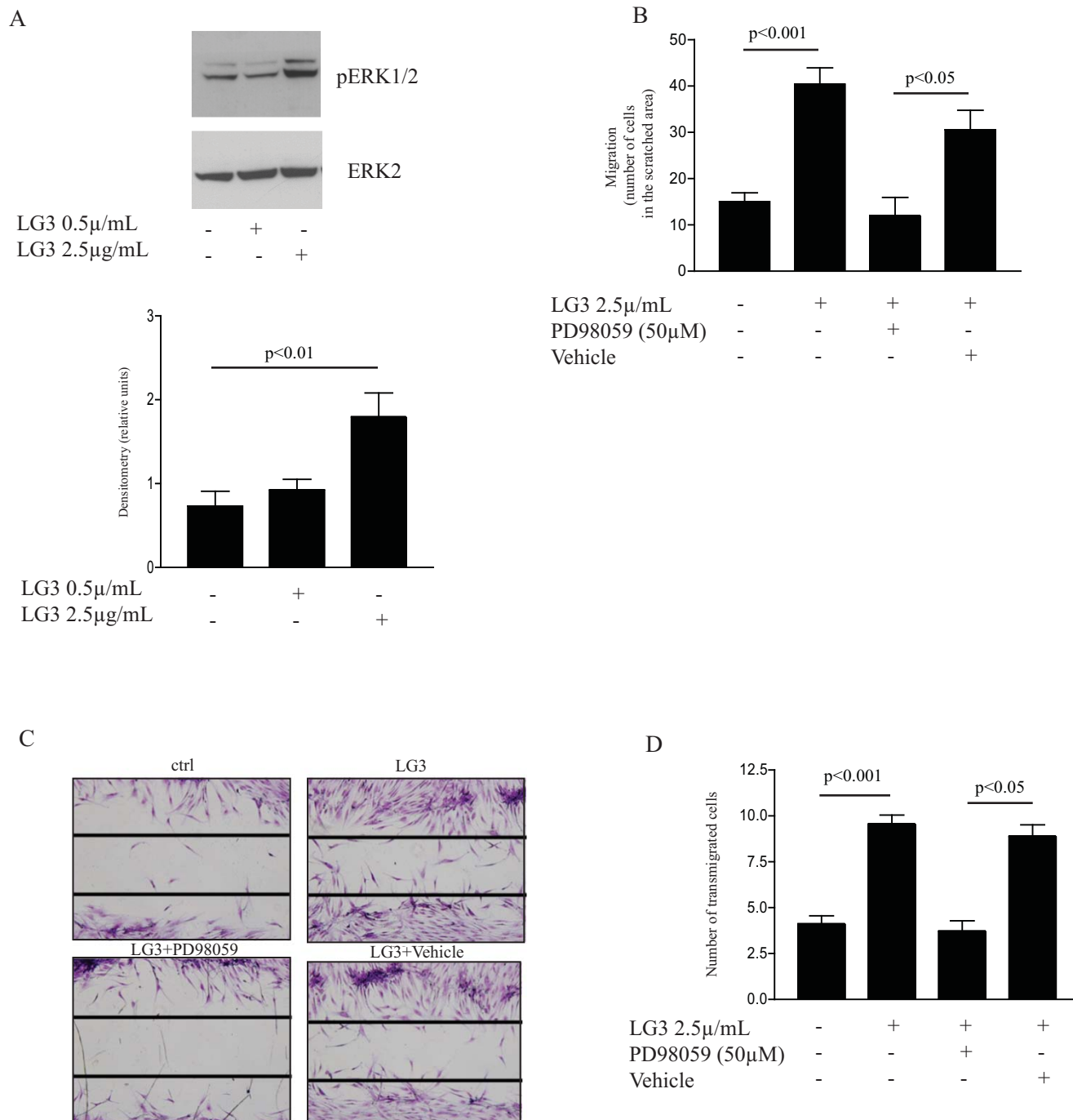
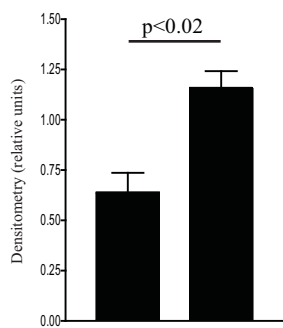
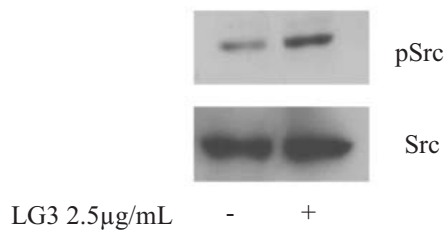


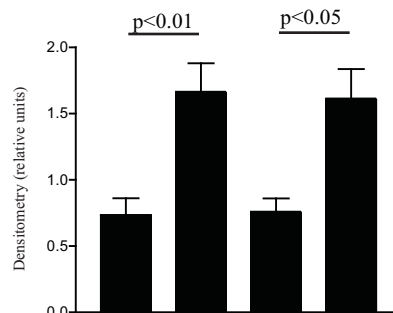
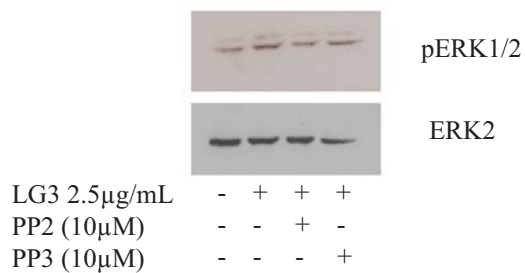
Figure 3

A



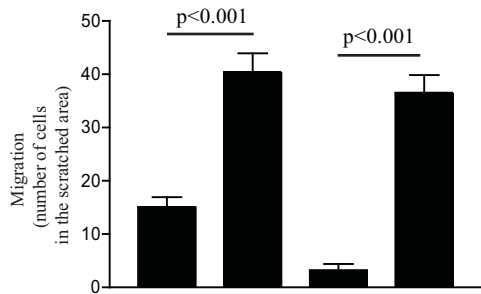
LG3 2.5 μg/mL - +

B



LG3 2.5 μg/mL - + + +
 PP2 (10 μM) - - + -
 PP3 (10 μM) - - - +

C



LG3 2.5 μg/mL - + + +
 PP2 (10 μM) - - + -
 PP3 (10 μM) - - - +

D

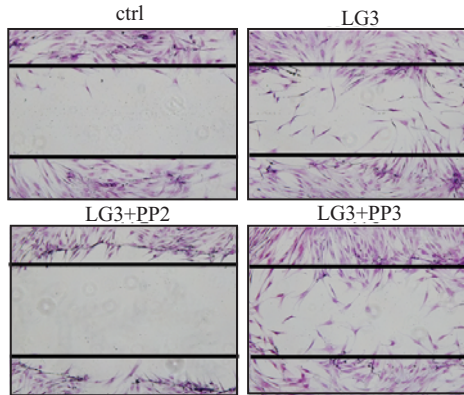


Figure 4

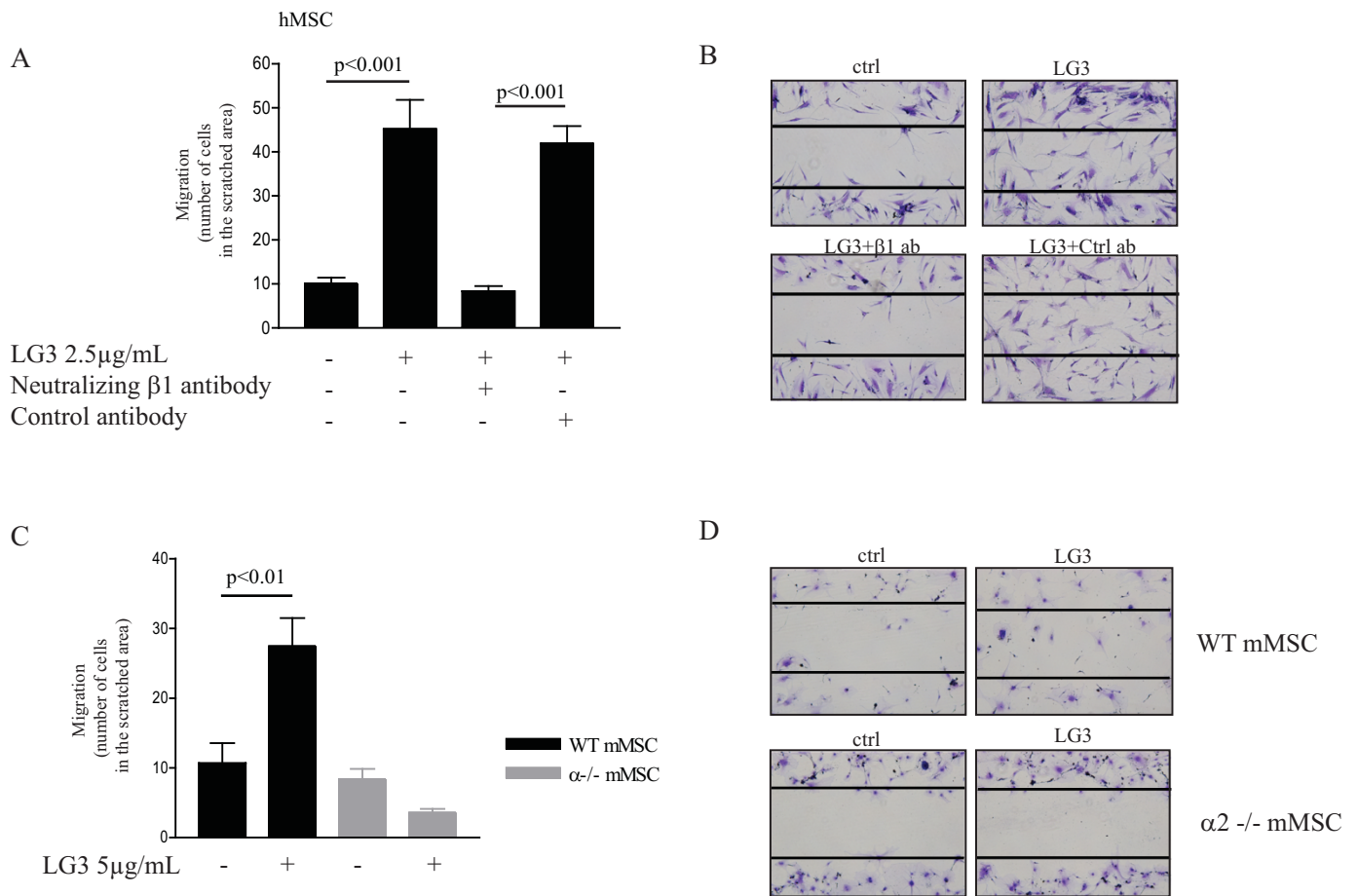
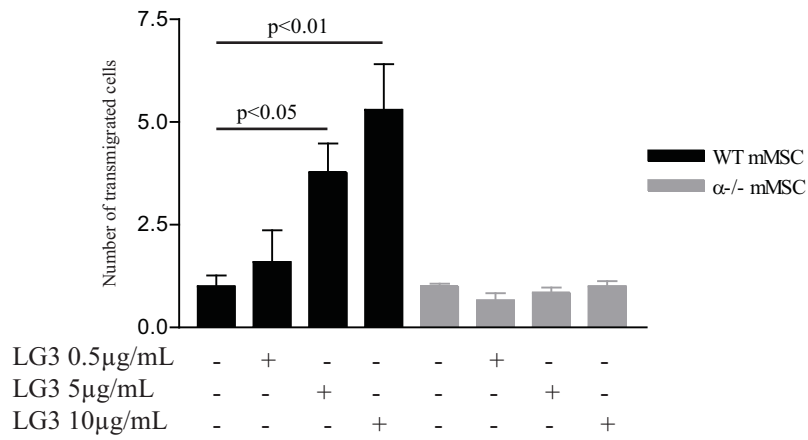


