

Université de Montréal

**Répercussions paracrines de l'apoptose endothéliale sur l'homéostasie des
cellules musculaires lisses vasculaires**

par
Anik Désormeaux

Unité académique Biologie Moléculaire
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc.
en Biologie Moléculaire

Juin 2004

© Anik Désormeaux, 2004



QH

506

U54

2004

v.018

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
**Répercussions paracrines de l'apoptose endothéliale sur l'homéostasie des
cellules musculaires lisses vasculaires**

présenté par :
Anik Désormeaux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

.....Anne-Marie Mes-Masson.....
président-rapporteur

.....Marie-Josée Hébert.....
directeur de recherche

.....Isabelle Royal.....
membre du jury

RÉSUMÉ

L'insulte apoptotique sur les cellules endothéliales (CE) est généralement suivie par la formation réversible d'une néointima caractérisée par la prolifération et la survie des cellules musculaires lisses vasculaires (CML). Nous avons émis l'hypothèse que les CE soumises à un stress apoptotique envoient des signaux permettant une réparation du vaisseau via la prolifération et la résistance à l'apoptose des CML. Nos travaux démontrent que les CE soumises à un stress apoptotique libèrent des médiateurs anti-apoptotiques et pro-prolifératifs actifs sur les CML. La libération par les CE des médiateurs anti-apoptotiques est caspase-dépendante. Par contre, la production des médiateurs pro-prolifératifs est caspase-indépendante. Les médiateurs pro-prolifératifs diminuent le niveau de protéine de p53, de p21 et augmentent le niveau de la cycline E, ce qui permet de surpasser un arrêt en G1. Par spectrométrie de masse, nous avons identifié la protéine liant la vitamine D (DBP), de même qu'un fragment C-terminal du domaine V du perlecan possédant un site d'ancrage pour le sulfate de chondroïtine (SC) parmi les médiateurs solubles. Un peptide synthétique, correspondant au fragment du perlecan, et le SC ont un effet anti-apoptotique, mais pas d'effet prolifératif sur les CML. Le DBP induit sur les CML une réponse proliférative potentialisée par l'ajout de SC. Ces résultats suggèrent que le stress apoptotique des CE permet la libération des médiateurs coopérant pour augmenter la prolifération et inhiber l'apoptose des CML. Nous proposons qu'une insulte soutenue sur les CE induit la production chronique de médiateurs favorisant le remodelage vasculaire pathologique.

Mots clés : Apoptose, cycle cellulaire, remodelage vasculaire, néointima, protéine liant la vitamine D, perlecan, sulfate de chondroïtine

ABSTRACT

Apoptotic injury on endothelial cells (EC) is followed by the reversible neointima formation characterised by vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation and survival. Our hypothesis is that EC submitted to apoptotic stress release VSMC proliferation and survival signals to allow vessels restoration. We showed that EC submitted to apoptotic stress release anti-apoptotic and pro-proliferative mediators that target VSMC. Anti-apoptotic mediators release is caspase-dependent whereas pro-proliferative mediators production is caspase-independent. Pro-proliferative mediators decrease p53 and p21 and increase cyclin E protein levels countering an arrest in G1. By mass spectrometry, we identified the vitamin D binding protein (DBP) and the C-terminal fragment of the perlecan domain V which possesses an anchor for chondroitin sulphate (CS) among the soluble mediators. We showed that a synthetic peptide, corresponding to the perlecan fragment, and CS have an anti-apoptotic effect, but no proliferative effect on VSMC. In contrast, DBP induces proliferation of VSMC and this proliferative activity of DBP is potentiated by CS. Together, these results suggest that EC submitted to apoptotic stress release mediators that act coordinately to increase proliferation and inhibit apoptosis of VSMC. We propose that sustained endothelial injury could promote chronic production of these mediators favouring a pathological vascular remodelling.

Key words: Apoptosis, cell cycle, vascular remodelling, neointima, vitamin D binding protein, perlecan, chondroitin sulfate

TABLE DES MATIÈRES

PAGE TITRE	I
PRÉSENTATION DU JURY	II
RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
REMERCIEMENTS	XVII
1-INTRODUCTION	
1.1- Système Vasculaire	2
1.1.1- Anatomie Vasculaire	2
1.1.2- Mécanismes de réparation suite à une lésion endothéliale	3
a- L'athérosclérose et ses facteurs de risques	5
b- Vasculopathie de transplantation	7
c- Microangiopathie thrombotique	8
1.1.3- Équilibre vasculaire	8
1.2- La mort cellulaire programmée	10
1.2.1- Le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i>	10
1.2.2- L'apoptose	11
1.2.2.1- La voie intrinsèque	12
a- La famille des B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	12
b- Perte d'intégrité de la mitochondrie	16

c- Les cystéines aspartases (caspases)	18
1.2.2.2- La voie extrinsèque	21
1.2.2.3- L'apoptose et les désordres vasculaires	22
1.2.3- Autres morts cellulaires programmées	23
1.3- Prolifération	26
1.3.1- Le cycle cellulaire	26
1.3.1.1- Historique	26
1.3.1.2- Contrôles des kinases dépendantes de cyclines (cdk)	27
a- Les cyclines de la phase G0/G1	30
b- Les cyclines de la progression des phases S et G2	36
c- Les cyclines de la transition G2/M	37
1.3.2- Système de surveillance	38
1.3.2.1- Point de contrôle en G1	39
1.3.3- Le cycle cellulaire et les désordres vasculaires	42
1.4- Prémisses	44
1.5- Hypothèse et objectifs	44
2- MATÉRIELS & MÉTHODES	
2.1- Culture cellulaire	47
2.2- Production de milieu sans sérum conditionné (SSC)	47
2.3- Détermination de la viabilité et la prolifération	49
2.4- Évaluation de l'apoptose par microscopie de fluorescence	50
2.5- Analyse du cycle cellulaire	51
2.6- Immunobuvardage pour p53, p21, cycline E et actine	51

2.7- Caractérisation des facteurs libérés par les CE en carence de sérum	54
2.8- Réactifs	55
2.9- Analyses statistiques	56
3- RÉSULTATS	
<i>AVANT-PROPOS</i>	58
3.1- La libération de médiateurs par les CE soumises à un stress apoptotiques	59
3.1.1- Effet anti-apoptotique sur les CML	59
3.1.2- Effet pro-prolifératif sur les CML	60
3.1.3- La libération caspase-dépendante des médiateurs anti-apoptotiques par les CE en carence de sérum	61
3.1.4- La libération caspase-indépendante des médiateurs pro-prolifératifs par les CE en carence de sérum	62
3.1.5- Le stress apoptotique induit aux CE est requis à la libération de médiateurs pro-prolifératifs	63
3.2- La régulation moléculaire de la réponse proliférative	65
3.2.1- Le milieu SSC4h contre l'arrêt en G1 des CML en carence de sérum	65
3.2.2- Certains acteurs de l'arrêt en G1	66
3.2.3- La prolifération des CML induite par le SSC4h est PKC- et ERK 1/2-dépendante	71
3.3- La caractérisation des médiateurs libérés par les CE	

soumises à la carence de sérum	72
3.3.1- Identification d'un médiateur anti-apoptotique	73
3.3.2- Identification d'un médiateur pro-prolifératif	75
3.3.3- Potentialisation des médiateurs	76
3.3.4- La prolifération des CML induite par DBP est ERK 1/2-dépendante	76

4- DISCUSSION

4.1- La libération de médiateurs par les CE soumises

à un stress apoptotique	80
4.1.1- La carence en sérum; apoptose p53-dépendante	80
4.1.2- SSC4h anti-apoptotique et pro-prolifératif	81
a- Effet anti-apoptotique caspase-dépendant	83
b- Effet pro-prolifératif caspase-indépendant	83
4.1.3- Arrêt en G1 contré par le SSC4h	85
a- Une augmentation de la cycline E, une diminution de p53 et p21 impliquées dans l'effet pro-prolifératif du SSC4h	86
4.1.4- Les voies de transduction du signal des médiateurs du SSC4h	89
a- La voie ERK 1/2 activée par les médiateurs pro-prolifératifs et anti-apoptotiques	89
b- La voie PKC activée par les médiateurs pro-prolifératifs	89
4.1.5- Caractérisation des médiateurs	93
a- Un fragment C-terminal du domaine V du perlecan	93
b- La protéine liant la vitamine D (DBP)	96

4.2- Modèle hypothétique

99

5- RÉFÉRENCES

101

LISTE DES FIGURES

1 : Schéma de la paroi vasculaire	2
2 : Schéma de l'apoptose chez <i>C.elegans</i>	11
3 : Schéma de la voie intrinsèque de l'apoptose	14
4 : Schéma de la voie extrinsèque de l'apoptose par le récepteur de mort Fas	22
5 : Schéma simplifié du cycle cellulaire	28
6 : Schéma simplifié de l'arrêt en G1	41
7A : L'activité anti-apoptotique du milieu SSC4h	60
7B : Détermination de l'activité pro-proliférative du milieu SSC4h	60
8 : Effet de l'activation des caspases sur la libération des facteurs anti-apoptotiques par les CEh en carence de sérum	62
9 : Effet de l'activation des caspases sur la libération des médiateurs pro-prolifératifs par les CEh en carence de sérum	64
10 : Patron du cycle cellulaire	67
11 : Niveaux protéiques, déterminés par immunobuvardage, de p21 et cycline E dans les CMLr	68
12 : Niveaux protéiques, déterminés par immunobuvardage, de p53 et p21 dans les CMLh	70
13 : Détermination de la voie de signalisation pro-proliférative	72
14 : Identification de molécules candidates conférant l'activité anti-apoptotique	74
15 : Identification de molécules candidates conférant l'activité pro-proliférative	77
16 : Détermination de la voie de signalisation pro-proliférative activée par DBP	78
17 : Schéma récapitulatif	99

LISTE DES ABRÉVIATIONS

1,25-(OH)₂-Vit-D : 1,25-dihydroxy-vitamine D

25-OH VitD : 25-hydroxy-vitamine D

ADN : acide déoxyribonucléique

AIF: facteur d'induction d'apoptose; apoptosis inducing factor

Ala: alanine

AMPC: adénosine mono-phosphate cyclique

ANT: translocateur du nucléotide adénine; adenine nucleotide translocator

Apaf-1: facteur-1 d'activation de protéases apoptotiques; apoptotic protease-activating factor-1