Figure 5

A



B

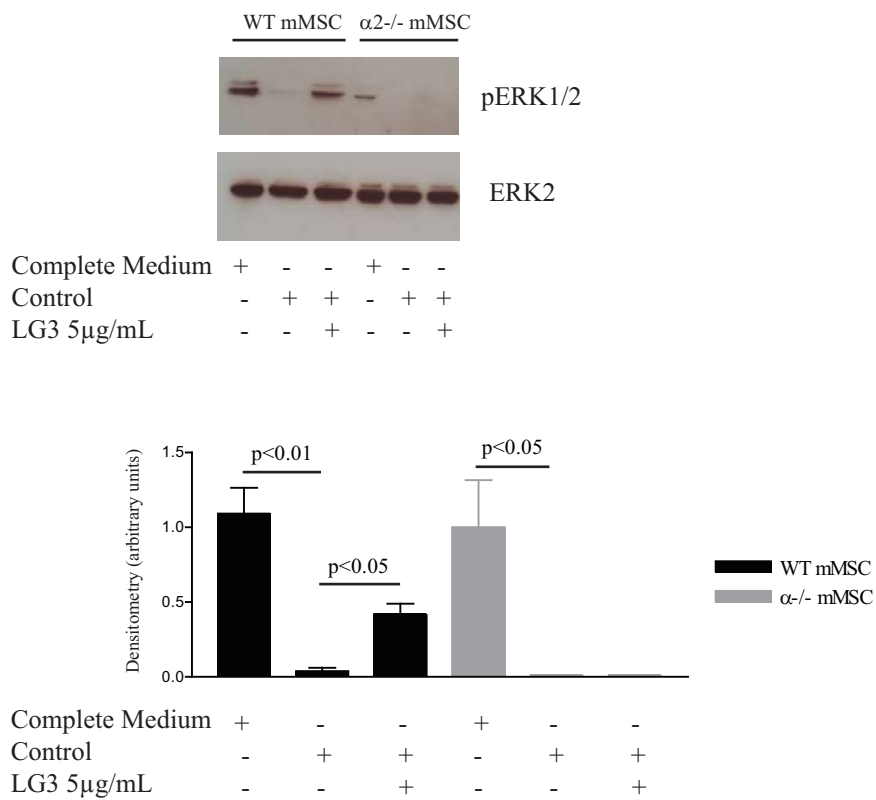


Figure 6

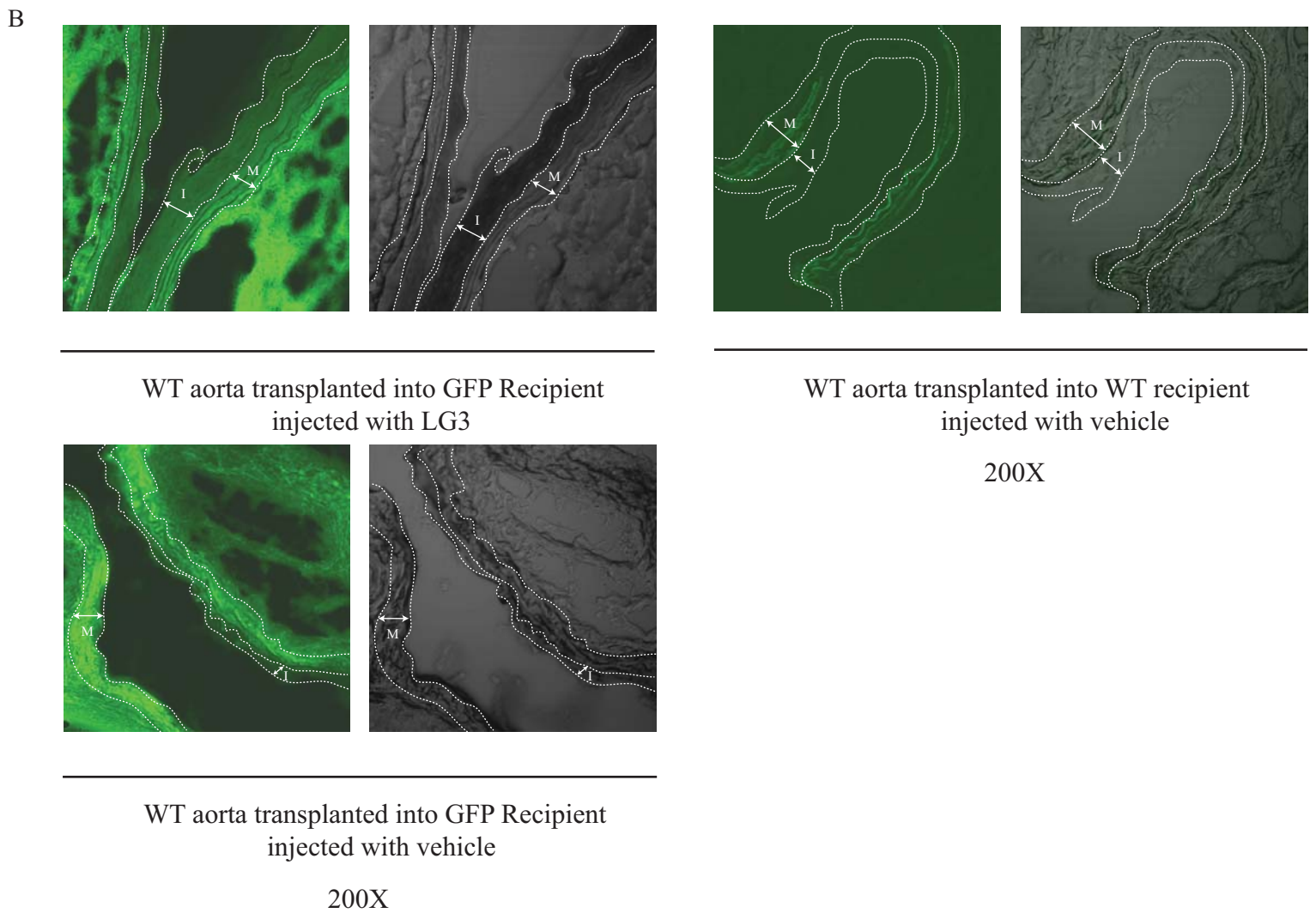
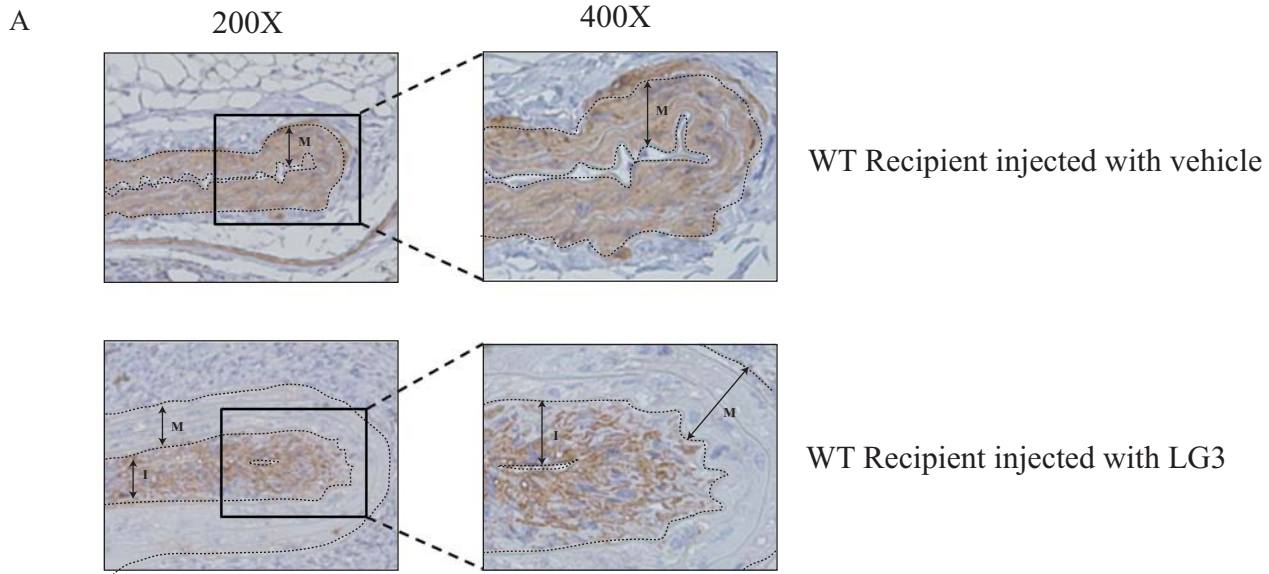


Figure 7

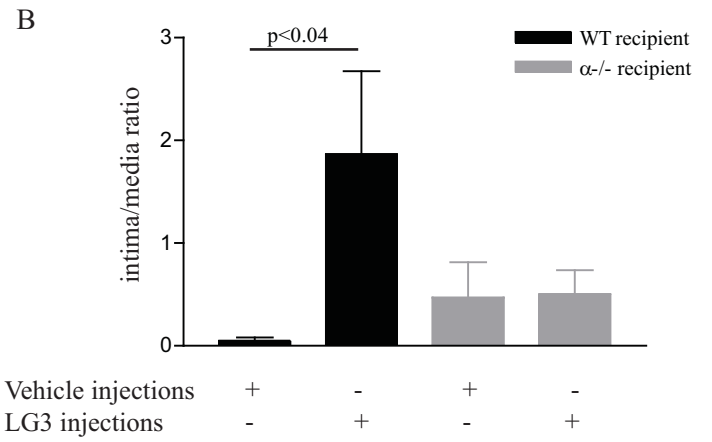
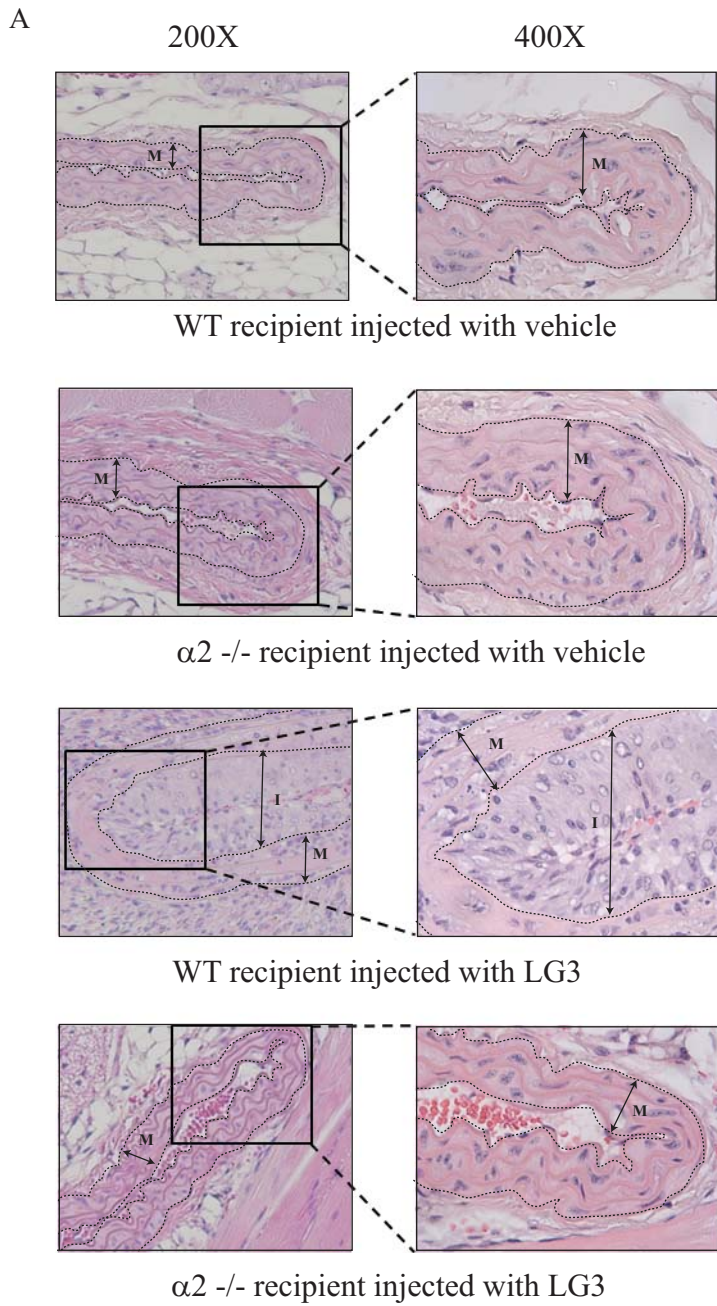
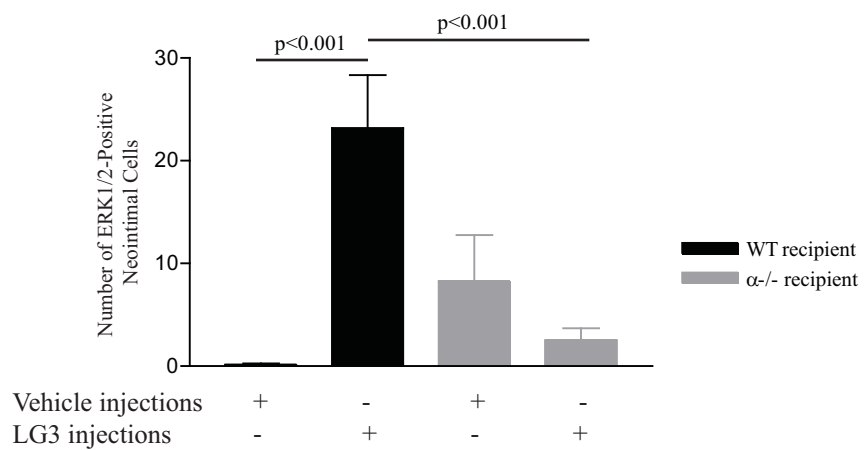
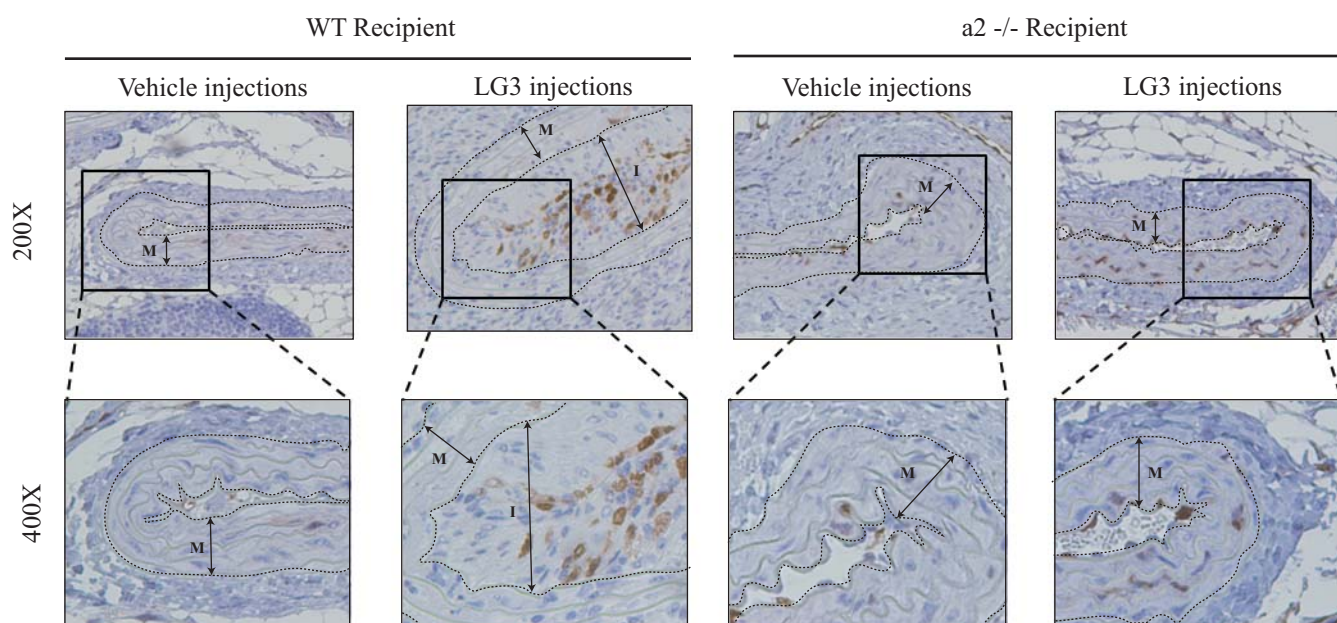