ARNm: acide ribonucléique messenger

Asp: acide aspartique

ATP: adénosine tri-phosphate

Bad : antagoniste de Bcl-2 de mort cellulaire; Bcl-2 antagonist of cell death

Bak : antagoniste de Bcl-2/tueur; Bcl-2-antagonist/killer

Bax : protéine X associée à Bcl-2; Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

b-FGF : facteur basique de croissance des fibroblastes; basic fibroblast growth factor

BH : domaine d'homologie à bcl-2; bcl-2 homology domain

Bid : agoniste de mort interagissant avec le domaine BH3; BH3 interacting domain death agonist

Bim : médiateur de mort interagissant avec Bcl-2; Bcl-2 interacting mediator of cell death

Bidt : Bid tronqué

BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine

C.elegans : *Caenorhabditis elegans*

CAD : nucléase d'ADN activée par les caspases; caspase activated DNA nuclease

CAK : kinase activatrice de cdk; cdk activating kinase

CARD : domaine d'activation et de recrutement de caspase; caspase activating and recruiting domain

Caspase : cystéine aspartase

Cdk : kinase dépendante de cyclines; cyclin-dependent kinase

Cdc : cycle de division cellulaire; cell division cycle

CE : cellules endothéliales

CEh : CE de veine ombilical humaine

Ced-3 : gène de mort-3 de *C. elegans*; *C. elegans* death gene-3

Ced-4 : gène de mort-4 de *C. elegans*; *C. elegans* death gene-4

cki : inhibiteur de kinase dépendante des cyclines; cyclin-dependent kinase inhibitors

CML : cellules musculaires lisses vasculaires

CMLh : CML d'aorte humaine

CMLr : CML d'aorte thoracique d'embryon de rat

CRE : élément de réponse de AMPc; cAMP response element

Cul-1 : ubiquitine ligase de la famille de cullin; cullin-based ubiquitin ligase

DBP : protéine liant la vitamine D; vitamin D binding protein

DD : domaine de mort; death domain

DED : domaine d'exécution de mort; death effector domain

DIABLO : protéine avec pI bas liant directement IAP; direct IAP binding protein with low pI

DMSO: diméthylsulfoxyde

DP : DRTF1 polypeptide

DR: récepteur de mort; death receptor

EC: endothelial cells

Egl-1: egg laying defective-1

EGF: facteur de croissance épidermique; epidermal growth factor

EndoG : endonucléase G

ERK : kinase régulée par des signaux extracellulaires; extracellular signal-regulated
kinase

FADD : domaine de mort associé à Fas; Fas-associated death domain

FLICE : protéase homologue à FADD apparentée à ICE/CED-3; FADD-homologous
ICE/CED-3-like protease

FLIP: protéine inhibitrice de FLICE; FLICE inhibitory protein

FOXO: Forkhead de la classe box O; Forkhead box class O

GADD45: gène-45 d'arrêt cellulaire et de dommage à l'ADN; growth arrest and
DNA damage gene-45

GMP: guanosine mono-phosphate

GSK-3 β : kinase-3 β de la synthèse du glycogène; glycogen synthase kinase-3 β

HDAC: déacétylase d'histone; histone deacetylase

Ho : Hoeschst 33342

Htr2A: protéine nécessitant de haute température 2A; high temperature requirement
protein 2A

IAPs : protéines inhibitrices d'apoptose; inhibitor of apoptosis proteins

IGF-1 : facteur-1 de croissance apparenté à l'insuline; insulin-like growth factor-1

JNK : kinase du domaine c-Jun; c-Jun kinase

kDa : kilo Dalton

kpb : kilo paire de bases

LDL : lipoprotéine à faible densité; low density lipoprotein

MAPK : protéine kinase activée par des mitogènes; mitogen-activated protein kinase

MDM2 : gène-2 minute double de souris; murine double minute 2 gene

MPF : facteur promoteur de la phase M; M phase promoting factor

MPT : perméabilité de transition mitochondrial; mitochondrial permeability transition

N : milieu normal

NO : oxyde nitreux; nitric oxide

PAK2 : kinase-2 activée par p21; p21-activated kinase-2

pb : paire de bases

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes; platelet derived growth factor

Phase G0: phase de quiescence

Phase G1: phase gap 1

Phase G2: phase gap 2

phase M: phase de mitose

phase S: phase de synthèse de l'ADN

Pi : iodure de propidium; propidium iodide

PI3K : kinase de phosphatidyl inositol 3; phosphatidylinositol 3-kinase

PKB : protéine kinase B

PKC : protéine kinase C

PTP : pore de transition de perméabilité; permeability transition pore

Rb : protéine rétinoblastome

RIPA : essai de radio-immunoprécipitation; radio-immunoprecipitation assay

SDS-PAGE : électrophorèse par gel de polyacrylamide et de sodium-dodécyl-sulfate;
sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Ser : sérine

Smac : deuxième activateur de caspases dérivé de la mitochondrie; second
mitochondria-derived activator of caspase

SPF: facteur promoteur de la phase S; S phase promoting factor

SS: milieu sans sérum

SSC30s: milieu sans sérum conditionné pendant 30 secondes par des CE

SSC4h : milieu sans sérum conditionné pendant 4 heures par des CE en carence de
sérum

SSC+DMSO : SSC4h par des CE pré-conditionnées au DMSO pour 2 heures

SSC+ZVAD : SSC4h par des CE pré-conditionnées au z-VAD-fmk pour 2 heures

TGF- β : facteur- β de croissance transformant; transforming growth factor- β

TNF- α : facteur- α de nécrose tumorale; tumor necrosis factor- α

TNFR : récepteur du facteur de nécrose tumorale; tumor necrosis factor receptor

Thr: thréonine

Tyr: tyrosine

Val: valine

VDAC: canal à anions dépendant du voltage; voltage-dependent anion channel

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire; vascular endothelial
growth factor

VSMC : cellules musculaires lisses vasculaires; vascular smooth muscle cells

z-VAD-fmk: benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone

REMERCIEMENTS

L'achèvement de ma maîtrise et de ce mémoire n'aurait pas pu être accompli sans l'aide de plusieurs personnes indispensables. D'abord ma famille qui, malgré le peu de compréhension du travail dans lequel je m'investissais, a toujours su me supporter. Je dois certainement remercier ma directrice de recherche Dre Marie-Josée Hébert qui a su m'encourager lors de moments où les résultats s'absentaient et la contamination persistait! Une grande part de l'accomplissement de ma maîtrise revient à Marie-Josée et je la remercie. De plus, elle m'a poussée à développer différentes facettes de ma personnalité soit mon esprit scientifique et mon caractère! Normand Vigneault m'a donné beaucoup de conseils scientifiques et a su partager son expertise (avec autant d'années d'expériences, on en connaît des choses!). Je dois aussi remercier Dr Marc-André Raymond qui a investi du temps pour m'expliquer plusieurs techniques et concepts qui m'ont aidé pour la progression de mon projet de recherche. Rien n'aurait pu avoir lieu sans le dévouement du Dr Richard Bertrand qui m'a offert mon premier stage en laboratoire et m'a permise de faire ma maîtrise dans le laboratoire de Marie-Josée. La personne qui a su me supporter autant scientifiquement que personnellement est Martin. Martin est toujours là autant dans les bons que dans les mauvais moments et grâce à son esprit critique, il me dicte où je dois m'orienter. Ces brefs remerciements ne compensent pas pour le temps et le travail que ces gens ont investi pour moi, mais je tiens à leur dire encore une fois : Merci!

1- INTRODUCTION

1.1- SYSTÈME VASCULAIRE

1.1.1- Anatomie Vasculaire

L'arbre vasculaire est un véritable organe délivrant un travail continu. À chaque instant, l'appareil vasculaire doit s'adapter à plusieurs situations afin d'acheminer le sang aux endroits où il doit participer à des échanges. D'intenses activités métaboliques ont lieu au niveau de la paroi des vaisseaux et toute action toxique provoque une perturbation des fonctions endothéliales qui peut avoir des conséquences sur l'homéostasie de la paroi. La paroi vasculaire est formée de 3 couches : l'intima, la média et l'adventice (Figure 1) ¹.

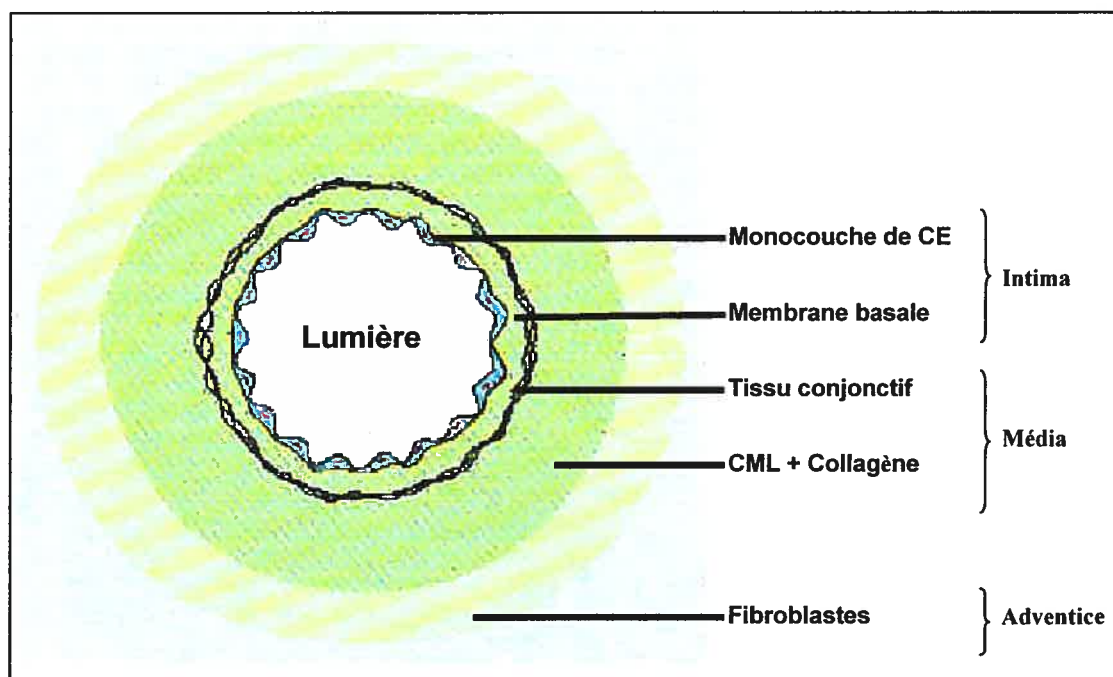


Figure 1: Schéma de la paroi vasculaire. Au centre du vaisseau, se trouve la lumière où circule le sang. La lumière est délimitée par une monocouche de cellules endothéliales (CE) qui repose sur la membrane basale (matrice extracellulaire) composée de protéines et de protéoglycans. Ensemble, la membrane basale et les CE composent l'intima. La média est composée de fibres élastiques qui forment le tissu conjonctif et de cellules musculaires lisses vasculaires (CML) qui fabriquent du

collagène pour produire la matrice extracellulaire. L'adventice est une matrice extracellulaire dans laquelle se retrouve quelques fibroblastes.