Figure 8

A



B

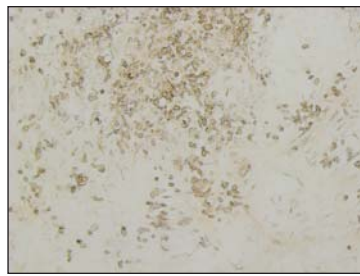


Supplementary Figure 1

Alizarin Red S staining

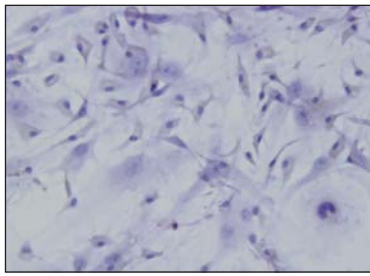


Complete Medium

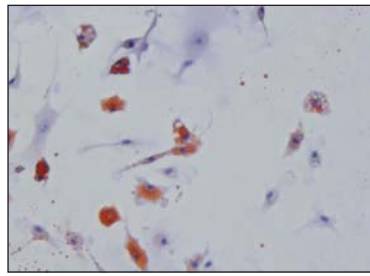


Osteogenic Differentiation Medium

Oil Red staining



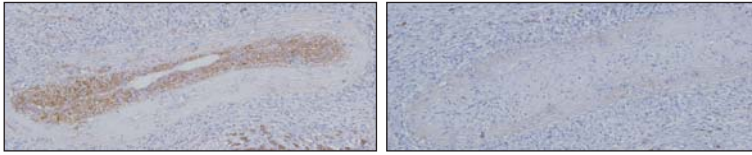
Complete Medium



Adipogenic Differentiation Medium

A

α SMA Immunohistochemistry staining

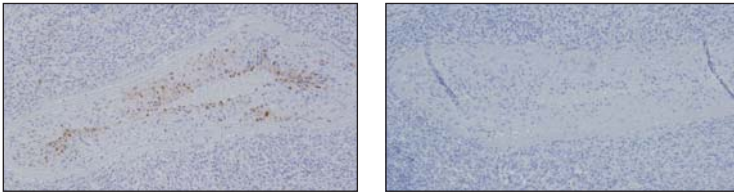


Immune

Non-immune

B

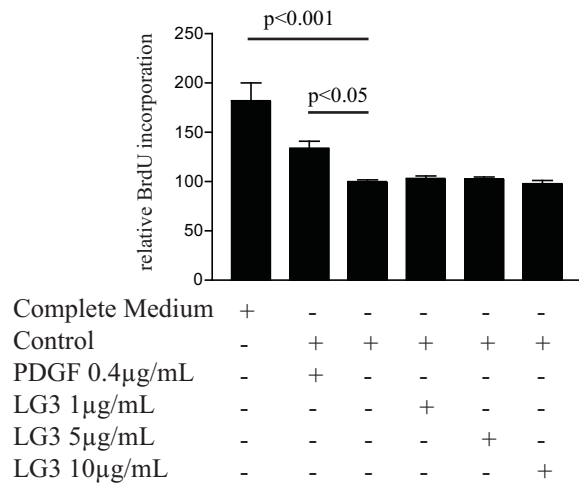
p-ERK 1/2 Immunohistochemistry staining



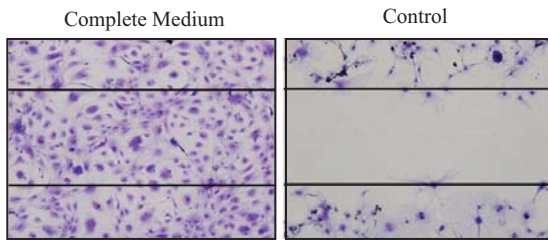
Immune

Non-immune

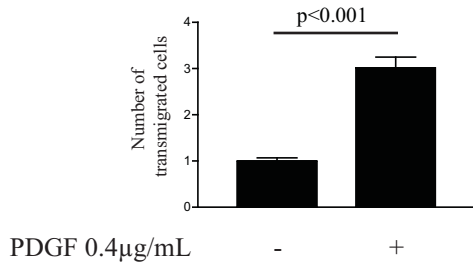
Supplementary Figure 3



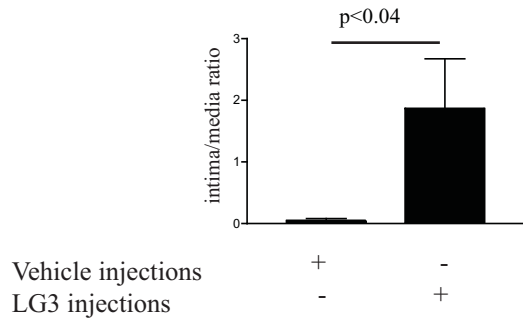
A



B



Supplementary Figure 5



DISCUSSION

Bien que les médicaments immunosuppresseurs et les traitements post-transplantation aient évolués considérablement dans les dernières décennies, le rejet chronique d'allogreffe, plus précisément la vasculopathie du greffon, demeure la principale cause de perte de greffon à long terme (3, 21). L'équilibre entre l'accommodation endothéliale menant à une réparation du vaisseau et le remodelage oblitérant menant à l'occlusion de la lumière de celui-ci est précaire.

L'équipe du Dr Hébert étudie les phénomènes de mort cellulaire et leurs effets sur le microenvironnement vasculaire en rejet de greffe rénale depuis plusieurs années. Cette équipe a démontré que l'apoptose endothéliale joue un rôle important dans le développement du rejet vasculaire : les cellules endothéliales apoptotiques libèrent des médiateurs capables de dégrader la matrice extracellulaire et ainsi favoriser son remodelage en plus de participer à l'accumulation de cellules néointimales (34, 41, 78, 101). Le LG3, un fragment C-terminal provenant du clivage du perlécan et dont les taux sériques ou urinaires sont augmentés en association avec le dommage vasculaire du greffon rénal, est un médiateur important dans la formation de néointima (41, 102). Les résultats obtenus en laboratoire durant ma maîtrise ont permis de mieux caractériser l'impact du LG3 sur un type cellulaire important participant à la formation de néointima : les cellules souches mésenchymateuses.

Mes travaux au laboratoire au début de ma maîtrise sur les CVML ont été publiés dans l'article de Soulez *et al.* intitulé « The Perlecan Fragment LG3 Is a Novel Regulator of Obliterative Remodeling Associated With Allograft Vascular Rejection ». Nous avons démontré que le LG3 induit la migration horizontale *in vitro* des cellules aortiques musculaires lisses (41). Toujours chez les CMVL, le LG3 diminue l'apoptose et le clivage intracellulaire de PARP, une cible en aval de l'activation des caspases (41). De plus, nous avons démontré que le fragment LG3 induit la phosphorylation d'ERK1/2 et que lorsque cette kinase est inhibée, à l'aide de l'inhibiteur biochimique PD98059, la migration diminue de façon significative (41). Enfin, nous avons démontré que la phosphorylation d'ERK1/2 induite par le LG3 est dépendante des intégrines $\beta 1$ puisque lorsque l'intégrine est neutralisée, à l'aide d'un anticorps spécifique, la phosphorylation est inhibée (41).

L'hypothèse de départ de ma maîtrise était que le LG3 peut aussi contribuer au remodelage oblitérant en induisant un phénotype pro-migratoire sur les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et ce via les intégrines $\alpha2\beta1$ activant la voie ERK1/2. Afin d'approfondir la compréhension du rôle du LG3 dans l'intégration des MSC à la néointima, nous avons d'abord démontré que le LG3 induit à la fois la migration horizontale des MSC et la transmigration des MSC. Cette migration est dépendante de la voie de signalisation d'ERK1/2, précédemment identifiée comme voie centrale dans la formation de néointima (41, 78, 89, 90). De plus, nos résultats démontrent que la kinase Src est activée en amont de l'activation de la voie MAPK. La migration horizontale et la transmigration induites par le LG3 sont aussi dépendantes des intégrines $\alpha2\beta1$, ainsi que l'activation de la voie MAPK.

Dans un modèle de transplantation murin, nous avons également démontré que l'injection sérique de LG3 favorise l'accumulation de cellules positives pour α SMA dans la néointima. En outre, lorsque le receveur est déficient pour l'intégrine $\alpha2$, mais que le greffon est sauvage, la formation de néointima induite par l'injection de LG3 est diminuée dans le greffon suggérant que les cellules du receveur jouent un rôle important dans la formation de la néointima. Enfin, nous avons démontré que l'injection de LG3 augmente aussi le nombre de cellules positives pour la forme phosphorylée d'ERK1/2 (p-ERK1/2) dans la néointima du greffon et que cette accumulation est dépendante de la présence des intégrines $\alpha2\beta1$ chez les cellules du receveur. Lorsque le receveur est sauvage, il y a une augmentation du nombre de cellules positives pour p-ERK1/2. Nos résultats suggèrent donc que le LG3 est un fragment bioactif sur les cellules mésenchymateuses qui favorise leur migration et leur intégration au site d'injure vasculaire.

Grâce à l'utilisation de souris GFP+ et WT dans notre modèle murin de transplantations aortiques orthotopiques, nous avons démontré que le LG3 augmente le recrutement cellulaire en provenance du receveur. Le tableau 4 énumère les études de modèle animal qui ont identifié les cellules du receveur dans la néointima dans la vasculopathie du greffon (42, 44, 45, 56, 126). Il est cependant ardu de démontrer que ces cellules néointimales sont des MSC puisque ces dernières, tel que discuté plus loin, n'ont pas de signature protéique. Des résultats

de FACS *in vitro* nous ont confirmé l'expression de la GFP par les MSC lorsque celles-ci ont été isolées des souris positives pour GFP. C'est pourquoi, afin de démontrer le lien direct entre l'accumulation de MSC *in vivo* au site de néointima, il faudrait procéder à l'injection de celles-ci dans le receveur tout comme d'autres équipes l'ont fait. Récemment, Mazzani *et al.* a démontré l'intégration de MSC positives pour GFP au site de myotomie gastro-oesophagienne suite à leur injection dans un modèle de rat (127). Dans un modèle murin d'injure épithéliale tubulaire, l'équipe de Herrera *et al.* a démontré le tropisme au site d'injure rénale de MSC positives pour GFP préalablement isolées de moelle osseuse suite à leur injection intravéneuse (128). Ces résultats nous démontrent la possibilité d'injecter des MSC positives pour GFP et de les retracer par la suite.

Tableau 4 - Origine des cellules néointimales dans la vasculopathie du greffon

<i>Espèce</i>	<i>Organe transplanté</i>	<i>Cellules néointimales provenant du receveur (%)</i>	<i>Méthode de détection</i>
souris	aorte	≥ 95	LacZ
souris	aorte	majorité	Chromosome Y
souris	cœur	88	LacZ et GFP
souris	cœur	86	LacZ et chromosome Y
rat	cœur et aorte	≥ 95	chromosome Y

Adapté de (129)

1 Évaluation du potentiel migratoire des cellules souches mésenchymateuses

1.1 Potentiel migratoire des MSC

Le potentiel migratoire des MSC est bien documenté dans la littérature. Elles sont capables de se mobiliser dans la circulation sanguine en réponse à des injures telles qu'une brûlure aiguë, une injure musculo-squelettique ou en réponse à l'hypoxie (75-77). Elles possèdent aussi la capacité de différenciation en cellules musculaires lisses et en cellules endothéliales (60, 61).

Plusieurs facteurs chimio-attractants pour les MSC ont été identifiés, dont le platelet-derived growth factor (PDGF) (130). De plus, les cellules endothéliales apoptotiques sont pro-adhésives pour les MSC (131). Les leucocytes recrutés lors de l'apoptose endothéliale peuvent également sécréter des chimiokines capables d'attirer les MSC (132). Entre autre, dans la vasculopathie du greffon, l'expression du PDGF ainsi que celle de son récepteur sont augmentées aux sites de lésion (133). Le PDGF induit également *in vitro* la migration des MSC à la fois dans des expériences de transmigration et de migration horizontale (134).

Afin d'évaluer le potentiel migratoire des MSC suite à leur exposition au LG3, nous avons utilisé un milieu sans sérum (RPMI contrôle) et sans facteur de croissance. L'expérience du Wound Assay permet d'évaluer la migration horizontale des cellules adhérentes au plastique lorsqu'elles sont soumises au trait imitant une plaie. Lorsque les MSC humaines et murines sont exposées au LG3 recombinant dans un « Wound Assay » ou « Scratch Assay », elles migrent significativement plus vers l'espace de trait que lorsque les cellules sont incubées avec du SS seulement. Afin d'évaluer la capacité des cellules à trans migrer ou faire la diapédèse à travers ici des pores, l'essai de transmigration en chambre de Boyden est approprié. Les MSC humaines et murines sont significativement attirées lorsque la chambre inférieure contient du milieu sans sérum supplémenté avec du LG3 recombinant.

En réalité, *in vivo*, les MSC doivent traverser la couche de cellules endothéliales afin de pouvoir participer à la réparation de celle-ci. Afin de rapprocher le modèle de transmigration des MSC à la biologie vasculaire, il serait intéressant de se poser une question : est-ce que le LG3 facilite la transmigration des MSC à travers la couche de cellules endothéliales? Les mécanismes qui sous-tendent la diapédèse sont décrits principalement chez les lymphocytes. La diapédèse implique la chimioattraction, le roulement cellulaire, l'adhésion ferme et la transmigration. La transmigration des leucocytes à travers l'endothélium et la MEC requiert des mécanismes d'adhésion et de dégradation de matrice focale : les molécules d'adhésion sont nécessaires à l'attachement des leucocytes aux cellules endothéliales au site de diapédèse alors que des molécules de dégradation telles que les MMP sont importantes pour faciliter le mouvement des leucocytes à travers la barrière vasculaire (135). Les mécanismes qui sous-tendent la transmigration chez les MSC sont moins connus. Il a été démontré que la transmigration est dépendante des molécules d'adhésion VCAM-1/VLA-4 ainsi que de la

MMP-2 (136). Il a été également démontré que les MSC dégradent les jonctions adhérentes et serrées (137). Paradoxalement, il a été démontré *in vitro* que les MSC sont une source de TIMP-1 et -2, des molécules inhibitrices des MMP-9 et -2 respectivement (138). De plus, le milieu conditionné par les MSC protège les molécules de la MEC vasculaire et les structures endothéliales de la dégradation par les MMP (138). Cet effet est maintenu également lorsque les MSC ont été exposées à des cytokines pro-inflammatoires et à l'hypoxie, en augmentant l'expression de TIMP-1 et ainsi l'inhibition des MMP (138).

En résumé, ce qui a été démontré jusqu'à maintenant est que les MSC sont capable de transigrer à travers une couche de cellules endothéliales en adhérant à celle-ci et en sécrétant des MMP-2 afin de dégrader les jonctions cellulaires. Le rôle inhibiteur ou protecteur des MSC sur la dégradation des molécules de la MEC vasculaire a aussi été démontré. Or, dans le contexte du rejet vasculaire, on observe une accumulation de MSC sous la couche endothéliale. Pour s'y retrouver, les MSC doivent effectuer la diapédèse entre les cellules endothéliales. La dégradation des jonctions cellulaires par les MMP est un phénomène qui facilite ceci (135). Je me questionne donc à savoir si le LG3 faciliterait la diapédèse des MSC entre les cellules endothéliales en diminuant l'expression des TIMP chez celles-ci ou en augmentant l'expression de MMP-2. Ces deux phénomènes auraient pour effet d'augmenter l'activité des MMP et ainsi augmenter la dégradation des composantes de la membrane basale et faciliter la diapédèse des MSC à travers l'endothélium.