L'endothélium est le principal constituant de l'intima qui est la couche la plus interne de la paroi vasculaire. Cet endothélium est une monocouche de cellules endothéliales (CE) qui tapissent l'ensemble de l'arbre vasculaire et jouent un rôle majeur dans la régulation locale. La monocouche de cellules repose sur la matrice extracellulaire, plus précisément la membrane basale, qui est composée de protéines et de protéoglycans produits par les CE. La média est formée principalement de cellules musculaires lisses vasculaires (CML), de cellules élastiques et de collagène. Les fibres élastiques sont nombreuses dans les gros vaisseaux comme l'aorte et la veine cave, et plus on s'éloigne du cœur leur nombre diminue. La proportion de CML par rapport aux fibres élastiques dans les artérioles est plus grande que dans les gros vaisseaux. Les fibres de collagène constituent la majeure partie de la matrice extracellulaire de la média, à tous les niveaux de l'arbre vasculaire, et ont pour rôle la résistance à l'étirement des parois. L'adventice, la couche externe, est constituée de matrice extracellulaire dans laquelle se retrouve des fibroblastes. L'adventice loge les vaisseaux nourriciers et les nerfs des structures vasculaires ¹.

1.1.2- Mécanismes de réparation suite à une lésion endothéliale

À cause des jonctions complexes et serrées entre les cellules, l'endothélium sert de barrière perméable sélective entre le sang et les tissus. Les cellules, suite aux changements environnementaux, peuvent générer des molécules effectrices qui inhibent la thrombose, l'inflammation, la tonification vasculaire et le remodelage

vasculaire². La dysfonction de l'endothélium, qui résulte d'une lésion, provoque la réponse compensatoire qui altère les propriétés homéostasiques de l'endothélium. Différentes formes d'insultes changent le comportement des CE, par des mécanismes plus ou moins définis, et ont pour conséquences d'augmenter leur propriété adhésive, leur perméabilité, d'induire la production de facteurs procoagulants (plutôt qu'anticoagulant), de molécules vasoactives, de cytokines et de facteurs de croissance. Si la réponse des CE ne neutralise pas efficacement les agents perturbateurs, elle peut continuer indéfiniment³. Éventuellement, les CML migrent dans l'intima et prolifèrent⁴. Les CML sécrètent du collagène pour produire la matrice extracellulaire et fabriquent une néointima initialement destinée à remplacer le revêtement endothélial en attendant sa réparation lente. Si l'agression est de courte durée, la réponse du vaisseau à la blessure est efficace et la réaction intimale réversible¹. Un nombre croissant de CML entament alors une mort cellulaire programmée ce qui compense pour le surnombre de cellules produites lors de la prolifération. Dans l'ensemble ce phénomène résulte en un remodelage vasculaire. Peu à peu la prolifération diminue et on retrouve un vaisseau réparé. Par contre, l'excès ou la chronicité de l'insulte au niveau de l'endothélium résulte en une inflammation intimale excessive et chronique de la paroi artérielle dont un des principaux éléments est la réaction proliférative fibromusculaire des CML de la paroi. Lorsque l'insulte se poursuit, il y a épaissement intimal donc, un rétrécissement progressif de la lumière du vaisseau au lieu d'une guérison. Le remodelage vasculaire pathologique, après une lésion de l'endothélium, est initié suite à plusieurs formes de dysfonction vasculaire tel que la microangiopathie thrombotique⁵⁻¹⁰, la vasculopathie de transplantation^{11,12} et l'athérosclérose¹³.

a- L'athérosclérose et ses facteurs de risques

Le remodelage vasculaire pathologique associé à l'athérosclérose est le phénomène le mieux défini. Plusieurs études ont démontré la présence de différents facteurs, que j'aborde plus loin, en liaison avec l'athérosclérose. De plus, ces facteurs sont aussi associés à l'induction de l'apoptose endothéliale. Existe-t-il un lien entre le fait que ces facteurs induisent l'apoptose des CE et leur présence dans l'athérosclérose? Suite à la mort des CE, l'initiation d'un processus de guérison entraîne un remodelage vasculaire caractérisé par une augmentation de la prolifération et une résistance à l'apoptose des cellules de la paroi vasculaire. Dans l'athérosclérose, l'insulte chronique ou répétitive au niveau de l'endothélium déclenche une réponse des CE. Cette réponse serait caractérisée par l'apoptose des CE endommagées et par un signal d'avertissement pour les cellules environnantes. Le signal envoyé par les CE en réponse à l'insulte active l'accumulation excessive de cellules dans l'intima. Cette accumulation est la cause majeure du remodelage vasculaire pathologiques et de la progression de la maladie^{14,15}. Le remodelage vasculaire est attribué à la migration des leucocytes, des plaquettes, des monocytes/macrophages et des lymphocytes T permettant leur accumulation aux sites de lésions athérosclérotiques^{15,16}. Ces types cellulaires produisent plusieurs facteurs de croissance qui induisent la prolifération des CML^{15,17-25}. Ces facteurs de croissance incluent le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur basique de croissance des fibroblastes (bFGF), le facteur- α de nécrose tumoral (TNF- α), le facteur-1 de croissance apparenté à l'insuline (IGF-1), l'interleukine-1 et le facteur- β de croissance transformant (TGF- β). Il est possible que d'autres facteurs permettent aux CML de proliférer et de développer une résistance à l'apoptose d'une façon soutenue.

L'initiation de l'athérosclérose est caractérisée par la dysfonction endothéliale, l'inflammation, la prolifération cellulaire et le remodelage vasculaire²⁶⁻⁴⁶. Il existe plusieurs facteurs, autant génétiques qu'environnementaux, pouvant causer, *in vivo* et *in vitro*, une dysfonction endothéliale aboutissant à l'épaississement intimal, par exemple, les LDL oxydés^{13,47-50}, la fumée de cigarettes^{51,52}, l'hypertension⁵³, l'hyperglycémie⁵⁴, l'homocystéine⁵⁵.

Des niveaux élevés de LDL oxydés dans le sang (déficiency génétique ou régime riche en lipides) facilitent la formation d'agrégat de LDL oxydés dans l'intima ce qui déstabilise l'endothélium^{13,47-50}. Le cholestérol et les esters sur les LDL ont une action cytotoxique lorsqu'ils sont oxydés, les oxystérols contribuent à l'effet toxique des LDL oxydés⁵⁶. De plus, les radicaux libres provenant de la fumée de cigarettes augmentent la quantité de LDL oxydés^{51,52}. La tension artérielle entraîne à chaque coup tensionnel un écrasement des CE qui s'hypertrophient, deviennent saillantes et, progressivement, risquent un arrachement. On conçoit dès lors, le rôle pathogénique de l'hypertension artérielle dans la dysfonction endothéliale. La pression artérielle est sous la dépendance directe de nombreuses hormones par exemple les catécholamines et d'autres hormones du système rénine angiotensine, soit l'angiotensine II. L'angiotensine II peut causer l'hypertension, stimuler la croissance des CML⁵³ et stimuler la production de matrice extracellulaire⁵⁷. Les niveaux de glycémie élevés (hyperglycémie) sont associés à une dysfonction de l'endothélium et un épaississement intimal⁵⁴ et cause une déficiency dans la production d'oxyde nitreux (NO) par les cellules endothéliales⁵⁸. Des concentrations plasmiqes élevées d'homocystéines peuvent être toxique pour l'endothélium⁵⁵, diminuer la disponibilité

de NO⁵⁹ et stimuler la prolifération des CML⁶⁰. L'accumulation d'homocystéine dans le sang est surtout un facteur génétique et on retrouve parfois un défaut dans l'enzyme nécessaire au métabolisme d'homocystéine⁶¹⁻⁶⁵.

Toute lésion endothéliale est responsable d'un trouble de la vasomotricité dépendante de la libération de NO. Le NO est un médiateur chimique vasodilatateur sécrété en permanence par l'endothélium et possède plusieurs propriétés antiathérogéniques². Le NO diffuse vers les CML et y active la cyclase de glutamyle qui permet la transformation du GMP en GMP cyclique, aussi un vasodilatateur. Il existe un tonus vasodilatateur de base sous la dépendance d'une libération basale continue de NO. Si la production de NO est altérée il y a une augmentation de la pression artérielle. Les souris génétiquement déficiente en NO synthase endothéliale montre une augmentation d'athérosclérose due, en partie, à une augmentation de la pression sanguine⁶⁶.

b- Vasculopathie de transplantation

Dépendamment du type de greffe d'organes solides, l'incidence d'une dysfonction de transplantation chronique est de trois ans après la transplantation et varie de 4 à 50%⁶⁷⁻⁶⁹. Indépendamment de l'organe greffé, les vaisseaux du greffon développent, éventuellement, l'athérosclérose de transplantation qui est plus fréquente dans les greffes de cœur et de rein^{70,71}. Des facteurs immunologiques ou métaboliques causent des dommages à l'endothélium. L'endothélium endommagé est vu comme un facteur initiateur du remodelage pathologique. Ce processus de remodelage vasculaire

consiste en un épaissement progressif concentrique de l'intima avec une inflammation périvasculaire.

c- Microangiopathie thrombotique

La microangiopathie thrombotique est un syndrome caractérisé par l'agrégation de plaquettes dans la microcirculation rénale et a été liée à l'insulte des cellules endothéliales de la paroi vasculaire rénale⁷²⁻⁸⁰. La présence de l'épaississement intimal artériel dans les biopsies rénales de patients ayant une microangiopathie thrombotique est un indice important du développement de dysfonction rénale progressive^{76,81-83}. Ces changements intimaux seraient le résultat d'une lésion endothéliale suivit d'une migration et d'une prolifération des CML dans l'intima^{76,81-83}.

1.1.3- Équilibre vasculaire

L'homéostasie de l'arbre vasculaire repose sur l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Plusieurs des facteurs impliqués dans l'athérosclérose stimulent l'apoptose des CE^{2,3}. Suite à une insulte, l'apoptose est considérée comme une réponse des cellules endothéliales. En effet, les CE apoptotiques envoient des signaux, en réponse à l'insulte, qui déclenchent le remodelage vasculaire et l'épaississement intimal. Aux sites de lésion, une augmentation de l'apoptose des cellules endothéliales est observée dans les modèles animaux d'athérosclérose¹³ et de vasculopathie suite à une transplantation^{11,12}. Suite à une blessure de l'endothélium,

les CML prolifèrent et développent une résistance à l'apoptose^{84,85}. L'accumulation excessive des cellules dans l'intima est considérée comme une cause majeure de la progression des maladies vasculaires.

Dans plusieurs processus biologiques fondamentaux, par exemple, l'homéostasie cellulaire, qui est strictement régulée, l'apoptose est nécessaire pour éliminer des cellules surnuméraires et non-voulues. L'apoptose des cellules vasculaires est une figure dominante dans le remodelage de vaisseau sanguin qui a lieu pendant le développement normal et pendant la réponse fibromusculaire lors de désordres dans la paroi vasculaire⁸⁶. L'apoptose de cellules vasculaires (CE, CML) contribuerait à une réponse adaptative qui permet de réduire le vaisseau pour répondre à la diminution du flux sanguin. Plusieurs études démontrent que des vaisseaux endommagés par ballon induisent deux vagues d'apoptose dans les CML et les CE. D'abord une réponse apoptotique précoce qui atteint son maximum à 1h post-insulte résulte en une diminution de la cellularité de la média⁸⁷. Ensuite, on observe une phase de résistance à l'apoptose et d'augmentation de la prolifération des CML⁸⁸. La deuxième vague d'apoptose a lieu beaucoup plus tard, soit des jours ou des semaines et la fréquence est plus petite^{89,90}. Cette deuxième vague d'apoptose permet l'élimination des CML en excès et de terminer la réparation du vaisseau en revenant au niveau normal de CML, une fois que l'endothélium est réparé. Plusieurs évidences montrent que le développement d'un état de résistance à l'apoptose et d'une augmentation de la prolifération des CML est nécessaire à la formation de la néointima et au remodelage vasculaire. Des observations soulèvent la possibilité que l'atténuation de l'apoptose des CML contribue à l'augmentation de la prolifération

pour permettre une accumulation de cellules dans l'intima. La viabilité cellulaire est gouvernée au niveau moléculaire par une balance entre des signaux pro- et anti-apoptotiques médiés par plusieurs familles de gènes.

1.2- LA MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE

1.2.1- Le nématode Caenorhabditis elegans

Au cours des dernières décennies, beaucoup d'études ont porté sur les mécanismes intracellulaires en réponse à des stimuli apoptotiques. Des études sur le nématode *C. elegans* ont établi les bases concernant la mort cellulaire programmée. Lors du développement de l'hermaphrodite *C. elegans*, 1090 cellules sont générées desquelles 131 vont en mort cellulaire programmée⁹¹⁻⁹³. Trois gènes de *C. elegans* semblent essentiels pour le déroulement de toute mort programmée de cellules somatiques : *egl-1*, *ced-4* et *ced-3*^{94,95} (Figure 2). D'un autre côté, *ced-9*, une protéine anti-apoptotique, protège la cellule contre la mort en se liant directement et séquestrant *ced-4*^{96,97}. *Egl-1* est capable d'induire la mort cellulaire programmée si surexprimée⁹⁵. Après son activation par des signaux en amont, *egl-1* interagit avec *ced-9* et relâche la protéine *ced-4* de l'emprise de *ced-9*⁹⁸. *Ced-4* libéré interagit et facilite l'activation de *pro-ced-3*⁹⁹⁻¹⁰¹. La protéase active, *ced-3*, agit comme le médiateur d'événements de la mort cellulaire, menant à la destruction de la cellule. La protéase active certaines protéines « tueuses » et inactive des protéines protectrices et nécessaires à l'homéostasie⁹⁸. Les analyses génétiques de *C. elegans* ont identifié des gènes fonctionnant dans la mort cellulaire programmée, ordonné ces gènes en une voie

généétique et mené à la découverte de gènes similaires contrôlant la mort cellulaire programmée dans d'autres organismes, incluant les mammifères.

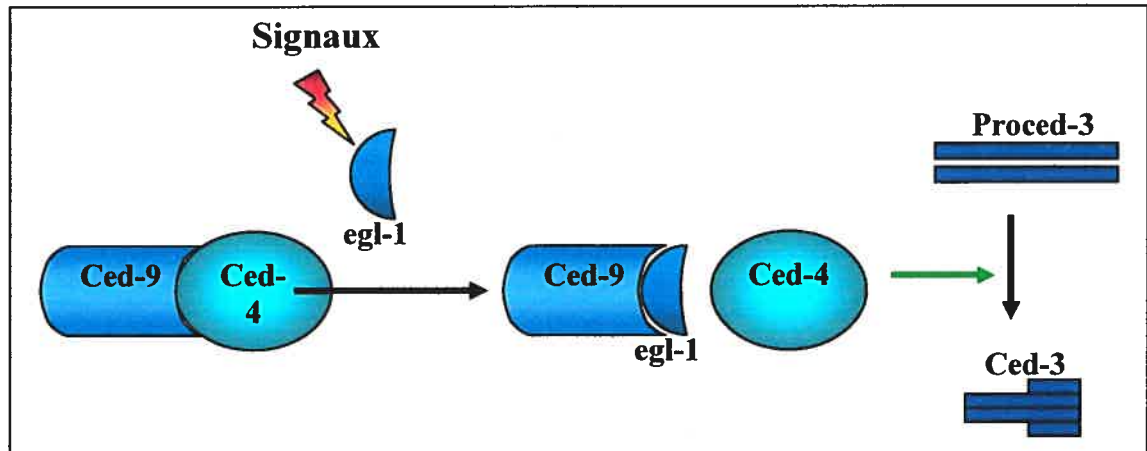


Figure 2 : Schéma de l'apoptose chez *C. elegans*.

1.2.2- L'apoptose

Une cellule apoptotique présente certains traits morphologiques distinctifs : condensation de la chromatine, fragmentation nucléaire, fragmentation de l'ADN en fragments à haut poids moléculaire (50-300 kpb)^{102,103} et en fragments de longueur nucléosomale (180pb), externalisation des phosphatidylsérines, la formation de boursofflure dans la membrane, tout en préservant l'intégrité membranaire. Éventuellement, il y aura formation de corps apoptotiques qui seront captés grâce aux phosphatidylsérines externes et éliminés par phagocytose^{104,105}. L'apoptose est un processus mettant en jeu plusieurs protéines autant activatrices qu'inhibitrices, c'est un processus hautement régulé. L'apoptose peut être déclenchée par deux voies distinctes : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque ou du récepteur de mort (DR).

1.2.2.1- La voie intrinsèque

Les stress génotoxiques, la carence de facteurs de croissance, des bris double brin de l'ADN et l'hypoxie sont des activateurs classiques de la voie intrinsèque (Figure 3). Ces stress cellulaires stabilisent p53 via sa dissociation avec MDM2¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ qui, autrement, cible p53 pour l'ubiquitination et sa dégradation par la voie du protéasome¹⁰⁹. Lorsqu'un résidu sérine de p53 est phosphorylé¹¹⁰, p53 est libéré de MDM2 et n'est plus susceptible d'être dégradé. Une fois induit, p53 agit comme facteur de transcription liant la séquence régulatrice et transactive un nombre de gènes incluant : p21, MDM2, GADD45, etc¹¹¹⁻¹¹⁴. Un des rôles majeurs de p53 est de réguler l'expression de protéines de la famille des Bcl-2. Il diminue l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et augmente l'expression de protéines pro-apoptotiques, bax, PUMA et Noxa^{107,110}.

a- La famille des B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)

Les protéines de la famille des Bcl-2 sont directement impliquées dans le processus d'apoptose et leur régulation se fait par un processus d'interaction protéine-protéine. La famille est subdivisée en trois groupes : anti-apoptotique, pro-apoptotique à multidomains et pro-apoptotique BH₃-seul^{115,116}.

Beaucoup de protéines de la famille des Bcl-2 peuvent homodimériser, mais les membres pro- et anti-apoptotiques peuvent hétérodimériser. L'hétérodimérisation peut être vu comme une neutralisation par la liaison d'un membre anti- et pro-apoptotique^{115,117,118}. Donc, les cellules avec un excès de pro-apoptotiques seraient

plus sensibles à la mort, alors que les cellules avec plus d'anti-apoptotiques seraient plus résistantes.

La sous-famille pro-apoptotique à multidomaine est constituée de Bax, Bak, Bok et Bcl-rambo. Ces protéines partagent une homologie de séquence avec trois domaines d'homologie à Bcl-2 (BH), soit BH₁, BH₂ et BH₃. En réponse à des stimuli apoptotiques, Bax et Bak forment des homomultimères¹¹⁹⁻¹²¹. Bax est dans le cytoplasme et, après stimulation, se dirige et s'intègre à la mitochondrie¹²², alors que Bak s'y trouve déjà. D'après certains résultats, Bax et Bak subissent un changement conformationnel après la stimulation apoptotique^{119-121,123-126}. Le multimère de Bax induit la libération du cytochrome c par la mitochondrie¹²⁶. Récemment, il a été démontré que p53 active directement Bax ce qui mène à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et à l'apoptose¹²⁷. Les protéines Bax et Bak sont aussi activées par les BH₃-seul¹²⁸.

La sous-famille pro-apoptotique BH₃-seul correspond aux senseurs des signaux de mort, tout comme la protéine egl-1 chez *C. elegans*⁹⁵. Bid, Bim, Bmf et Bad se retrouvent en dehors de la mitochondrie. Suite à une stimulation apoptotique, les protéines BH₃-seul sont modifiées par différents mécanismes et transloquées à la mitochondrie, menant à une augmentation de la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie^{108,129-136}.