Il serait donc intéressant d'étudier la possibilité de régulation de l'expression et la sécrétion des TIMP et des MMP par les MSC exposées au fragment LG3. Pour ce faire, il s'agit de mettre une couche de cellules endothéliales sur la paroi supérieure de la chambre de Boyden et d'incuber les MSC avec le LG3 avant de les déposer sur la couche endothéliale de la chambre supérieure. En parallèle, il faudrait regarder le niveau de sécrétion de TIMP-1 et -2 ainsi que MMP-2 basal lorsque les cellules sont en milieu de croissance, en déprivation de facteur de croissance et en déprivation de facteur de croissance supplémenté de LG3 recombinant. Ainsi, il serait possible de tester la capacité des MSC à dégrader la MEC sécrétée par les cellules endothéliales et à passer entre les cellules endothéliales pour atteindre le gradient de chimiokine de la chambre inférieure.

1.2 Activation de la voie ERK1/2 nécessaire à la migration

La voie des MAPK est une voie classique de signalisation importante pour la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (139). Chez les cellules mammaires cancéreuses, l'activation d'ERK1/2 mène à l'expression des composantes Fra-1 et c-Jun de la protéine activatrice-1 (activator protein-1 AP-1) qui sont nécessaires pour leur migration cellulaire (140). À l'opposé, ERK1/2 n'est pas impliqué dans la migration des CVML induite par l'ostéopontine (141). Dans ce procédé migratoire, JNK et p38 MAPK jouent un rôle central (141). Ryu *et al.* ont démontré que suite à la stimulation par le SDF-1, la migration est dépendante des voies de signalisation de PI3K/Akt, ERK et p38 MAPK chez les MSC dérivées de sang de cordon ombilical (142). De ce fait, le knockdown de Akt, Erk ou p38 inhibe ce phénotype migratoire (142).

Pour démontrer l'importance de la voie ERK1/2 pour la migration des MSC *in vitro*, nous avons d'abord démontré qu'à la dose de LG3 recombinant qui induit la migration, il y a phosphorylation d'ERK1/2. La migration horizontale des MSC est inhibée lorsque les cellules sont exposées au LG3 recombinant et à l'inhibiteur biochimique de MEK1/2 (PD98059). De plus, la transmigration des MSC est aussi diminuée de façon significative lorsque les cellules sont exposées à cet inhibiteur. Deux approches en biologie moléculaire auraient été intéressantes ici : l'utilisation de cellules avec des siERK1/2 ou shERK1/2 et l'utilisation d'un dominant négatif pour ERK1/2. Ces deux méthodes sont des alternatives complémentaires à l'utilisation de l'inhibiteur biochimique utilisé *in vitro*. Les siRNA ou shRNA ont l'avantage d'agir au niveau de l'ARN messager, ce qui offre une plus grande précision de l'inhibition de la cible que les inhibiteurs biochimiques. La méthode est plus ardue et demande beaucoup de mise au point du protocole. Les niveaux de protéines exprimés sont très faibles voir nuls lorsque la transfection est efficace. Les inhibiteurs biochimiques inhibent la protéine seulement une fois exprimée et ils peuvent avoir plusieurs cibles.

Src est une protéine tyrosine kinase qui joue un rôle important dans la signalisation intracellulaire impliquée dans la division cellulaire, la motilité, l'adhésion et la survie de cellules normales et cancéreuses (143). Src est une protéine cytoplasmique de 60kDa de la

famille des protéines non-associées aux récepteurs tyrosine kinase (143). c-Src, le proto-oncogène présent dans les cellules de mammifères normales, possède 4 domaines SH (Src homology domains) différents. Entre autre, le domaine SH2 est spécifique pour les interactions avec les résidus de tyrosine phosphorylés alors que le domaine SH3 sert pour les interactions protéine-protéine via la liaison aux peptides riches en prolines (143). L'activation aberrante de c-Src régule plusieurs fonctions pendant la progression tumorale telles que l'apoptose, la prolifération, l'adhésion cellulaire, la migration et l'invasion cellulaire, l'angiogénèse et la métastase (143). Il existe 9 kinases de la famille Src (SFK) partageant une structure similaire mais ayant des niveaux d'expression différents selon les tissus : c-Src, Yes, Fyn, Lyn, Lck, Hck, Fgr, Blk et Yrk (144). c-Src est capable de réprimer l'attachement des intégrines à la MEC via la phosphorylation des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$ (145, 146), en plus d'inhiber les fonctions de RhoA (147) et d'activer FAK, R-Ras et phosphatidylinositol phosphate 3-kinase (PI3K) (148) pour permettre la déstabilisation des adhésions focales et l'assemblage de l'actine et ainsi promouvoir la migration. SFK, FAK et pyk2 sont des molécules de signalisation en aval des intégrines $\beta 1$; pyk2, Src, Fyn et PI3K ont été identifiés dans la transduction du signal anti-apoptotique induit par le LG3 chez les fibroblastes (101, 149).

Nous avons donc évalué la phosphorylation de Src chez les MSC exposées au fragment LG3. Le LG3 induit *in vitro* la phosphorylation de Src à un temps plus précoce que la phosphorylation d'ERK1/2 et lorsqu'un inhibiteur biochimique sélectif pour Src (PP2) est utilisé, la phosphorylation d'ERK1/2 induite par le LG3 est inhibée. De plus, la migration horizontale des MSC induite par le LG3 est inhibée lorsque les cellules sont exposées au PP2. Ces résultats suggèrent que le LG3 induit la phosphorylation de Src qui ensuite induit la phosphorylation de la voie MAPK, toutes deux nécessaires au phénotype pro-migratoire. L'utilisation de MSC déficiente pour Src isolées de souris Src *-/-* serait un modèle *in vitro* intéressant pour valider les résultats obtenus avec les inhibiteurs biochimiques. Il serait alors intéressant de s'assurer qu'en absence de Src, le LG3 n'est pas capable d'induire la phosphorylation d'ERK1/2, tel que démontré avec les inhibiteurs biochimiques. L'utilisation de MSC isolées de souris Src *-/-* offre l'avantage d'être plus précis dans l'inhibition de Src :

les inhibiteurs biochimiques tel que PP2 peuvent inhiber d'autres kinases de la famille de Src alors que le knock-out du gène cible Src seulement.

1.3 Le LG3, un fragment chimiotactique

Tel que discuté dans ce mémoire, mes résultats *in vitro* démontrent que le fragment LG3 est un fragment chimiotactique bioactif sur les MSC qui favorise le remodelage vasculaire post-greffe dans un modèle de transplantation d'allogreffe aortique murin. Chez l'humain, il est connu que le LG3 sérique est un marqueur de rejet vasculaire aigu (46). De plus, les patients greffés rénaux atteints de rejet vasculaire aigu ont des niveaux d'anticorps anti-LG3 pré et post-transplantation plus élevés que les patients avec un greffon stable ou un rejet tubulo-interstitiel (14). Cela suggère que le fragment LG3 sérique serait présent avant la transplantation et servirait de néo-antigène pour la formation d'anti-LG3. Ces données soulèvent une nouvelle hypothèse : est-ce que le LG3, si présent avant la transplantation, peut conditionner les cellules du receveur, les MSC par exemple, de telle sorte que celles-ci sont plus aptes à s'accumuler dans le greffon après la transplantation et ainsi contribuer à l'oblitération vasculaire plutôt qu'au phénomène d'accommodation endothéliale? Hypothétiquement, le dommage vasculaire avant la greffe, qu'il soit causé par l'hémodialyse ou autre, pourrait libérer le fragment LG3. L'interaction LG3-MSc enclencherait la réponse anti-apoptotique de celles-ci, augmenterait leur potentiel migratoire et leur potentiel d'intégration ce qui aurait pour effet d'intensifier leur accumulation au site de dommage endothélial suite à une seconde insulte vasculaire soit la transplantation.

Pour tester cette hypothèse *in vivo*, j'utiliserais notre modèle murin de rejet vasculaire. J'incuberais des MSC isolées de souris transgéniques GFP-positives (afin de les retracer dans le greffon) avec le LG3 recombinant ou son véhicule *in vitro*, pour ensuite les injecter iv à des souris receveuses d'allogreffe aortique avant les transplantations. À des temps variés post-transplantation, j'évaluerais la formation de néointima ainsi que la proportion de cellules positives pour GFP dans celle-ci, signe d'incorporation des cellules injectées iv. La présence accrue de MSC-GFP dans la néointima des souris injectées avec des MSC traitées au LG3 indiquerait que le LG3 présent pré-transplantation augmente la capacité de migration et d'intégration des MSC vers le site de remodelage vasculaire dans le greffon.

Parallèlement, toujours avec le modèle de transplantation aortique, je voudrais induire un dommage vasculaire à l'extérieur du greffon avant la greffe afin de voir si, d'une part, le LG3 sérique est augmenté et si, d'autre part, le dommage vasculaire pré-greffe potentialise la vasculopathie du greffon. L'ischémie d'un membre postérieur, la destruction mécanique d'une artère à l'aide d'un fil mécanique ou d'un ballon sont des méthodes qui pourraient servir pour induire le dommage initial. Par la suite, j'effectuerais des transplantations aortiques orthotopiques avec des souris receveuses GFP-positives et des donneuses WT. À des temps variés post-transplantation, j'évaluerais l'infiltration, la formation de néointima et la proportion de cellules positives pour l' α SMA et pour GFP dans celle-ci, signe d'incorporation des cellules dérivées du receveur. La présence augmentée de cellules provenant du receveur dans les souris ayant un dommage endothélial pré-greffe et présentant des taux sériques de LG3 plus élevés indiquerait que le dommage vasculaire pré-greffe contribue à l'augmentation du LG3 sérique pré-greffe et à l'augmentation de la sévérité du remodelage vasculaire post-greffe. S'il était possible de neutraliser les niveaux de LG3 sérique suite à la première insulte vasculaire avant la greffe, et ainsi comparer la présence et l'absence des taux de LG3 pré-greffe sur la formation de néointima dans le greffon post-greffe et la sévérité du rejet vasculaire, alors nous pourrions établir un lien entre le LG3 et l'amplification du rejet vasculaire.

2 Le LG3 dans le remodelage vasculaire

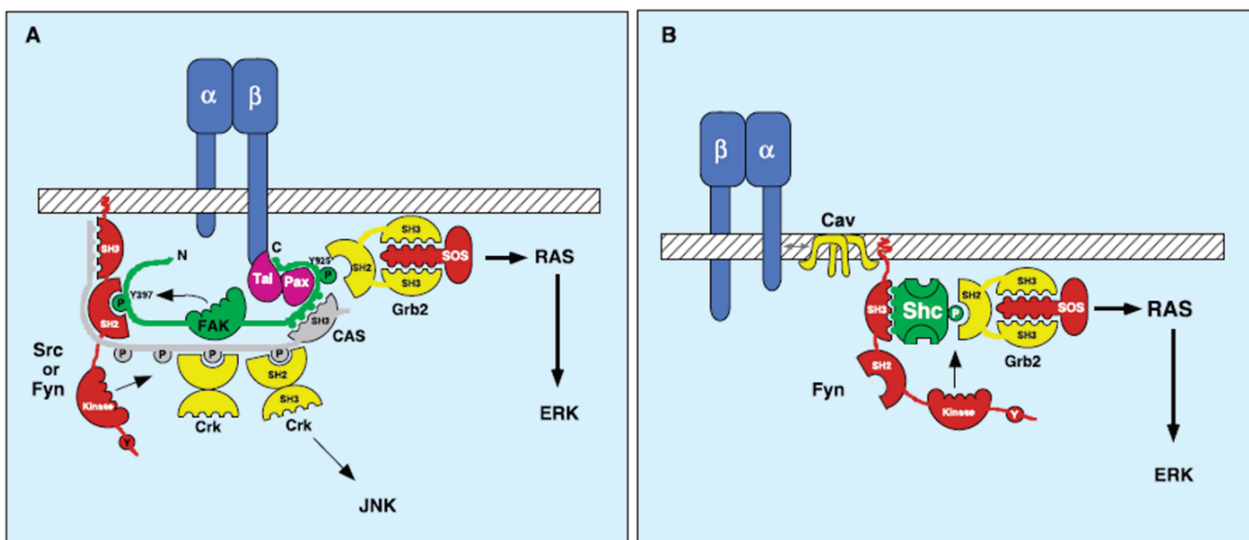
2.1 Évaluation de l'importance des intégrines α 2 β 1 dans le phénotype migratoire

Tel que mentionné précédemment, le LG3 est connu pour interagir avec l'intégrine α 2 β 1 chez les fibroblastes afin d'induire le phénotype anti-apoptotique ainsi qu'avec l'intégrine β 1 pour induire le phénotype anti-apoptotique chez les CVML et les MSC (41, 78, 101). L'évaluation du rôle des intégrines dans la migration induite par le LG3 chez les MSC s'est effectuée de deux façons. Pour l'évaluation de l'intégrine β 1 dans le Wound Assay, les MSC ont été exposées à un anticorps neutralisant contre cette intégrine. La migration horizontale induite par le fragment LG3 est significativement diminuée lorsque l'intégrine β 1 est inhibée. Ensuite,

puisque la sous-unité $\beta 1$ peut se lier avec plusieurs autres sous-unités α , la migration horizontale de MSC isolées de souris $\alpha 2^{-/-}$ exposées au LG3 recombinant a aussi été évaluée. Cette migration est significativement diminuée par rapport au MSC isolées de souris sauvages. De plus, lorsque ces deux types de MSC murines ont été testés en transmigration, les MSC $\alpha 2^{-/-}$ ne transmigrent pas à travers les pores de la chambre de Boyden en réponse au gradient de LG3 alors que les MSC sauvages le font. En outre, la phosphorylation d'ERK1/2 induite par le LG3 est aussi inhibée lorsque les MSC sont déficientes pour l'intégrine $\alpha 2^{-/-}$. Ces résultats suggèrent que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est nécessaire pour l'induction du phénotype promigratoire chez les MSC et pour l'activation de la voie MAPK *in vitro*. Il serait intéressant ici d'utiliser les souris déficientes pour Src comme receveuses dans ce modèle de transplantation et d'évaluer la formation de néointima suite aux injections de LG3. Avec les résultats obtenus *in vitro*, l'absence de Src dans les cellules des souris receveuses se traduirait en une diminution de la formation de la néointima chez les souris transgéniques injectées au LG3 comparativement à celles WT injectées au LG3.