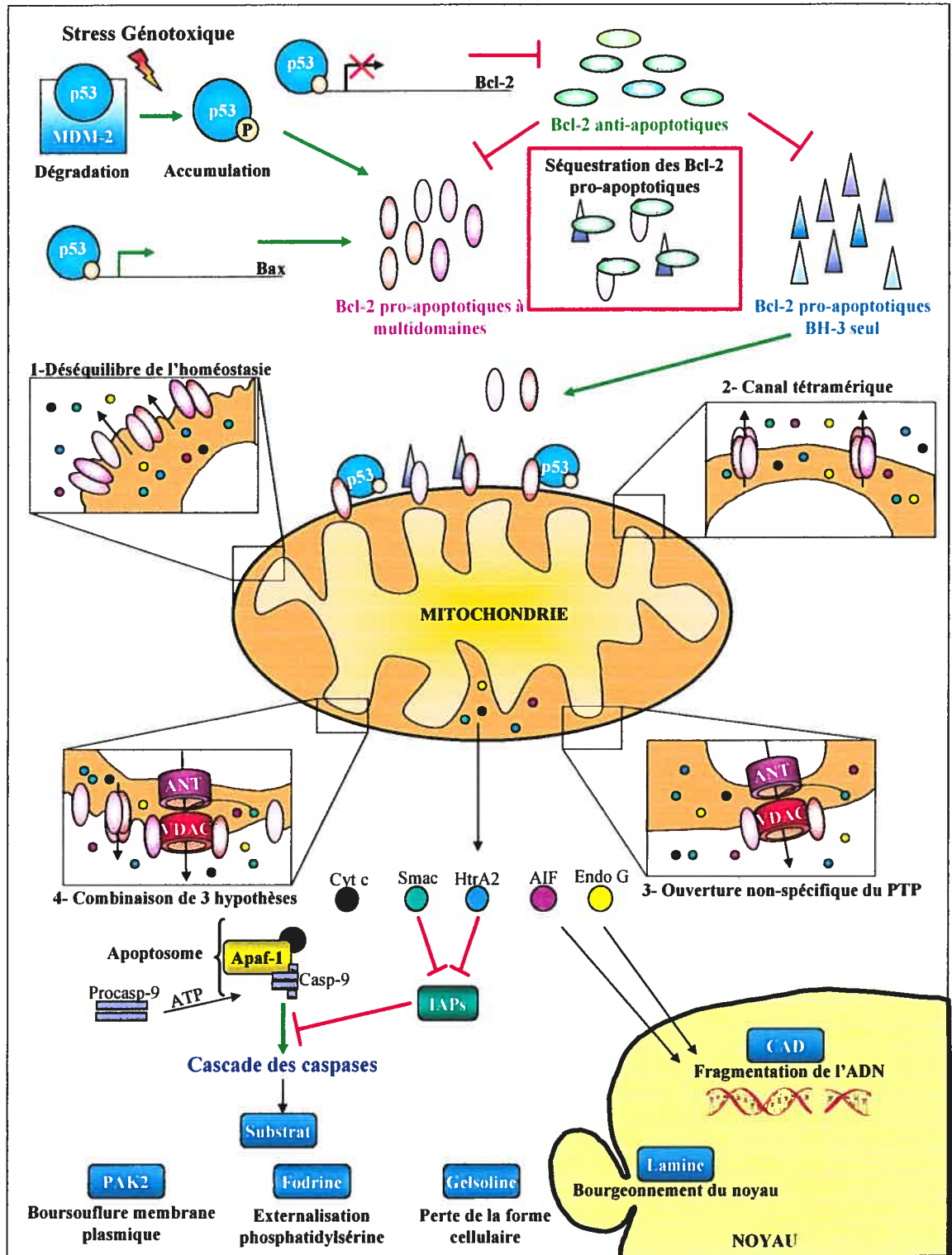


Figure 3 : Schéma de la voie intrinsèque de l'apoptose. Différents stress génotoxiques permettent la libération de p53 de son emprise par MDM2, ainsi p53 s'accumule. La protéine p53 est un facteur de transcription qui active le gène codant pour Bax et inhibe le gène codant pour Bcl-2. Les protéines du

sous-groupe anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 séquestrent et inhibent les membres des sous-groupes pro-apoptotiques. Lorsque les protéines du sous-groupe des pro-apoptotiques à BH-3 seul sont activées, elles activent ou recrutent à la mitochondrie certains membres pro-apoptotiques à multidomaines. La protéine p53 a aussi la capacité d'activer et d'acheminer à la mitochondrie la protéine Bax (Bcl-2 pro-apoptotique à multidomaines). Les Bcl-2 pro-apoptotiques médient la libération du contenu intermembranaire de la mitochondrie. Plusieurs mécanismes hypothétiques sont suggérés : 1- Destruction de l'homéostasie de la membrane mitochondriale par la présence d'un surplus de protéines Bcl-2 pro-apoptotiques à multidomaines; 2- Formation d'un canal tétramérique par des protéines Bcl-2 pro-apoptotiques à multidomaines; 3- L'ouverture non-spécifique du pore de transition de perméabilité (PTP) par les membres pro-apoptotiques à multidomaines de la famille des Bcl-2; 4- La combinaison de ces trois stratégies. Ensuite, le cytochrome c (cyt c), Smac (Smac/DIABLO), HtrA2, Endo G (Endonucléase G), et AIF (facteur induisant l'apoptose) sont libérés par la mitochondrie. Le cytochrome c se joint à Apaf-1 et l'ATP pour activer la procasp-9 (procaspase-9), ainsi le complexe forme l'apoptosome. La casp-9 (caspase-9) déclenche la cascade des caspases qui mènent aux clivages de certaines protéines : PAK2, fodrine, gelsoline, lamines, CAD (Nucléase d'ADN activée par caspase). Le clivage de PAK2 induit les boursoufflures de la cellule. Le clivage de la fodrine mène à l'externalisation des phosphatidylsérine. Le clivage de gelsoline mène à la perte de la forme cellulaire. Le clivage de la lamine induit un bourgeonnement du noyau et le clivage de CAD mène à la fragmentation de l'ADN. Smac et HtrA2 inhibe l'action des IAPs (protéines inhibitrices de l'apoptose) qui est d'inhiber l'activation des caspases. AIF et EndoG induisent une fragmentation de l'ADN. VDAC : Canal à anions voltage dépendant, ANT : Translocateur du nucléotide adénine.

Les membres du sous-groupes anti-apoptotique de la famille des Bcl-2 possèdent une homologie de séquence des quatre régions BH, soit BH₁ à BH₄. Les protéines Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 et A1 (Bfl-1) font partie du groupe anti-apoptotique. La protéine Bcl-2 possède des similarités avec la protéine anti-apoptotique ced-9 retrouvée chez *C. elegans*¹³⁷. Bcl-2 lie les membres pro-apoptotiques autant les multidomaines que les

BH₃-seul^{126,138}. Ainsi, les protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 séquestrent les protéines BH₃-seul activées¹³⁸.

La fonction majeure de cette famille de Bcl-2 est de moduler directement la perméabilité membranaire et, dès lors, de réguler la libération de facteurs apoptogéniques de l'espace intermembranaire dans le cytoplasme.

b- Perte d'intégrité de la mitochondrie

La mitochondrie est une organelle entourée d'une double membrane qui la divise en deux compartiments submitochondriaux : l'espace intermembranaire, situé entre les deux membranes, et la matrice qui est le compartiment interne. Un canal transmembranaire appelé le pore de transition de perméabilité (PTP) fait le contact entre les membranes mitochondriales interne et externe. Les éléments centraux du PTP sont le canal à anion voltage dépendant dans la membrane externe et le translocateur du nucléotide adénine dans la membrane interne. Le PTP est essentiel au maintien du potentiel électrochimique requis pour permettre la synthèse mitochondriale d'ATP par phosphorylation oxydative fournissant en ATP la cellule. La production mitochondriale d'ATP est dépendante de l'intégrité de la membrane mitochondriale interne¹³⁹. Par contre, il est devenu évident que la mitochondrie possède un mécanisme latent appelé la perméabilité de transition mitochondriale (MPT) qui lorsque activée, détruit cette barrière perméable et détruit la fonction mitochondriale normale¹⁴⁰. Une conséquence de l'activation de MPT est d'abolir le maintien de la production d'ATP. Puisque l'apoptose est un mécanisme ATP

dépendant¹⁴¹, la cellule doit maintenir sa production d'ATP et ce, même s'il y eu libération de son contenu intermembranaire, plus précisément du cytochrome c. Il a été démontré que le peu de cytochrome c restant à la mitochondrie était suffisant pour faire fonctionner la chaîne de transport d'électron, de maintenir la différence de potentiel et de produire l'ATP nécessaire au bon fonctionnement de l'apoptose^{142,143}.

Différents modèles ont été proposés pour expliquer la relâche de facteurs apoptogéniques par la mitochondrie. Le premier modèle : les membres pro-apoptotiques à multidomaines de la famille de Bcl-2 interagissent avec le complexe protéique formant le PTP et induit son ouverture non-spécifique^{144,145}. Le deuxième modèle est la formation d'un pore par l'oligomérisation de Bcl-2 pro-apoptotiques dans la membrane mitochondriale externe. Par exemple, Bax et Bak formeraient des canaux tétramériques par où le contenu intermembranaire pourrait s'échapper^{119,146,147}. Le troisième modèle suggère la possibilité que la famille des Bcl-2 contrôle l'homéostasie de la mitochondrie. Les signaux apoptotiques altèrent la physiologie de la mitochondrie menant à la rupture physique de la membrane mitochondriale externe et à la libération du contenu intermembranaire dans le cytosol¹⁴⁸. L'ensemble des études voudrait que ces trois modèles se produisent simultanément pour mener à la perte d'intégrité de la membrane mitochondriale externe suite à des stimuli apoptotiques. Les facteurs connus libérés par la mitochondrie qui sont impliqués dans la mort cellulaire inclus le cytochrome c¹⁴⁹, Smac/Diablo^{150,151}, facteur d'induction de l'apoptose (AIF)¹⁵², HtrA2/Omi¹⁵³⁻¹⁵⁷, et l'endonucléase G¹⁵⁸.

Le cytochrome c a été décrit pour la première fois en 1930¹⁵⁹ et pendant plus de 60 ans le seul rôle attribué était le transporteur d'électron dans la chaîne de transport d'électron. Dans les années 90, il est devenu évident que le cytochrome c était impliqué dans la mort cellulaire programmée d'organisme complexe tel que le *Xenopus laevis*, la souris et l'humain¹⁶⁰⁻¹⁶². La libération du cytochrome c suite à un stress cellulaire mène à l'assemblage de l'apoptosome, un complexe formé du cytochrome c, de Apaf-1 et de dATP. Le cytochrome c lie Apaf-1 en présence de dATP et convertit Apaf-1 pour recevoir la procaspase-9. Apaf-1 lie la procaspase-9 grâce à son domaine de recrutement de caspase (CARD) et provoque l'activation de la procaspase-9¹⁶³⁻¹⁶⁵. Apaf-1 est un homologue de ced-4 chez *C. elegans*, mais ced-4 ne possède pas de site de liaison pour le cytochrome c et le cytochrome c ne semble pas intervenir dans la mort cellulaire chez *C. elegans*¹⁶⁶. Apaf-1 est une sous-unité régulatrice essentielle à l'activité de la caspase-9¹⁶⁷.

c- Les cystéines aspartases (caspases)

Les caspases sont des protéases synthétisées sous forme de zymogènes enzymatiquement inertes. Ces zymogènes sont composés de trois domaines : un prodomaine N-terminal, un domaine p20 et un domaine p10. L'enzyme mature se retrouve toujours sous forme d'hétérotétramère ayant deux hétérodimères p10/p20 pour un total de deux sites actifs¹⁶⁸. L'activation de la majorité des caspases (sauf les caspases-2, -8 et -9) se fait par le clivage entre les domaines p10 et p20 et entre le domaine p20 et le prodomaine. Tous les clivages sur les caspases se font à la suite d'un résidu d'acide aspartique (qui est le substrat préférentiel des caspases). La façon

la plus facile d'activer une procaspase est de l'exposer à une caspase active¹⁶⁹. Cette stratégie de cascade de caspases est utilisée pour l'activation des caspases-3, -6 et -7 effectrices. La cascade des caspases est une méthode d'amplification et d'intégration du signal apoptotique¹⁴⁸.

Donc, une fois que la caspase-9, une caspase activatrice, est activée par la formation de l'apoptosome, elle peut activer la caspase-3. Ensuite, la caspase-3 active les caspases-6 et -7. Les caspases-3, -6 et -7 sont des caspases effectrices qui possèdent plusieurs substrats qui mènent à l'aboutissement de l'apoptose. Toutes les caspases clivent leurs substrats en aval d'un résidu d'acide aspartique, mais chacune des caspases possède une spécificité quant au résidu entourant l'acide aspartique. Les caspases possèdent plusieurs substrats, et leur clivage peut mener à différentes conséquences concernant l'avenir de la protéine. La coupure d'une protéine peut mener à l'inactivation d'une enzyme ou au désassemblage d'une structure cellulaire. La protéine du cytosquelette, fodrine, est responsable de la liaison des protéines membranaires aux éléments du cytosquelette et sert d'ancrage pour les phosphatidylsérine du côté cytoplasmique¹⁷⁰. Le clivage de fodrine par les caspases effectrices provoque la perte de la forme cellulaire et l'externalisation des phosphatidylsérine. Gelsoline est une protéine associée à l'actine et peut mener à la perte de la forme cellulaire associée à l'apoptose. Le clivage de lamines nucléaires induit la réduction et le bourgeonnement du noyau¹⁷¹⁻¹⁷⁴. La coupure d'une protéine peut permettre l'activation constitutive en libérant cette dernière d'une sous-unité régulatrice comme dans le cas de la Nucléase d'ADN activée par les caspases (CAD). CAD est une nucléase liée en permanence à une sous unité inhibitrice et les caspases

permettent la libération de l'activité de CAD et, ainsi, permettent la fragmentation de l'ADN¹⁷⁵. La fragmentation de l'ADN, lorsque les caspases sont actives, se fait entre chaque nucléosome produisant des fragments d'ADN d'environ 180pb. De plus, les caspases mènent à l'activation constitutive de PAK2 qui médie les boursofflures de la membrane plasmique des cellules apoptotiques¹⁷⁶. Ensuite, il y a fragmentation cellulaire en vésicules entourées de membranes qui sont rapidement digérées par les cellules voisines⁵⁵.

La formation de l'apoptosome suite à la relâche du cytochrome c dans le cytoplasme n'est pas toujours suffisante pour l'activation de la cascade des caspases. Il existe des protéines inhibitrices d'apoptose (IAPs) qui préviennent l'activation des caspases, inhibent l'activité des caspases matures¹⁷⁷. Les IAPs ont la capacité de se diriger vers la voie de dégradation par le protéasome, en entraînant les protéines qui lui sont complexées. Smac/Diablo agit en dimère et contribue à l'activation des caspases en séquestrant les IAPs^{150,151}. Smac/Diablo possède des motifs de reconnaissance semblables à certains motifs qui se retrouvent sur des caspases. Donc, Smac/Diablo rivalise avec les caspases pour se lier aux IAPs¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. HtrA2/Omi, est une sérine protéase de mammifère^{181,182}. Sa fonction n'est pas claire, mais il semble induit dans des conditions de stress comme l'ischémie-reperfusion, choc de chaleur et stress du réticulum endoplasmique. HtrA2/Omi a été identifié pour la première fois comme pro-apoptotique suite à son habileté à lier et antagoniser les IAPs^{151,154} ce qui démontre son activité dépendante des caspases. HtrA2/Omi contribue aussi à la mort cellulaire programmée indépendante des caspases avec son activité sérine protéase¹⁵⁶.

1.2.2.2- La voie extrinsèque

La voie extrinsèque implique une famille de récepteurs de mort (DR) qui sont exprimés à la surface cellulaire et qui ont pour fonction de transmettre les signaux induisant l'apoptose lorsque activés par les ligands de mort (Figure 4). Dans cette famille, le récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR) et Fas sont des récepteurs examinés de façon exhaustive. Puisqu'une implication de Fas a été démontrée dans les désordres vasculaires (voir 1.2.2.3), seulement la signalisation par Fas menant à l'apoptose sera décrite. La trimérisation de Fas est requise pour la transduction du signal apoptotique. Fas contient un domaine cytoplasmique (Domaine de mort : DD) requis pour la transmission du signal apoptotique, une fois que Fas L est lié du côté extracellulaire¹⁸³. Le DD de Fas interagit avec une protéine de liaison FADD (DD associé à Fas)^{184,185}. FADD possède aussi un domaine d'exécution de mort (DED) qui sert au recrutement de la procaspase-8 (aussi appelée FLICE) par son domaine DED. L'accumulation du zymogène procaspase-8 à un endroit donné mène à l'activation de la caspase-8 par une auto-protéolyse. La caspase-8 doit former un hétérotétramère pour s'activer¹⁸⁵. L'activation de la procaspase-2 se fait par le même mécanisme que l'activation de la procaspase-8¹⁴⁸. La caspase-8 active la procaspase-3 et déclenche la cascade des caspases. L'apoptose médiée par Fas peut être bloquée par des molécules inhibitrices endogènes FLIPs (Protéine inhibitrice apparentée à Flice) qui possèdent deux DED et inhibent le recrutement de la procaspase-8¹⁸⁶⁻¹⁹⁴. Le signal de mort induit par Fas peut aboutir à l'activation de la mitochondrie¹⁹⁵, suite au clivage de Bid (BH₃-seul) en Bid tronqué (Bidt) par la caspase 8. Bidt se transloque à la membrane mitochondriale et induit la relâche du contenu

intermembranaire de la mitochondrie^{129,130}. Le signal apoptotique est amplifié par la perte d'intégrité de la mitochondrie.

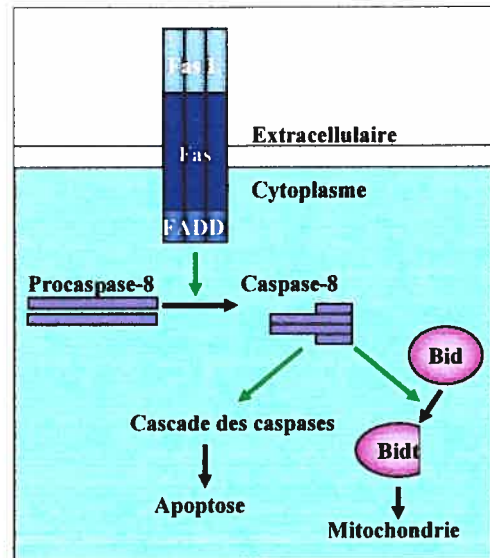


Figure 4 : Schéma de la voie extrinsèque de l'apoptose par le récepteur de mort Fas.

1.2.2.3- L'apoptose et les désordres vasculaires

Plusieurs expériences ont démontrés l'implication de l'apoptose et, plus précisément, certaines protéines apoptotiques dans les désordres vasculaires. Des études ont démontré qu'une diminution de p53 permet une résistance à l'apoptose et une prolifération des CML lors des événements initiaux de l'épaississement néointimal^{196,197}. Il a été démontré que l'apoptose néointimale peut être induite par l'ablation de Bcl-X_L en utilisant un antisens menant à une diminution de l'épaississement intimal¹². Alors, Bcl-X_L est présent dans les CML, ce qui permet le développement d'une résistance à l'apoptose des CML^{12,198,199}. La voie extrinsèque a aussi fait ses preuves dans certains troubles vasculaires. L'apoptose médiée par Fas joue un rôle dans une variété de désordre vasculaire incluant l'athérogénèse^{13,200-203},

la vasculopathie de transplantation²⁰⁴ et l'inflammation. Des souris déficientes pour les gènes de Fas et/ou Fas L souffrent de maladies rhumatisques caractérisées par l'inflammation aberrante^{205,206}. L'augmentation de l'expression de FasL dans les CE et les CML augmente l'apoptose de cellules cytotoxique T et macrophages, augmente la survie des cellules vasculaires et résulte en une accumulation intinale des CML²⁰³. FLIP, abondant dans les CE, a pour fonction d'inhiber la mort induite par Fas²⁰⁷. FLIP est inhibé dans les CML dont l'insulte endothéliale est induite par ballon et dans les plaques athérosclérotiques humaines²⁰⁸ et aurait un rôle dans la régulation du remodelage.