Les intégrines ne possèdent pas d'activité catalytique intrinsèque, le signal intracellulaire se fait donc via des protéines associées aux intégrines (150). FAK est principalement recrutée aux sites de regroupement des intégrines $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ via des interactions entre son domaine C-terminal et les protéines associées aux intégrines telles que la taline et la paxilline (150). La phosphorylation de la tyrosine 397 induite par le recrutement aux intégrines crée un site d'affinité très élevée pour le domaine SH2 de Src (150). Le complexe FAK-Src peut phosphoryler ses deux cibles principales la paxilline et p130Cas ce qui crée de nouveaux sites de liaison avec les domaines SH2 de la protéine adaptatrice Crk et/ou de Grb2 (151). Par contre, FAK n'est pas impliquée dans l'activation de Src en aval des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et les mécanismes permettant cette activation sont encore inconnus (152). Dans le complexe FAK-Src, Src peut phosphoryler la tyrosine 925 de FAK et ainsi créer un site de liaison pour la protéine adaptatrice Grb2 (150). Grb2 lie le facteur d'échange SOS (Son of Sevenless) qui active la GTPase Ras et la kinase Raf (150). Ces derniers peuvent ensuite phosphoryler MEK1 qui phosphoryle à son tour ERK1/2 (150).

En plus d'activer FAK, quelques intégrines $\beta 1$ et αv peuvent aussi activer la tyrosine kinase Fyn et ainsi activer la protéine adaptatrice Shc via des sites riches en proline qui lient les domaines SH3 de Fyn (153). Dans cette signalisation, caveolin-1 semble lier la sous-unité α de l'intégrine à Fyn (154). La tyrosine 317 de Shc phosphorylée par Fyn lie le complexe Grb2-SOS ce qui active la cascade des MAPK (154). En résumé, que l'activation du complexe Grb2-SOS provienne du complexe FAK/Src ou de Fyn/Shc, il en résulte de l'activation de Ras et ERK1/2 (154). Dans le contexte de la signalisation des intégrines $\alpha 2\beta 1$ induite par le LG3, les études suggèrent que le complexe FAK/Src soit responsable de l'activation puisque l'inhibition de Src inhibe la phosphorylation d'ERK1/2 et le phénotype de migration. La figure 8 schématise les événements de liaisons décrits ci-haut.



Giancotti FG and Ruoslahti E. Science. 285, 1028 (1999)

Figure 8 - Schéma de la signalisation en aval des intégrines

N : NH₂-terminal; C : COOH-terminal; Y397 : Tyr³⁹⁷; P : Phosphotyrosine; Y : Tyrosine; Cav : Cavéoline-1

2.2 Le LG3 dans un modèle de rejet vasculaire

L'équipe du Dr Hébert a précédemment démontré que dans un modèle murin de rejet vasculaire, le LG3 accélère la formation de néointima (41). En effet, lorsque les souris

receveuses d'allogreffe aortique sont injectées avec du LG3 recombinant, elle observe à trois semaines significativement plus de remodelage vasculaire : ratios intima-média plus élevés, accumulation de cellules positives pour α SMA dans la néointima et dé-cellularisation de la média (41). Ces changements sont comparables à ceux observés chez les receveuses d'allogreffe non injectées à 9 semaines, ce qui suggèrent que l'accélération du remodelage vasculaire est induit par le LG3 (41).

Similairement, lorsque nous avons injecté du LG3 recombinant à des souris receveuses d'allogreffe aortique orthotopique, nous observons une accumulation de cellules positives pour l' α SMA dans la néointima, ainsi qu'une perte de ce marquage dans la média ce qui indique aussi la dé-cellularisation de celle-ci. De plus, lorsque la souris receveuse exprime le GFP de façon ubiquitaire, on observe la présence de cellules positives pour GFP dans la néointima. Ces résultats suggèrent que l'injection de LG3 recombinant augmente l'accumulation de cellules dérivées du receveur dans la néointima.

Il est à noter que la dé-cellularisation, bien que présente, est difficile à observer lorsque le greffon sauvage est transplanté dans une souris receveuse exprimant la protéine GFP de façon ubiquitaire puisque les limitantes élastiques sont auto-fluorescentes. Pour améliorer la qualité de l'expérience et mieux voir les cellules néointimales du receveur, nous avons essayé d'utiliser la méthode de fluorescence et d'hybridation *in situ* (FISH) contre le chromosome murin Y en transplantant des greffons issus de souris femelles chez des receveurs mâles sans succès. La sonde pour le chromosome Y murin fournie par une compagnie n'étant pas au point au moment de nos expériences, nous n'avons eu aucun succès malgré plusieurs tentatives. Nous aurions aussi pu réaliser les transplantations à l'inverse, c'est-à-dire introduire un greffon GFP+ dans un hôte GFP- et ainsi observer la perte ou l'absence de fluorescence dans la néointima. Puisque les souris GFP+ à ma disposition exprimait le GFP de façon ubiquitaire, j'aurais aussi pu réaliser les transplantations de la même façon à l'exception de la méthode de collecte des aortes lors du sacrifice. Au lieu de les cryopréserver, il aurait s'agit de les mettre dans la paraffine puis sur lames afin de procéder à la technique d'immunohistochimie contre le GFP. Cette méthode n'aurait certes pas éliminé la présence du GFP dans l'adventice (puisque celui-ci est aussi composé de l'infiltrat immunitaire du receveur et peu comporter du tissu du

receveur) mais elle aurait toutefois éliminé la coloration de l'aorte sauvage et aurait mis en évidence la coloration de la néointima.

Pour valider l'importance des intégrines $\alpha2\beta1$ dans la formation de néointima, nous avons utilisé des souris receveuses déficientes pour l'intégrine $\alpha2$. Nous avons démontré que lorsque les souris receveuses sont sauvages (WT), l'injection de LG3 recombinant augmente la formation de néointima. De plus, le pourcentage de cellules positives pour p-ERK1/2 est augmenté dans cette néointima. Par contre, lorsque les souris receveuses sont déficientes pour l'intégrine $\alpha2$, donc lorsque l'interaction du LG3 avec l' $\alpha2\beta1$ ne peut se faire, la formation de néointima est diminuée et le pourcentage de cellules positives pour p-ERK1/2 est diminué. Il serait par ailleurs intéressant de démontrer que ces receveurs déficients pour l'intégrine $\alpha2$ développent de la néointima à 9 semaines, mais que les injections de LG3 recombinant ne provoquent aucun effet accélérateur. Néanmoins, les résultats présents suggèrent que le remodelage vasculaire est dépendant du receveur : les cellules du receveur doivent exprimer l'intégrine $\alpha2\beta1$ et donc interagir avec le LG3 pour qu'il y ait phosphorylation d'ERK1/2 et augmentation du remodelage vasculaire dans le greffon.

Le fait que le LG3 n'induit pas la formation de néointima lorsque la souris receveuse est déficiente pour l'intégrine $\alpha2$ est intéressant aussi du point de vue immunologique. L'intégrine $\alpha2\beta1$ a d'abord été identifiée comme une intégrine exprimée à des stades tardifs de l'activation des cellules T d'où son nom very late activation antigen-2 (VLA-2) (155). D'ailleurs, les cellules T activées infiltrantes dans une variété d'environnements inflammatoires chroniques expriment l'intégrine $\alpha2\beta1$ alors que les cellules T naïves ne l'expriment pas (155). La prolifération cellulaire induite par le TCR (récepteur des cellules T) et la sécrétion de cytokine sont augmentées lorsque l'intégrine $\alpha2\beta1$ adhère au collagène (155). Mais l'expression de l' $\alpha2\beta1$ n'est pas limitée aux cellules T activées dans le système immunitaire : les cellules NK (natural killer) en expriment de hauts niveaux (156) et des sous-populations de monocytes et neutrophiles en expriment aussi (155). Arase et al. ont démontré que des populations de cellules NK exprimant ou non l'intégrine $\alpha2\beta1$ sont présentes dans la rate et que cette intégrine pourrait être impliquée dans la biogénèse de ces cellules (156). La fonction exacte de la présence de cette intégrine sur les neutrophiles et les monocytes est

moins claire. Des études suggèrent que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ pourrait jouer un rôle dans l'adhésion leucocytaire et l'extravasation de la vasculature vers les tissus périphériques (157-159).

Les résultats obtenus par l'équipe du Dr Zutter ont démontré que l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est exprimée chez certaines populations de cellules T (CD3+, CD4+ ou CD8+), de cellules B (B220+), de cellules NK (CD122+), de neutrophiles (Gr1+) ainsi que chez les monocytes/macrophages (F4/80+) (155). Chez les souris déficiente pour l'intégrine $\alpha 2$, les pourcentages relatifs et les nombres absolus de ces types cellulaires sont similaires à ceux des animaux sauvages (155). De plus, la microarchitecture de la rate, des ganglions lymphatiques, du thymus et des plaques de Peyer est normale (155). Ces résultats suggèrent que l'hématopoïèse ne requiert pas la présence des intégrines $\alpha 2\beta 1$ (155). Lorsque ces souris déficientes en $\alpha 2$ sont infectées avec du *Listeria monocytogenes*, un modèle bactérien pour tester l'immunité innée et acquise, les souris démontrent une faible habilité à contrôler le pathogène initialement (155). Par contre, ces souris démontrent des signes d'élimination de la bactérie dans les stades plus avancés de l'infection (155).

En rejet vasculaire, le système immunitaire est un obstacle majeur. Les résultats de l'équipe du Dr Zutter suggèrent que le faible remodelage observé dans nos expériences chez les souris receveuses d'allogreffe déficientes pour l'intégrine $\alpha 2$ reflète non pas une déficience du système immunitaire qui causerait une diminution de l'inflammation et du rejet, mais plutôt l'effet de l'absence de l'interaction du LG3 avec cette intégrine sur les cellules du receveur qui s'accumulent dans la néointima. Cependant, pour distinguer ces deux effets, un modèle de délétion de l'intégrine $\alpha 2$ chez les MSC du receveur seulement serait intéressant. Puisque les MSC ne possèdent pas de signature protéique, le système Cre-lox pour l'intégrine $\alpha 2$ ne peut pas servir ici. Ce qui pourrait être réalisé, c'est l'injection de MSC isolées de souris $\alpha 2$ -/- GFP+ ou WT-GFP+, en plus du LG3 recombinant, dans notre modèle de transplantation d'allogreffe aortique murin chez des souris receveuses WT. Les souris receveuses WT présentant une forte néointima dans le greffon positive pour GFP devraient être celles qui ont reçu les MSC isolées de souris WT-GFP+ en plus des injections de LG3. Alors que celles qui devraient montrer la plus faible accumulation de cellules GFP+ dans la néointima seraient celles qui ont reçu les injections de MSC $\alpha 2$ -/- en plus des injections de LG3.

2.3 Le LG3 dans d'autres modèles de remodelage vasculaire

Tel que mentionné précédemment, la vasculopathie du greffon partage plusieurs facteurs de risque avec l'athérosclérose (21). Il est fréquent que les receveurs d'une allogreffe cardiaque souffrent d'hyperlipidémie, et ce avant même la transplantation (21). L'hypercholestérolémie, dans un modèle de transplantation hétérotopique de cœur chez le lapin, est associée à la vasculopathie du greffon, et les artères coronariennes transplantées sont plus fortement atteintes par l'hypercholestérolémie que les artères coronariennes natives (160, 161). L'hypercholestérolémie augmente les changements fibro-adipo-prolifératifs observés chez les patients souffrant de la vasculopathie du greffon (160).

L'équipe du Dr Zutter a démontré, tel que discuté précédemment dans ce mémoire, que les interactions collagène-intégrines $\alpha 2\beta 1$ sont impliquées dans la formation de thrombus dans un modèle murin d'athérosclérose lorsqu'il y a un dommage endothélial induit précédemment (121). L'équipe du Dr Xu a démontré que les premiers événements cellulaires dans un greffon d'un modèle de transplantation murin de veine sont la mort cellulaire, par apoptose ou par nécrose, suivi de l'inflammation et de la prolifération cellulaire dans le greffon ce qui facilite l'accélération de l'athérosclérose dans ce même greffon (162, 163). Cette équipe a également démontré que des cellules souches (phénotypiquement très similaires à des MSC) se trouvant dans l'adventice veineux du greffon chez une souris ApoE déficiente participaient à la formation de néointima athérosclérotique (164). Étant donné que les patients en attente de greffe présentent des facteurs de risque communs à l'athérosclérose et que les deux pathologies (l'athérosclérose et la vasculopathie du greffon) présentent du remodelage vasculaire accru, il serait pertinent d'évaluer le rôle du LG3 sur l'accumulation des cellules souches mésenchymateuses dans un modèle animal d'athérosclérose. On peut émettre l'hypothèse que le LG3 participe à la pathogénèse de cette maladie et que les cellules mésenchymateuses contribuent au remodelage vasculaire observé dans celle-ci.

Dans un premier temps, il serait intéressant d'évaluer les niveaux de LG3 plasmiqes, indicateurs de remodelage vasculaire, dans un modèle murin double transgénique ApoE et LDLR déficients. La combinaison des mutations au niveaux de l'ApoE ainsi que du récepteur LDL permet la formation de plaques athérosclérotiques très similaires à celles retrouvées chez

l'humain sans biaiser les niveaux de cholestérols circulants qui nécessitent un changement de diète (21). Dans le cas où la détection de LG3 est augmentée chez les souris présentant un remodelage métabolique, il serait intéressant d'évaluer la participation des cellules souches mésenchymateuses à la formation de plaques athérosclérotiques et d'évaluer l'effet du LG3 sur l'accumulation de ces cellules dans la formation de néointima. Il est difficile d'identifier les MSC à l'aide de marqueurs de surfaces en immunohistochimie puisqu'elles ont des phénotypes très hétérogènes. Cependant, il est possible d'utiliser des MSC GFP-positives isolées de souris de même souche, de les incuber en présence de LG3 ou du véhicule, puis de les injecter iv chez les souris ApoE^{-/-} LDLR^{-/-}. Ou encore, irradier les cellules de la moelle osseuse des souris, les remplacer par des cellules de moelle de souris isogéniques exprimant la GFP ubiquitaire et ensuite procéder à l'injection iv de LG3 recombinant ou du véhicule. Lors de l'évaluation de la formation de néointima, il serait possible d'identifier les cellules injectées, d'évaluer si le LG3 augmente l'accumulation des MSC au site de plaques et même s'il accélère l'intégration des MSC à celle-ci.