1.2.3- Autres morts cellulaires programmées

Si on ne se base que sur les critères morphologiques de l'apoptose (forme de la chromatine, fragmentation, condensation), les caspases semblent indispensables à l'apoptose. La nécrose de son côté est plutôt une mort dérégulée où la perte de l'intégrité membranaire a lieu précocement dans le processus. Il existe une panoplie de type de mort cellulaire programmée qui se situe entre ces deux extrémités que sont l'apoptose et la nécrose. La mort cellulaire programmée peut avoir lieu en absence de la condensation de la chromatine d'une façon apparentée à la nécrose²⁰⁹⁻²¹¹. La mort induite de façon apparentée à l'apoptose rassemble tous les types de mort cellulaire programmée indépendante des caspases, mais où la condensation et la fragmentation de l'ADN sont moins prononcées (fragments à haut poids moléculaire seulement)²¹²⁻²¹⁹. L'inhibition de l'activation des caspases ne protège pas nécessairement contre les stimuli de mort, mais semble plutôt révéler des programmes de mort cellulaire

indépendants des caspases. Dans plusieurs modèles expérimentaux d'apoptose induite par les DR^{209,211,220-222}, la carence en facteurs de croissance²²³ et les oncogènes²²⁴, des voies alternatives de mort cellulaire ont été découvertes suite à l'utilisation de l'inhibiteur pan-caspase (z-VAD-fmk). Plusieurs évidences montrent que ces mécanismes de seconde ligne seraient courants dans la physiologie normale et la pathologie. Ces types de mort impliquent différentes protéases ayant des substrats semblables aux caspases comme HtrA2/Omi^{154,157}, les calpaïnes²²⁵ et les cathepsines²²⁶. Dans d'autres cas, AIF ou l'endonucléase G peuvent être libérés par la mitochondrie sans qu'il y ait activation des caspases. AIF est une protéine mitochondriale qui se transloque au noyau en réponse à des stimuli apoptotiques²²⁷. La surexpression de AIF induit la condensation de la chromatine, la dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial, l'exposition des phosphatidylsérine sur la membrane plasmique et la fragmentation de l'ADN à haut poids moléculaire (50kbp)²²⁸ et n'est pas perturbé par l'inhibiteur pan-caspase z-VAD-fmk, mais est incapable d'induire la fragmentation nucléosomique de l'ADN²²⁹. Le mécanisme moléculaire de l'activité cytotoxique de AIF est essentiellement indépendant des caspases, mais reste inconnu^{152,230-235}. La nucléase mitochondriale non-spécifique, l'endonucléase G, est hautement conservée chez les eucaryotes. Son rôle précis dans la mitochondrie est incertain²³⁶. Suite à un stress apoptotique, l'endonucléase G est transloquée au noyau et digère l'ADN en absence de l'activité des caspases^{158,237}, mais la dégradation est plus grossière que lorsque les caspases sont activées²³⁸. Suite à l'inhibition des caspases *in vivo* des voies alternatives font également surfaces dans des processus de sélections négatives de lymphocytes^{239,240} ou l'enlèvement embryonnaire des

membranes interdigitales²⁴¹. Le chevauchement des voies de mort induites par un stimulus serait plutôt la règle que l'exception^{209,242}.

1.3- PROLIFÉRATION

En temps normal, les CML de la paroi vasculaire sont en phase de quiescence. Suite à une lésion au niveau de l'endothélium, les CML jouent le rôle principal dans la réponse fibromusculaire des maladies vasculaires, car elles sont la source principale de tissu dans la paroi. Les CML quittent leur stade statique pour acquérir une plasticité leur permettant de répondre aux facteurs de croissance et autres stimuli en démarrant leur cycle cellulaire. Cette prolifération des CML contribue au développement de la lésion néointimale caractéristique, entre autres, de l'athérosclérose. La prolifération des CML est nécessaire à la réparation de l'insulte puisque les CML servent de forces contractiles pour éviter que la plaie aille en profondeur.

1.3.1- Le cycle cellulaire

1.3.1.1- Historique

Au XVII^e siècle, grâce au perfectionnement du microscope, la première cellule a pu être observée par l'oeil humain²⁴³. Au XIX^e siècle, on pouvait voir la division cellulaire séparée en deux phases : la phase de croissance (interphase) et la phase de division (la mitose). Lorsqu'il a été possible d'observer la réplication de l'ADN, il a été constaté que la réplication se déroulait à un moment précis de l'interphase,

nommée la phase de synthèse de l'ADN, maintenant considérée comme une étape du cycle cellulaire²⁴⁴. À cet instant, le cycle cellulaire comptait quatre phases : le gap1 (G1), la synthèse de l'ADN (S), le gap 2 (G2) et la mitose (M)^{245,246}. La période G1, entre la phase M et S, est le moment où la cellule grossit. L'ADN se réplique pour obtenir deux copies de son contenu génétique dans la phase S. La période G2 sert de contrôle pour s'assurer que la cellule a bien doublé son contenu d'ADN. Ensuite, il y a division de tous les éléments d'une cellule pour obtenir deux cellules filles pendant la mitose. Il existe une dernière phase, nommée G0, qui représente une période de quiescence où il n'y a pas de croissance cellulaire.

Le cycle cellulaire permet à la cellule de se diviser tout en gardant une stabilité génomique. Un système de surveillance s'assure que chacune des étapes est complétée et alternée²⁴⁷. Un événement spécifique doit être complété avant que l'événement suivant soit entamé. Par exemple, une fois que l'ADN est condensé, il ne décondense pas tant que la mitose n'est pas terminée. De plus, un événement complété ne doit pas être répété. Une fois que l'ADN est répliqué dans la phase S, il est condensé plutôt que répliqué pour une seconde fois. Il existe évidemment plusieurs mécanismes de régulation qui permettent le contrôle de la complétion et de l'alternance.

Les expériences de Rao et Jonhson ont démontré qu'il existe des molécules capables de contrôler la destinée d'une cellule^{248,249}. Lorsque des cellules en phase S sont fusionnées avec des cellules en phase G1, il y a une répllication prématurée du contenu d'ADN, mais il n'y a pas d'entrée en phase M avant que l'ADN soit

complètement répliqué. Par contre, la fusion de cellules en phase S avec des cellules en phase G2 n'induit pas une ré-réplication de l'ADN. Ces résultats ont permis de conclure que : 1- les cellules en phases S possèdent un facteur promoteur de la phase S (SPF) possédant une activité dominante sur G1, mais n'ayant pas d'effet sur G2, 2- les cellules dans la phase G2 possèdent un blocage contre le SPF prévenant la réplication de l'ADN des cellules en G2, 3- les cellules en phase S possèdent un contrôle prévenant l'entrée en phase M avant la réplication de l'ADN. La fusion de cellules en phase M avec des cellules en phases G1, S et G2 a mené à la découverte d'un facteur promoteur de la phase M (MPF). Dans tous les cas, les cellules ont une perte d'intégrité de la membrane nucléaire et il y a condensation de la chromatine. Donc, les cellules en phases M possèdent un MPF qui a une activité dominante sur les autres phases du cycle cellulaire. Lorsque la mitose est terminée, la cellule doit s'assurer d'éliminer ce MPF dominant avant de poursuivre le cycle cellulaire.

La cellule a aussi l'habileté de faire une pause transitoire pendant le cycle cellulaire en réponse à des agents qui causent des dommages, particulièrement à l'ADN. SPF et MPF sont maintenant caractérisés comme des complexes protéiques ayant deux composantes clés : une sous-unité régulatrice (cycline), une protéine kinase (kinase dépendante de cyclines – cdk). Différents complexes de cyclines/cdk sont exprimés dans différentes phases du cycle cellulaire (Figure 5). Les cyclines ont un temps d'apparition spécifique et les kinases ont une activité spécifique.

1.3.1.2- Contrôles des kinases dépendantes de cycline (cdk)

Alors que les niveaux de cdk restent stables au cours de la progression du cycle cellulaire, l'expression des cyclines varie selon des phases de transcription périodique et de régulation post-traductionnelle²⁵⁰. Ainsi, chaque cycline a un patron d'expression unique durant le cycle cellulaire. En contrôlant l'activité des cdk, les régulateurs de cdk peuvent aussi contrôler le cycle cellulaire. Les activateurs de cdk sont les cyclines, les inhibiteurs sont les inhibiteurs de cdk (cki) et les cdk peuvent aussi être contrôlés par la phosphorylation.