On peut émettre aussi l'hypothèse que le LG3 influence le remodelage vasculaire induit par un dommage mécanique sévère. Religa *et al.* ont démontré que suite à une injure de type mécanique dans la carotide avec un ballon (balloon-injury), la majorité des cellules qui participent à la formation de néointima et qui expriment l' α SMA sont des cellules dérivées de la moelle osseuse (165). De plus, les résultats des études sur l'intensité du dommage vasculaire induit mécaniquement et la provenance des cellules de la néointima, réalisées par Tanaka *et al.*, suggèrent que le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse au site de remodelage vasculaire implique l'inflammation vasculaire et que plus l'insulte est sévère, plus les cellules dérivées de la moelle osseuse contribuent à la néointima (57). Ici aussi, l'évaluation des niveaux de LG3 sériques serait pertinente dans les modèles animaux avec du dommage induit par un ballon dans la carotide ou un fil de métal. De plus, il serait intéressant de vérifier si l'augmentation des niveaux de LG3 sérique par injection accélère le remodelage vasculaire induit mécaniquement et accentue aussi l'accumulation des cellules α SMA dérivées de la moelle osseuse.

3 Le LG3 et la différenciation chez les cellules souches mésenchymateuses

3.1 La calcification vasculaire et la néphropathie chronique

La calcification vasculaire est fréquente chez les patients atteints de néphropathie chronique et est associée à une forte morbidité et mortalité (166). Cette pathologie est caractérisée par la déposition anormale de calcium dans les parois artérielles des vaisseaux sanguins, procédé qui est accéléré dans un environnement en surplus de calcium, de phosphore et de remodelage osseux anormal tel que retrouvé lors de la dialyse (166). La calcification vasculaire contribue à la rigidité des parois vasculaires et réduit la compliance vasculaire, ce qui augmente les risques de complications cardiovasculaires (167).

Il est généralement accepté dans la littérature que les CVML se différencient en chondrocytes ou ostéoblastes et participent à la déposition de calcification (166, 168). Or, de nouvelles études démontrent que les MSC sont essentielles pour le remodelage de la matrice extracellulaire associé à la calcification vasculaire chez les patients atteints de néphropathie chronique (169, 170). Les MSC se caractérisent par leur capacité à se différencier en ostéoblastes et à déposer le calcium (59) en plus d'être capables de se différencier en CVML (61).

3.2 Le potentiel de différenciation des MSC

Étant donné que les patients en attente de greffe rénale dialysés développent plus de calcification vasculaire que les patients normaux (171), que les patients receveurs d'une allogreffe rénale ont des niveaux de LG3 urinaires plus élevés (102) et que l'urémie induit la différenciation des MSC humaines en ostéoblastes et l'expression de gènes liés à l'ostéogénèse tels que le récepteur de BMP-2, la phosphatase alcaline, l'ostéopontine et Runx2 (169), il est intéressant de s'interroger sur le rôle du LG3 sur la différenciation des MSC en ostéocytes/ostéoblastes.

Dans ce mémoire, j'ai démontré que le LG3 induit la migration et la transmigration des MSC via les interactions avec les intégrines $\alpha 2\beta 1$, ce qui a pour effet d'activer la voie ERK1/2. De façon très intéressante, des études récentes démontrent que l'expression accrue de l'intégrine $\alpha 2$ chez des MSC humaines isolées de patients atteints d'ostéoporose sénile promeut la différenciation ostéogénique via la voie ERK1/2 (172). De plus, Gandavarapu *et al.* ont démontré que l'adsorption de protéines de la MEC dans des gels de phosphates fonctionnalisés de sérum promeut la différenciation ostéogénique des MSC de façon dépendante de la phosphorylation de FAK (173). Similairement, Becerra-Bayona *et al.* ont démontré qu'en présence de fibrinogène ou de laminine-1, des MSC augmentent l'expression d'ostéocalcine et d'ostérix, ce dernier étant un facteur de transcription propre aux ostéoblastes requis pour l'ostéogénèse (174).

Afin d'interroger le potentiel de différenciation des MSC en présence du LG3 *in vitro*, il serait intéressant d'incuber les cellules en cultures dans un milieu supplémenté de LG3 et suivre le profil de différenciation pour ensuite effectuer une coloration des sels de calcium à l'Alizarine. Il serait aussi pertinent de mesurer l'expression du récepteur de BMP-2, de la phosphatase alcaline, de l'ostéopontine et de Runx2 par ELISA. Dans le cas où le LG3 induit la différenciation ostéogénique des MSC, j'irais étudier les effets *in vivo* avec un modèle d'athérosclérose (ApoE et LDLR déficient) chez qui l'induction de l'urémie est produite. Il a précédemment été démontré que ces souris présentent de la calcification vasculaire (166). Il serait alors pertinent de regarder si l'augmentation sérique de LG3 recombinant induit l'accélération de cette calcification. Il serait aussi intéressant de regarder le phénomène de calcification vasculaire dans un modèle de rejet vasculaire aortique. Chez les souris receveuses d'allogreffe aortique, est-ce que l'injection de LG3, pré-greffe ou post-greffe tout dépendant de la question, augmente l'incidence de calcification vasculaire? On peut aussi vouloir regarder la contribution des MSC aux sites de calcification. Il s'agirait de prendre des MSC-GFP+ pré-incubées avec du LG3 recombinant ou son véhicule, de les injecter à des souris transplantées et de suivre leur accumulation potentielle aux sites de calcification en plus d'évaluer la déposition de calcium et de phosphore.

CONCLUSION

L'exploration du rôle du fragment LG3 sur les cellules souches mésenchymateuses dans le contexte du rejet vasculaire a permis d'approfondir la compréhension de son rôle dans l'intégration des MSC à la néointima. Lors de l'apoptose endothéliale soutenue, le fragment C-terminal du perlécan nommé LG3, une matricryptine biologiquement active sur les cellules de la paroi vasculaire, est libéré. Nous avons démontré que le LG3 induit à la fois la migration horizontale des MSC et la transmigration des MSC de façon dépendante de l'activation de la kinase Src et de la voie de signalisation d'ERK1/2. Les deux types de migration induites par le LG3 sont aussi dépendantes des intégrines $\alpha2\beta1$. Dans un modèle de transplantation murin, l'injection sérique de LG3 favorise l'accumulation de cellules positives pour α SMA dans la néointima. De plus, lorsque le receveur est déficient pour l'intégrine $\alpha2$, mais que le greffon est sauvage, la formation de néointima induite par l'injection de LG3 est diminuée dans le greffon ce qui démontre que l'accumulation de cellules du receveur joue un rôle important dans la formation de la néointima. Enfin, l'injection de LG3 sérique augmente aussi le nombre de cellules positives pour la forme phosphorylée d'ERK1/2 (p-ERK1/2) dans la néointima du greffon et cette accumulation est dépendante de la présence des intégrines $\alpha2\beta1$ chez les cellules du receveur. Nos résultats démontrent donc que le LG3 est un fragment bioactif sur les cellules mésenchymateuses qui favorise leur migration et leur intégration au site d'injure vasculaire.

Mon travail éclaire les mécanismes qui sous-tendent l'accumulation de cellules souches mésenchymateuses au site de néointima oblitérante menant à la perte de fonction du greffon à long terme. L'investigation de ces mécanismes dans le remodelage vasculaire expose de nouvelles opportunités pour inhiber la réponse cellulaire qui mène au remodelage inadapté lors d'un dommage vasculaire chronique et ainsi prolonger la survie du greffon.

BIBLIOGRAPHIE

1. Transplantation RdRe. L'histoire de la transplantation 2012 [19 juin 2013]. Available from: <http://www.fondation-centaure.org/fr/sciences/histoire.php>.
2. Murphy KP, Travers P, Walport M, Janeway C. Janeway's immunobiology. 7th ed. New York: Garland Science; 2008. xxi, 887 p. p.
3. Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. Annual review of pathology. 2008;3:189-220. PubMed PMID: 18039144.
4. Mitchell RN, Libby P. Vascular remodeling in transplant vasculopathy. Circulation research. 2007 Apr 13;100(7):967-78. PubMed PMID: 17431198.
5. Kumar V, Robbins SL. Robbins basic pathology. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2007. xiv, 946 p.
6. 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. American Journal of Transplantation. 2010;10(3):464-71.
7. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2009. xiv, 1450 p.
8. 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. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2005 Aug;5(8):1827-36. PubMed PMID: 15996229.
9. Jabs WJ, Meier M, Lamprecht P, Steinhoff J, Nitschke M. Local expression of C-reactive protein is associated with deteriorating graft function in acute and chronic failure of kidney transplants. Nephron Clinical practice. 2011;117(4):c390-7. PubMed PMID: 21071964. Epub 2010/11/13. eng.
10. Cantaluppi V, Quercia AD, Dellepiane S, Figliolini F, Medica D, De Lena M. [New mechanisms and recent insights in the pathogenesis of acute kidney injury (AKI)]. Giornale italiano di nefrologia : organo ufficiale della Societa italiana di nefrologia.

- 2012 Sep-Oct;29(5):535-47. PubMed PMID: 23117735. Epub 2012/11/03. Nuovi meccanismi e recenti acquisizioni nella patogenesi del danno renale acuto. ita.
11. Nakorchevsky A, Hewel JA, Kurian SM, Mondala TS, Campbell D, Head SR, et al. Molecular mechanisms of chronic kidney transplant rejection via large-scale proteogenomic analysis of tissue biopsies. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2010 Feb;21(2):362-73. PubMed PMID: 20093355. Pubmed Central PMCID: PMC2834542. Epub 2010/01/23. eng.
 12. Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2007 Apr;18(4):1046-56. PubMed PMID: 17360947.
 13. Collins AB, Chicano SL, Cornell LD, Tolckoff-Rubin N, Goes NB, Saidman SL, et al. Putative antibody-mediated rejection with C4d deposition in HLA-identical, ABO-compatible renal allografts. *Transplantation proceedings*. 2006 Dec;38(10):3427-9. PubMed PMID: 17175293.
 14. Cardinal H, Dieude M, Brassard N, Qi S, Patey N, Soulez M, et al. Antiperlecan antibodies are novel accelerators of immune-mediated vascular injury. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013 Apr;13(4):861-74. PubMed PMID: 23432943.
 15. Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance A, Smith JD, Robinson DR, Dunn MJ, et al. Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation*. 2001 Apr 15;71(7):886-92. PubMed PMID: 11349721. Epub 2001/05/15. eng.
 16. Sanchez-Zapardiel E, Castro-Panete MJ, Castillo-Rama M, Morales P, Lora-Pablos D, Valero-Hervas D, et al. Harmful Effect of Preformed Anti-MICA Antibodies on Renal Allograft Evolution in Early Posttransplantation Period. *Transplantation*. 2013 Jul 15;96(1):70-8. PubMed PMID: 23624543. Epub 2013/04/30. eng.
 17. Mauiyyedi 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. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2002 March 1, 2002;13(3):779-87.

18. 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. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2007 Jul;7(7):1743-52. PubMed PMID: 17564636.
19. Hillebrands JL, Onuta G, Rozing J. Role of progenitor cells in transplant arteriosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine*. 2005 Jan;15(1):1-8. PubMed PMID: 15795157.
20. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *The American journal of pathology*. 1977 Mar;86(3):675-84. PubMed PMID: 842616. Pubmed Central PMCID: 2032127.
21. Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circulation research*. 2006 Oct 13;99(8):801-15. PubMed PMID: 17038650.
22. Mitchell RN. Graft vascular disease: immune response meets the vessel wall. *Annual review of pathology*. 2009;4:19-47. PubMed PMID: 18717641. Epub 2008/08/23. eng.
23. Hillebrands JL, Rozing J. Chronic transplant dysfunction and transplant arteriosclerosis: new insights into underlying mechanisms. *Expert reviews in molecular medicine*. 2003 Jan;5(2):1-23. PubMed PMID: 14987399.
24. Song H, Hoeger S, Hillebrands JL, Mandel I, Loesel R, Beck G, et al. CORMs protect endothelial cells during cold preservation, resulting in inhibition of intimal hyperplasia after aorta transplantation in rats. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2010 Nov;23(11):1144-53. PubMed PMID: 20536912. Epub 2010/06/12. eng.
25. Briscoe DM, Ganz P, Alexander SI, Melder RJ, Jain RK, Cotran RS, et al. The problem of chronic rejection: influence of leukocyte-endothelial interactions. *Kidney international Supplement*. 1997 Mar;58:S22-7. PubMed PMID: 9067938.
26. Drachenberg CB, Papadimitriou JC. Endothelial injury in renal antibody-mediated allograft rejection: a schematic view based on pathogenesis. *Transplantation*. 2013 May 15;95(9):1073-83. PubMed PMID: 23370711. Epub 2013/02/02. eng.

27. del Pozo MA, Sanchez-Mateos P, Sanchez-Madrid F. Cellular polarization induced by chemokines: a mechanism for leukocyte recruitment? *Immunology today*. 1996 Mar;17(3):127-31. PubMed PMID: 8820270.
28. Bedi DS, Riella LV, Tullius SG, Chandraker A. Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. *Transplantation*. 2010 Nov 15;90(9):935-44. PubMed PMID: 20703180. Epub 2010/08/13. eng.
29. Caviezel-Firner S, Engeler D, Bolinger B, Onder L, Scandella E, Yu M, et al. Systemic minor histocompatibility antigen expression in blood endothelial cells prevents T cell-mediated vascular immunopathology. *European journal of immunology*. 2013 Aug 20. PubMed PMID: 23963995. Epub 2013/08/22. Eng.
30. Pober JS, Tellides G. Participation of blood vessel cells in human adaptive immune responses. *Trends in immunology*. 2012 Jan;33(1):49-57. PubMed PMID: 22030237. Pubmed Central PMCID: PMC3253953. Epub 2011/10/28. eng.
31. Riedl SJ, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004 Nov;5(11):897-907. PubMed PMID: 15520809.
32. Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2006 Feb;6(2):247-53. PubMed PMID: 16426308.
33. Wang T, Dong C, Stevenson SC, Herderick EE, Marshall-Neff J, Vasudevan SS, et al. Overexpression of soluble fas attenuates transplant arteriosclerosis in rat aortic allografts. *Circulation*. 2002 Sep 17;106(12):1536-42. PubMed PMID: 12234961.
34. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2008 Oct 3;283(40):27220-9. PubMed PMID: 18658137.
35. Sirois I, Groleau J, Pallet N, Brassard N, Hamelin K, Londono I, et al. Caspase activation regulates the extracellular export of autophagic vacuoles. *Autophagy*. 2012 Jun;8(6):927-37. PubMed PMID: 22692030. Pubmed Central PMCID: 3427258.

36. Dong C, Wilson JE, Winters GL, McManus BM. Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996 May;74(5):921-31. PubMed PMID: 8642787.
37. Singh N, Van Craeyveld E, Tjwa M, Ciarka A, Emmerechts J, Droogne W, et al. Circulating apoptotic endothelial cells and apoptotic endothelial microparticles independently predict the presence of cardiac allograft vasculopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012 Jul 24;60(4):324-31. PubMed PMID: 22813611. Epub 2012/07/21. eng.
38. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2002 Jun;82(6):673-86. PubMed PMID: 12065677.
39. Shimizu A, Yamada K, Sachs DH, Colvin RB. Persistent rejection of peritubular capillaries and tubules is associated with progressive interstitial fibrosis. *Kidney international*. 2002 May;61(5):1867-79. PubMed PMID: 11967039.
40. Junqueira LCU, Carneiro J. *Basic histology : text & atlas*. 11th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2005. viii, 502 p. p.
41. Soulez M, Pilon EA, Dieude M, Cardinal H, Brassard N, Qi S, et al. The perlecan fragment LG3 is a novel regulator of obliterative remodeling associated with allograft vascular rejection. *Circulation research*. 2012 Jan 6;110(1):94-104. PubMed PMID: 22076637.
42. Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, Rozing J. Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2001 Jun;107(11):1411-22. PubMed PMID: 11390423. Pubmed Central PMCID: 209313.
43. Hu Y, Davison F, Zhang Z, Xu Q. Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation*. 2003 Dec 23;108(25):3122-7. PubMed PMID: 14656919.
44. Li J, Han X, Jiang J, Zhong R, Williams GM, Pickering JG, et al. Vascular smooth muscle cells of recipient origin mediate intimal expansion after aortic allotransplantation

- in mice. *The American journal of pathology*. 2001 Jun;158(6):1943-7. PubMed PMID: 11395369. Pubmed Central PMCID: 1891984.
45. 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. *Nature medicine*. 2002 Apr;8(4):403-9. PubMed PMID: 11927948.
 46. Soulez MD, M.; Hébert MJ. Chapter 24: Stem Cell in Tissue and Organ Transplantation. In *Experimental Organ Transplantation*. Chen HQS, editor. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2013 2013. 494 p.
 47. Medawar PB. Transplantation of Tissues and Organs: Introduction. *British Medical Bulletin*. 1965 May 1, 1965;21(2):97-9.
 48. Feng Y, Jacobs F, Van Craeyveld E, Brunaud C, Snoeys J, Tjwa M, et al. Human ApoA-I transfer attenuates transplant arteriosclerosis via enhanced incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008 Feb;28(2):278-83. PubMed PMID: 18063807.
 49. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *The New England journal of medicine*. 2002 Jan 3;346(1):5-15. PubMed PMID: 11777997.
 50. Simper D, Wang S, Deb A, Holmes D, McGregor C, Frantz R, et al. Endothelial progenitor cells are decreased in blood of cardiac allograft patients with vasculopathy and endothelial cells of noncardiac origin are enriched in transplant atherosclerosis. *Circulation*. 2003 Jul 15;108(2):143-9. PubMed PMID: 12835206.
 51. Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, van Kemenade FJ, van Es LA, Bruijn JA, van Krieken JH. Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet*. 2001 Jan 6;357(9249):33-7. PubMed PMID: 11197359.
 52. Hruban RH, Long PP, Perlman EJ, Hutchins GM, Baumgartner WA, Baughman KL, et al. Fluorescence in situ hybridization for the Y-chromosome can be used to detect cells of recipient origin in allografted hearts following cardiac transplantation. *The American journal of pathology*. 1993 Apr;142(4):975-80. PubMed PMID: 7682765. Pubmed Central PMCID: 1886869.

53. Timmermans F, Plum J, Yoder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009 Jan;13(1):87-102. PubMed PMID: 19067770.
54. Kong D, Melo LG, Gnechi M, Zhang L, Mostoslavsky G, Liew CC, et al. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation*. 2004 Oct 5;110(14):2039-46. PubMed PMID: 15451799.
55. Wang CH, Cherng WJ, Yang NI, Kuo LT, Hsu CM, Yeh HI, et al. Late-outgrowth endothelial cells attenuate intimal hyperplasia contributed by mesenchymal stem cells after vascular injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008 Jan;28(1):54-60. PubMed PMID: 17991877.
56. Shimizu K, Sugiyama S, Aikawa M, Fukumoto Y, Rabkin E, Libby P, et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nature medicine*. 2001 Jun;7(6):738-41. PubMed PMID: 11385513.
57. Tanaka K, Sata M, Hirata Y, Nagai R. Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries. *Circulation research*. 2003 Oct 17;93(8):783-90. PubMed PMID: 14500338.
58. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging*. 2011 Oct;3(10):920-33. PubMed PMID: 21990129. Pubmed Central PMCID: 3229969.
59. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. PubMed PMID: 16923606.
60. Davani S, Marandin A, Mersin N, Royer B, Kantelip B, Herve P, et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation*. 2003 Sep 9;108 Suppl 1:II253-8. PubMed PMID: 12970242.
61. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and

- improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005 Jan 18;111(2):150-6. PubMed PMID: 15642764.
62. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem cells*. 2007 Nov;25(11):2739-49. PubMed PMID: 17656645.
 63. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology*. 2002 Jan;30(1):42-8. PubMed PMID: 11823036.
 64. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838-43. PubMed PMID: 11986244.
 65. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3722-9. PubMed PMID: 12506037.
 66. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*. 2003 Jan;57(1):11-20. PubMed PMID: 12542793.
 67. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22. PubMed PMID: 15494428.
 68. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005 May 15;105(10):4120-6. PubMed PMID: 15692068.
 69. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2214-9. PubMed PMID: 15514012.

70. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367-72. PubMed PMID: 16141348.
71. Lazarus HM, Koc ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, et al. Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 2005 May;11(5):389-98. PubMed PMID: 15846293.
72. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1755-61. PubMed PMID: 15905186.
73. Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Louis-Pence P, Bony C, Sany J, et al. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2005 May;52(5):1595-603. PubMed PMID: 15880818.
74. Altun B, Yilmaz R, Aki T, Akoglu H, Zeybek D, Piskinpasa S, et al. Use of mesenchymal stem cells and darbepoetin improve ischemia-induced acute kidney injury outcomes. *American journal of nephrology*. 2012;35(6):531-9. PubMed PMID: 22653289.
75. Mansilla E, Marin GH, Drago H, Sturla F, Salas E, Gardiner C, et al. Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine. *Transplantation proceedings*. 2006 Apr;38(3):967-9. PubMed PMID: 16647520.
76. Ramirez M, Lucia A, Gomez-Gallego F, Esteve-Lanao J, Perez-Martinez A, Foster C, et al. Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury. *British journal of sports medicine*. 2006 Aug;40(8):719-22. PubMed PMID: 16807304. Pubmed Central PMCID: 2579469.
77. Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, Herault O, Bonnet P, Charbord P, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem cells*. 2006 Oct;24(10):2202-8. PubMed PMID: 16778152.

78. 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 coordinately activate ERK1/2-dependent antiapoptotic pathways in mesenchymal stem cells. *Stem cells*. 2010 Apr;28(4):810-20. PubMed PMID: 20201065.
79. Li J, Liu S, Li W, Hu S, Xiong J, Shu X, et al. Vascular smooth muscle cell apoptosis promotes transplant arteriosclerosis through inducing the production of SDF-1alpha. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012 Aug;12(8):2029-43. PubMed PMID: 22845908.
80. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2643-5. PubMed PMID: 15251986.
81. Von Luttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, et al. Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem cells and development*. 2005 Jun;14(3):329-36. PubMed PMID: 15969628.
82. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O, et al. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem cells*. 2007 Jul;25(7):1737-45. PubMed PMID: 17395768.
83. Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistran R, Muller S, Seifried E, et al. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3938-44. PubMed PMID: 16896152.
84. Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes & cancer*. 2011 Mar;2(3):195-209. PubMed PMID: 21779493. Pubmed Central PMCID: 3128630.
85. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2004 Mar 1;58(3):903-13. PubMed PMID: 14967450.

86. Yu PJ, Ferrari G, Pirelli L, Gulkarov I, Galloway AC, Mignatti P, et al. Vascular injury and modulation of MAPKs: a targeted approach to therapy of restenosis. *Cellular signalling*. 2007 Jul;19(7):1359-71. PubMed PMID: 17448633.
87. 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):3367-71. PubMed PMID: 15520324.
88. Izumi Y, Kim S, Namba M, Yasumoto H, Miyazaki H, Hoshiga M, et al. Gene transfer of dominant-negative mutants of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase prevents neointimal formation in balloon-injured rat artery. *Circulation research*. 2001 Jun 8;88(11):1120-6. PubMed PMID: 11397777.
89. Liu B, Fisher M, Groves P. Down-regulation of the ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases using antisense oligonucleotides inhibits intimal hyperplasia in a porcine model of coronary balloon angioplasty. *Cardiovascular research*. 2002 Jun;54(3):640-8. PubMed PMID: 12031710.
90. Dong C, Gong N, Chen Z, Chen X, Xu Q, Guo H, et al. Antisense ERK1/2 oligodeoxynucleotide gene therapy attenuates graft arteriosclerosis of aortic transplant in a rat model. *Transplantation proceedings*. 2006 Dec;38(10):3304-6. PubMed PMID: 17175255.
91. Chen XL, Chen ZS, Ding Z, Dong C, Guo H, Gong NQ. Antisense extracellular signal-regulated kinase-2 gene therapy inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation, migration and transforming growth factor-beta(1) expression in vascular smooth muscle cells and attenuates transplant vasculopathy. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2008 Jan;21(1):30-8. PubMed PMID: 17927678.
92. 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 journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004 Apr;18(6):705-7. PubMed PMID: 14977881.
93. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York, N.Y. : Garland Science; 2008. xxxiii, 1268, [90] p.

94. Fuster V, Topol EJ, Nabel EG. Atherothrombosis and coronary artery disease. 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. xxv, 1636 p., 10 p. of plates p.
95. Wang L, Zhang J, Fu W, Guo D, Jiang J, Wang Y. Association of smooth muscle cell phenotypes with extracellular matrix disorders in thoracic aortic dissection. *Journal of vascular surgery*. 2012 Dec;56(6):1698-709, 709 e1. PubMed PMID: 22960022. Epub 2012/09/11. eng.
96. Iozzo RV. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005 Aug;6(8):646-56. PubMed PMID: 16064139.
97. Knox SM, Whitelock JM. Perlecan: how does one molecule do so many things? *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2006 Nov;63(21):2435-45. PubMed PMID: 16952056.
98. Mongiat M, Sweeney SM, San Antonio JD, Fu J, Iozzo RV. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *The Journal of biological chemistry*. 2003 Feb 7;278(6):4238-49. PubMed PMID: 12435733.
99. Bix G, Fu J, Gonzalez EM, Macro L, Barker A, Campbell S, et al. Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin. *The Journal of cell biology*. 2004 Jul 5;166(1):97-109. PubMed PMID: 15240572. Pubmed Central PMCID: 2172143.
100. Gonzalez EM, Reed CC, Bix G, Fu J, Zhang Y, Gopalakrishnan B, et al. BMP-1/Tolloid-like metalloproteases process endorepellin, the angiostatic C-terminal fragment of perlecan. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Feb 25;280(8):7080-7. PubMed PMID: 15591058. Epub 2004/12/14. eng.
101. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Oct 13;281(41):30383-92. PubMed PMID: 16882656.
102. O'Riordan E, Addabbo F, Goligorsky MS. Urine proteomics--prospects for future diagnostics. *Acta physiologica Hungarica*. 2007 Mar;94(1-2):133-41. PubMed PMID: 17444281.

103. Surin B, Sachon E, Rougier JP, Steverlynck C, Garreau C, Lelongt B, et al. LG3 fragment of endorepellin is a possible biomarker of severity in IgA nephropathy. *Proteomics*. 2013 Jan;13(1):142-52. PubMed PMID: 23161552. Epub 2012/11/20. eng.
104. Zheng Q, Liu S, Song Z. Mechanism of arterial remodeling in chronic allograft vasculopathy. *Frontiers of medicine*. 2011 Sep;5(3):248-53. PubMed PMID: 21964706.
105. Cummins PM, von Offenberg Sweeney N, Killeen MT, Birney YA, Redmond EM, Cahill PA. Cyclic strain-mediated matrix metalloproteinase regulation within the vascular endothelium: a force to be reckoned with. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007 Jan;292(1):H28-42. PubMed PMID: 16951049.
106. Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, Meininger GA. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *The American journal of pathology*. 2000 May;156(5):1489-98. PubMed PMID: 10793060. Pubmed Central PMCID: 1876929.
107. Davis GE, Senger DR. Extracellular matrix mediates a molecular balance between vascular morphogenesis and regression. *Current opinion in hematology*. 2008 May;15(3):197-203. PubMed PMID: 18391785. Epub 2008/04/09. eng.
108. Siefert SA, Sarkar R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular*. 2012 Aug;20(4):210-6. PubMed PMID: 22896663.
109. Momi S, Falcinelli E, Giannini S, Ruggeri L, Cecchetti L, Corazzi T, et al. Loss of matrix metalloproteinase 2 in platelets reduces arterial thrombosis in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 2009 Oct 26;206(11):2365-79. PubMed PMID: 19808257. Pubmed Central PMCID: 2768852.
110. Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular hyperpermeability, angiogenesis, and stroma generation. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012 Feb;2(2):a006544. PubMed PMID: 22355795. Pubmed Central PMCID: PMC3281587. Epub 2012/02/23. eng.
111. Marnaros AG, Olsen BR. Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *The FASEB Journal*. 2005 May 1, 2005;19(7):716-28.
112. Vicente-Manzanares M, Choi CK, Horwitz AR. Integrins in cell migration--the actin connection. *Journal of cell science*. 2009 Jan 15;122(Pt 2):199-206. PubMed PMID: 19118212. Pubmed Central PMCID: 2714416.

113. Clark K, Langeslag M, Figdor CG, van Leeuwen FN. Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends in cell biology*. 2007 Apr;17(4):178-86. PubMed PMID: 17320396.
114. Daub H, Gevaert K, Vandekerckhove J, Sobel A, Hall A. Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *The Journal of biological chemistry*. 2001 Jan 19;276(3):1677-80. PubMed PMID: 11058583.
115. Pollard TD. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2007;36:451-77. PubMed PMID: 17477841.
116. Wang W, Eddy R, Condeelis J. The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nature reviews Cancer*. 2007 Jun;7(6):429-40. PubMed PMID: 17522712.
117. Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011 Sep;3(9):a005074. PubMed PMID: 21885598.
118. Bryant PW, Zheng Q, Pumiglia KM. Focal adhesion kinase is a phospho-regulated repressor of Rac and proliferation in human endothelial cells. *Biology open*. 2012 Aug 15;1(8):723-30. PubMed PMID: 23213465. Pubmed Central PMCID: PMC3507225. Epub 2012/12/06. eng.
119. Schober M, Raghavan S, Nikolova M, Polak L, Pasolli HA, Beggs HE, et al. Focal adhesion kinase modulates tension signaling to control actin and focal adhesion dynamics. *The Journal of cell biology*. 2007 Feb 26;176(5):667-80. PubMed PMID: 17325207. Pubmed Central PMCID: 2064024.
120. Grenache DG, Coleman T, Semenkovich CF, Santoro SA, Zutter MM. Alpha2beta1 integrin and development of atherosclerosis in a mouse model: assessment of risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003 Nov 1;23(11):2104-9. PubMed PMID: 14512368.
121. He L, Pappan LK, Grenache DG, Li Z, Tollefsen DM, Santoro SA, et al. The contributions of the alpha 2 beta 1 integrin to vascular thrombosis in vivo. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3652-7. PubMed PMID: 12893751.

122. Santoro SA, Zutter MM. The alpha 2 beta 1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thrombosis and haemostasis*. 1995 Sep;74(3):813-21. PubMed PMID: 8571303.
123. Nuyttens BP, Thijs T, Deckmyn H, Broos K. Platelet adhesion to collagen. *Thrombosis research*. 2011 Jan;127 Suppl 2:S26-9. PubMed PMID: 21193111. Epub 2011/01/05. eng.
124. Chen J, Diacovo TG, Grenache DG, Santoro SA, Zutter MM. The alpha(2) integrin subunit-deficient mouse: a multifaceted phenotype including defects of branching morphogenesis and hemostasis. *The American journal of pathology*. 2002 Jul;161(1):337-44. PubMed PMID: 12107118. Pubmed Central PMCID: 1850700.
125. Grenache DG, Zhang Z, Wells LE, Santoro SA, Davidson JM, Zutter MM. Wound healing in the alpha2beta1 integrin-deficient mouse: altered keratinocyte biology and dysregulated matrix metalloproteinase expression. *The Journal of investigative dermatology*. 2007 Feb;127(2):455-66. PubMed PMID: 17068473.
126. Saiura A, Sata M, Hiasa K, Kitamoto S, Washida M, Egashira K, et al. Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates graft vasculopathy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004 Oct;24(10):1886-90. PubMed PMID: 15284091. Epub 2004/07/31. eng.
127. Mazzanti B, Lorenzi B, Lorenzoni P, Borghini A, Boieri M, Lorenzi M, et al. Treatment of experimental esophagogastric myotomy with bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2013 Oct;25(10):e669-79. PubMed PMID: 23859028. Epub 2013/07/19. eng.
128. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *International journal of molecular medicine*. 2004 Dec;14(6):1035-41. PubMed PMID: 15547670. Epub 2004/11/18. eng.
129. Xu Q. Stem cells and transplant arteriosclerosis. *Circulation research*. 2008 May 9;102(9):1011-24. PubMed PMID: 18467640. Epub 2008/05/10. eng.
130. Phipps MC, Xu Y, Bellis SL. Delivery of platelet-derived growth factor as a chemotactic factor for mesenchymal stem cells by bone-mimetic electrospun scaffolds. *PloS one*.

- 2012;7(7):e40831. PubMed PMID: 22808271. Pubmed Central PMCID: PMC3395644. Epub 2012/07/19. eng.
131. Potapova IA, Brink PR, Cohen IS, Doronin SV. Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 2008 May 9;283(19):13100-7. PubMed PMID: 18334485. Pubmed Central PMCID: 2442325.
 132. Bhatwadekar AD, Glenn JV, Curtis TM, Grant MB, Stitt AW, Gardiner TA. Retinal endothelial cell apoptosis stimulates recruitment of endothelial progenitor cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009 Oct;50(10):4967-73. PubMed PMID: 19474402.
 133. Lemstrom KB, Koskinen PK. Expression and localization of platelet-derived growth factor ligand and receptor protein during acute and chronic rejection of rat cardiac allografts. *Circulation*. 1997 Aug 19;96(4):1240-9. PubMed PMID: 9286955.
 134. Ozaki Y, Nishimura M, Sekiya K, Suehiro F, Kanawa M, Nikawa H, et al. Comprehensive analysis of chemotactic factors for bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. 2007 Feb;16(1):119-29. PubMed PMID: 17348810.
 135. Coito AJ. Leukocyte transmigration across endothelial and extracellular matrix protein barriers in liver ischemia/reperfusion injury. *Current opinion in organ transplantation*. 2011 Feb;16(1):34-40. PubMed PMID: 21150609. Pubmed Central PMCID: PMC3156893. Epub 2010/12/15. eng.
 136. Steingen C, Brenig F, Baumgartner L, Schmidt J, Schmidt A, Bloch W. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2008 Jun;44(6):1072-84. PubMed PMID: 18462748. Epub 2008/05/09. eng.
 137. Teo GSL, Ankrum JA, Martinelli R, Boetto SE, Simms K, Sciuto TE, et al. Mesenchymal Stem Cells Transmigrate Between and Directly Through Tumor Necrosis Factor- α -Activated Endothelial Cells Via Both Leukocyte-Like and Novel Mechanisms. *Stem cells*. 2012;30(11):2472-86.
 138. Lozito TP, Tuan RS. Mesenchymal stem cells inhibit both endogenous and exogenous MMPs via secreted TIMPs. *Journal of Cellular Physiology*. 2011;226(2):385-96.

139. Bluthgen N, Legewie S. Systems analysis of MAPK signal transduction. *Essays in biochemistry*. 2008;45:95-107. PubMed PMID: 18793126.
140. Chen H, Zhu G, Li Y, Padia RN, Dong Z, Pan ZK, et al. Extracellular signal-regulated kinase signaling pathway regulates breast cancer cell migration by maintaining slug expression. *Cancer research*. 2009 Dec 15;69(24):9228-35. PubMed PMID: 19920183. Pubmed Central PMCID: 2795125.
141. Yu HW, Liu QF, Liu GN. Positive regulation of the Egr-1/osteopontin positive feedback loop in rat vascular smooth muscle cells by TGF-beta, ERK, JNK, and p38 MAPK signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010 May 28;396(2):451-6. PubMed PMID: 20417179.
142. Ryu CH, Park SA, Kim SM, Lim JY, Jeong CH, Jun JA, et al. Migration of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells mediated by stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis via Akt, ERK, and p38 signal transduction pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 2010 Jul 16;398(1):105-10. PubMed PMID: 20558135.
143. Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2009 Oct;6(10):587-95. PubMed PMID: 19787002. Epub 2009/09/30. eng.
144. Yeatman TJ. A renaissance for SRC. *Nature reviews Cancer*. 2004 Jun;4(6):470-80. PubMed PMID: 15170449. Epub 2004/06/02. eng.
145. Sakai T, Jove R, Fassler R, Mosher DF. Role of the cytoplasmic tyrosines of beta 1A integrins in transformation by v-src. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Mar 27;98(7):3808-13. PubMed PMID: 11259684. Pubmed Central PMCID: PMC31134. Epub 2001/03/22. eng.
146. Datta A, Huber F, Boettiger D. Phosphorylation of beta3 integrin controls ligand binding strength. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Feb 8;277(6):3943-9. PubMed PMID: 11723131. Epub 2001/11/28. eng.
147. Arthur WT, Burridge K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Molecular biology of the cell*. 2001 Sep;12(9):2711-20. PubMed PMID: 11553710. Pubmed Central PMCID: PMC59706. Epub 2001/09/13. eng.

148. Brunton VG, MacPherson IR, Frame MC. Cell adhesion receptors, tyrosine kinases and actin modulators: a complex three-way circuitry. *Biochimica et biophysica acta*. 2004 Jul 5;1692(2-3):121-44. PubMed PMID: 15246683. Epub 2004/07/13. eng.
149. Laplante P, Raymond M-A, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AM-J, Langelier Y, et al. Novel Fibrogenic Pathways Are Activated in Response to Endothelial Apoptosis: Implications in the Pathophysiology of Systemic Sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2005 May 1, 2005;174(9):5740-9.
150. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Current opinion in cell biology*. 2006 Oct;18(5):516-23. PubMed PMID: 16919435. Epub 2006/08/22. eng.
151. Playford MP, Schaller MD. The interplay between Src and integrins in normal and tumor biology. *Oncogene*. 2004 Oct 18;23(48):7928-46. PubMed PMID: 15489911. Epub 2004/10/19. eng.
152. Chen M, Chen SC, Pallen CJ. Integrin-induced tyrosine phosphorylation of protein-tyrosine phosphatase-alpha is required for cytoskeletal reorganization and cell migration. *The Journal of biological chemistry*. 2006 Apr 28;281(17):11972-80. PubMed PMID: 16507567. Epub 2006/03/02. eng.
153. Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell*. 1996 Nov 15;87(4):733-43. PubMed PMID: 8929541. Epub 1996/11/15. eng.
154. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science (New York, NY)*. 1999 Aug 13;285(5430):1028-32. PubMed PMID: 10446041. Epub 1999/08/14. eng.
155. Zutter MM, Edelson BT. The alpha2beta1 integrin: a novel collectin/C1q receptor. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):343-53. PubMed PMID: 17544819. Epub 2007/06/05. eng.
156. Arase H, Saito T, Phillips JH, Lanier LL. Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001 Aug 1;167(3):1141-4. PubMed PMID: 11466327. Epub 2001/07/24. eng.
157. de Fougères AR, Sprague AG, Nickerson-Nutter CL, Chi-Rosso G, Rennert PD, Gardner H, et al. Regulation of inflammation by collagen-binding integrins alpha1beta1

- and alpha2beta1 in models of hypersensitivity and arthritis. *The Journal of clinical investigation*. 2000 Mar;105(6):721-9. PubMed PMID: 10727440. Pubmed Central PMCID: PMC377459. Epub 2000/03/23. eng.
158. Ridger VC, Wagner BE, Wallace WA, Hellewell PG. Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2001 Mar 1;166(5):3484-90. PubMed PMID: 11207307. Epub 2001/02/24. eng.
 159. Werr J, Johansson J, Eriksson EE, Hedqvist P, Ruoslahti E, Lindbom L. Integrin alpha(2)beta(1) (VLA-2) is a principal receptor used by neutrophils for locomotion in extravascular tissue. *Blood*. 2000 Mar 1;95(5):1804-9. PubMed PMID: 10688841. Epub 2000/02/26. eng.
 160. 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. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1997 Apr;16(4):420-35. PubMed PMID: 9154953. Epub 1997/04/01. eng.
 161. Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Canadian journal of surgery Journal canadien de chirurgie*. 2005 Aug;48(4):319-27. PubMed PMID: 16149368. Pubmed Central PMCID: PMC3211528. Epub 2005/09/10. eng.
 162. Zou Y, Hu Y, Mayr M, Dietrich H, Wick G, Xu Q. Reduced neointima hyperplasia of vein bypass grafts in intercellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Circulation research*. 2000 Mar 3;86(4):434-40. PubMed PMID: 10700448. Epub 2000/03/04. eng.
 163. Mayr M, Li C, Zou Y, Huemer U, Hu Y, Xu Q. Biomechanical stress-induced apoptosis in vein grafts involves p38 mitogen-activated protein kinases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2000 Feb;14(2):261-70. PubMed PMID: 10660448. Epub 2000/02/05. eng.
 164. Chen Y, Wong MM, Campagnolo P, Simpson R, Winkler B, Margariti A, et al. Adventitial stem cells in vein grafts display multilineage potential that contributes to

- neointimal formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2013 Aug;33(8):1844-51. PubMed PMID: 23744989. Epub 2013/06/08. eng.
165. Religa P, Bojakowski K, Maksymowicz M, Bojakowska M, Sirsjo A, Gaciong Z, et al. Smooth-muscle progenitor cells of bone marrow origin contribute to the development of neointimal thickenings in rat aortic allografts and injured rat carotid arteries. *Transplantation*. 2002 Nov 15;74(9):1310-5. PubMed PMID: 12451271. Epub 2002/11/27. eng.
166. Moe SM, Chen NX. Mechanisms of vascular calcification in chronic kidney disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008 Feb;19(2):213-6. PubMed PMID: 18094365. Epub 2007/12/21. eng.
167. Guerin AP, London GM, Marchais SJ, Metivier F. Arterial stiffening and vascular calcifications in end-stage renal disease. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2000 Jul;15(7):1014-21. PubMed PMID: 10862640. Epub 2000/06/22. eng.
168. Shanahan CM, Crouthamel MH, Kapustin A, Giachelli CM. Arterial calcification in chronic kidney disease: key roles for calcium and phosphate. *Circulation research*. 2011 Sep 2;109(6):697-711. PubMed PMID: 21885837. Pubmed Central PMCID: PMC3249146. Epub 2011/09/03. eng.
169. Kramann R, Couson SK, Neuss S, Kunter U, Bovi M, Bornemann J, et al. Exposure to uremic serum induces a procalcific phenotype in human mesenchymal stem cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011 Sep;31(9):e45-54. PubMed PMID: 21680902. Epub 2011/06/18. eng.
170. Kramann R, Kunter U, Brandenburg VM, Leisten I, Ehling J, Klinkhammer BM, et al. Osteogenesis of heterotopically transplanted mesenchymal stromal cells in rat models of chronic kidney disease. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2013 May 23. PubMed PMID: 23703894. Epub 2013/05/25. Eng.
171. Braun J, Oldendorf M, Moshage W, Heidler R, Zeitler E, Luft FC. Electron beam computed tomography in the evaluation of cardiac calcifications in chronic dialysis patients. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1996;27(3):394-401.

172. Hu HM, Yang L, Wang Z, Liu YW, Fan JZ, Fan J, et al. Overexpression of integrin $\alpha 2$ promotes osteogenic differentiation of hBMSCs from senile osteoporosis through the ERK pathway. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(5):841-52. PubMed PMID: 23638215. Pubmed Central PMCID: 3638094.
173. Gandavarapu NR, Mariner PD, Schwartz MP, Anseth KS. Extracellular matrix protein adsorption to phosphate-functionalized gels from serum promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Acta biomaterialia*. 2013 Jan;9(1):4525-34. PubMed PMID: 22982322. Pubmed Central PMCID: 3537156.
174. Becerra-Bayona S, Guiza-Arguello V, Qu X, Munoz-Pinto DJ, Hahn MS. Influence of select extracellular matrix proteins on mesenchymal stem cell osteogenic commitment in three-dimensional contexts. *Acta biomaterialia*. 2012 Dec;8(12):4397-404. PubMed PMID: 22871641. Pubmed Central PMCID: 3488129.