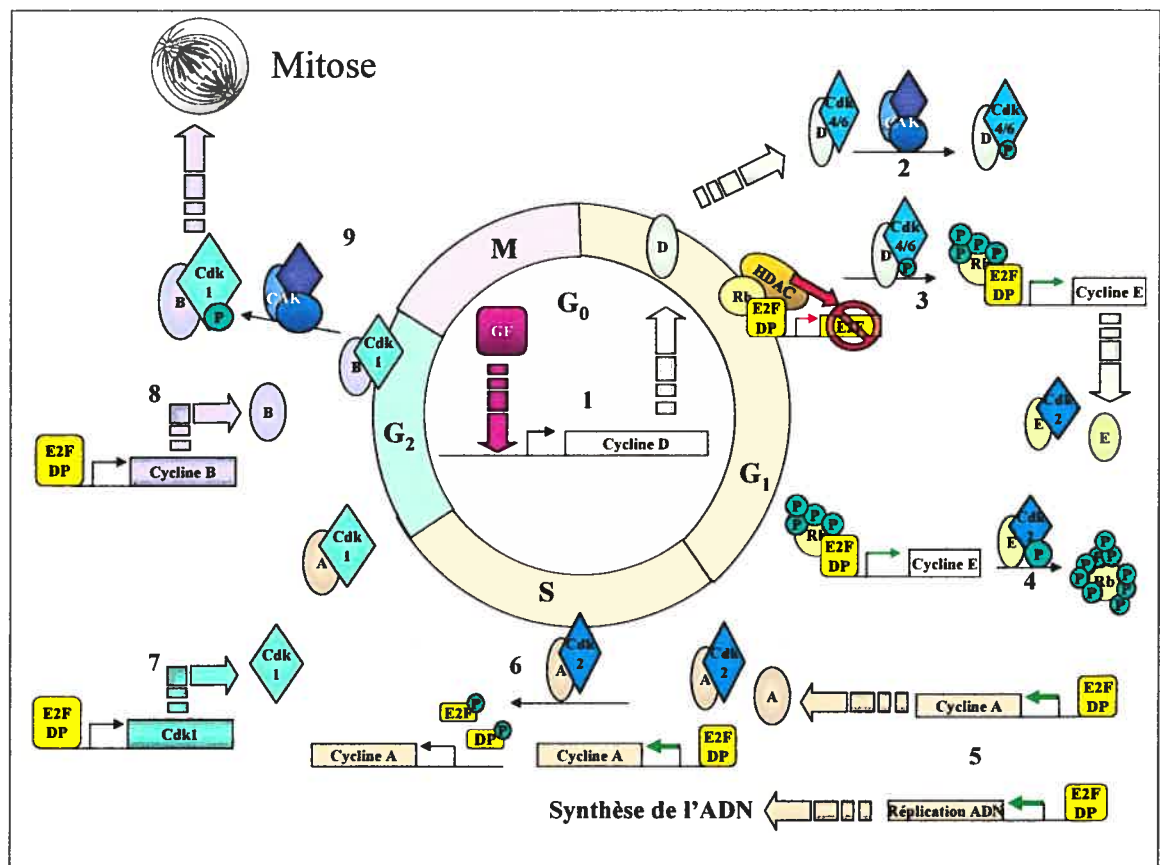


Figure 5 : Schéma simplifié du cycle cellulaire: 1- Lorsque les cellules sont en quiescence (G₀) l'ajout de facteurs mitogéniques (GF) active l'expression de la cycline D. La cycline D s'accumule et se lie à la kinase dépendante de cycline (cdk) 4/6 pendant la phase G₁. 2- Pour être actif, le complexe cycline D/cdk4/6 doit être phosphorylé par une kinase activatrice de cdk (CAK). 3- Un des modèles de

l'inhibition de E2F-DP par Rb est le recrutement d'un complexe ayant une activité histone déacétylase qui réprime la transcription par remodelage de la chromatine. E2F-DP est un hétérodimère capable de lier et d'activer l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la réplication de l'ADN. Lorsque cycline D/cdk4/6 phosphoryle Rb, HDAC quitte le complexe et l'ADN se décompacte. La répression par Rb est diminuée et les gènes contrôlés par E2F, dont la cycline E, sont exprimés. 4- La cycline E s'associe avec cdk2 et, ensemble, phosphoryle Rb ce qui entraîne une dissociation de Rb et E2F. 5- Ainsi, E2F-DP transmettent pleinement leur activation de la transcription des gènes de la progression du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN. 6- En phase S, il y a production de la cycline A qui lie cdk2. Cycline A/cdk2 phosphoryle E2F et DP ce qui entraîne leur dissociation et la libération de l'ADN. 7- Le gène codant pour cdk1 est activé par le facteur E2F, mais le mécanisme n'est pas bien défini. cdk1 se lie à la cycline A dans la phase G2. 8- L'activation de la transcription de la cycline B par E2F n'est pas définie. 9- La cycline B se lie à cdk1 qui doit être phosphorylé par CAK pour être actif et le complexe permet la progression de la mitose.

a- Les cyclines de la phase G0/G1

Les facteurs de croissance sont responsables de l'induction de l'expression de la cycline D²⁵¹⁻²⁵⁴. Trois cyclines de type D, cycline D1, D2, D3, sont induites dans différentes lignées cellulaires²⁵³⁻²⁵⁷. La majorité des résultats portent sur la cycline D1 qui a été étudiée de façon exhaustive. Dans les cellules en phase G0, il y a une diminution de l'expression de la cycline D, puis des stimuli mitogéniques peuvent induire la production de cycline D et permettre à la cellule de reprendre le cycle cellulaire dans la phase G1²⁵¹⁻²⁵⁴. L'induction de la cycline D1 est dépendante des facteurs de croissance et est hautement régulée, autant au niveau de l'activation transcriptionnelle, de l'expression protéique que de la localisation cellulaire. Plusieurs protéines ont été démontrées comme étant des activateurs du promoteur de

la cycline D1, mais le promoteur est aussi sujet à l'inhibition pour permettre un arrêt en G1. L'induction par des mitogènes de la cycline D1 dépend de l'activation des MAPK. Cette voie implique séquentiellement, la Ras GTPase et la protéine kinase Raf1 qui phosphoryle la MAPK kinase. Ensuite, la MAPK kinase phosphoryle ERK permettant sa translocation noyau pour augmenter la transcription de la cycline D1^{258,259}. En absence de mitogènes, la cycline D1 est transportée du noyau vers le cytoplasme, lie la SCF ubiquitine E3 ligase pour être dirigée vers la dégradation par le protéasome^{260,261}. L'exportation nucléaire est médiée par la kinase-3 β de la synthèse de glycogène (GSK-3 β) une kinase inhibée par la voie Ras/PI3k/Akt^{262,263}. Ces observations indiquent que les voies intracellulaires activant l'expression de la cycline D1 sont coordonnées pour activer la synthèse par la voie Ras/Raf/MAPK et pour contrôler sa stabilité par la voie Ras/PI3k/Akt. Ras est donc impliqué dans l'activation de la voie cycline/cdk/E2F de la phase G1.

Il a été démontré que l'utilisation d'antisens ou bien l'injection d'un anticorps neutralisant dirigé contre la cycline D1 empêchaient l'entrée de la cellule dans la phase S. Si la cellule se trouvait à la limite G1/S, les mêmes procédures ne bloquaient pas l'entrée de cette cellule dans la phase S^{264,265}. La cellule atteint donc un point de non-retour où même l'ablation de la cycline D1 n'a plus d'effet sur la progression du cycle cellulaire.

La cycline D permet aux cellules de faire la transition G1/S et participe dans la transduction de signaux mitogéniques externes à d'autres composantes de la machinerie G1/S permettant la transition G0/G1 et la transition de la phase G1

précoce vers la limite G1/S^{251-254,266}. La cycline D s'associe avec cdk4 et cdk6^{253,267,268}. La liaison de la cycline D à cdk4 ou cdk6 dépend du tissu puisque cdk4 et cdk6 ont une répartition différente selon le tissu^{267,268}. Pour initier son activité kinase, cdk4, en plus de se lier à la cycline D, doit être phosphorylé sur sa Thr 172 par le complexe cycline H/cdk7/MAT1²⁶⁹. Ce complexe constitue une kinase activatrice de cdk (CAK). Le complexe cycline D/cdk4-6 a pour fonction la phosphorylation des protéines pochettes de la famille Rb, soit la protéine rétinoblastome (Rb), p107 et p130^{270,271}. Pendant plusieurs années, le modèle établi proposait que Rb séquestrait le facteur de transcription E2F et que la phosphorylation de Rb par les complexes cyclines/cdk permettait la libération de E2F et, ainsi, l'induction de la transcription par E2F de gènes essentiels à la progression du cycle cellulaire et à la synthèse de l'ADN²⁴³. Cependant, des études récentes ont montré que la liaison de Rb à E2F n'était pas suffisante pour inhiber les propriétés transcriptionnelles de E2F²⁷², donc la progression du cycle cellulaire pouvait se poursuivre. De nouvelles évidences ont en fait démontré que les membres de la famille Rb recrutent un complexe ayant une activité histone déacétylase (HDAC) ce qui entraîne le repliement de la chromatine²⁷³⁻²⁷⁵. E2F lie l'ADN sur les gènes ayant un site de liaison E2F, Rb lie E2F et recrute HDAC à l'ADN pour induire l'inhibition de la transcription via un remodelage de la chromatine. La phosphorylation de Rb par cycline D/cdk4-6 provoque la dissociation de HDAC, ce qui diminue l'effet inhibiteur de Rb sur E2F²⁷⁶⁻²⁷⁸. E2F est une famille de facteurs de transcription ayant 6 homologues (E2F-1, -2, -3, -4, -5, -6) et ils doivent être liés à un membre de la famille de DP pour être actifs^{279,280}. Les protéines E2F et DP contiennent des domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation très conservés²⁸¹. La sous-unité DP active

indirectement la transcription en potentialisant l'activité de la sous-unité E2F²⁸²⁻²⁸⁴. Le modèle initial voulait que E2F soit un facteur de transcription nécessaire à l'entrée en phase S et à la réplication de l'ADN, donc un facteur qui active la prolifération. Des expériences ont cependant compliqué ce modèle. Ainsi, la surexpression de E2F permet de contrer plusieurs types d'arrêt en G1 et permet l'entrée en phase S (en accord avec le modèle). Par contre, les cellules s'accumulent en phase S, puis entament l'apoptose (une diminution de l'activité de E2F est requise pour quitter la phase S)!²⁸⁵⁻²⁹⁰. D'un autre côté, des souris déficientes en E2F démontrent un défaut dans l'apoptose et une augmentation de la formation de tumeurs²⁹¹. Plusieurs études ont pour objet E2F afin d'expliquer son activité, mais son fonctionnement n'est pas encore totalement élucidé.

Il existerait différentes relations entre les membres de la famille E2F selon leur concentration, localisation et leur activité qui résulte en une régulation transcriptionnelle^{279,280,286,292-294}. Ces facteurs de transcription ont été divisés en deux classes : les activateurs (E2F-1, -2, -3) et les répresseurs (E2F-4, -5). Puisque E2F-6 ne possède pas de domaine de liaison à Rb ou aux cyclines et ni de domaine de transactivation, il se retrouve dans une catégorie distincte²⁸⁰. Selon le moment dans le cycle cellulaire ou le type de E2F, différentes protéines de la famille Rb s'associent à E2F. Dans les cellules quiescentes, les gènes requis pour la transcription de l'ADN²⁹⁵, sont réprimés par les E2F répresseurs (-4, -5) liés à p130. L'activation de la transcription serait initiée en différentes étapes. La phosphorylation de p130 peut causer la relâche des E2F répresseurs et provoque la translocation de E2F-4/-5 du noyau au cytoplasme. Au point de transition G1/S, les sites de liaison de E2F sur les

gènes sont occupés par les complexes E2F-1/-2/-3 -Rb^{296,297}. Une diminution de l'activation des E2F activateurs est requise pour quitter la phase S. Plus le cycle cellulaire progresse, plus E2F-4/p107 s'accumule dans le cytoplasme²⁸⁰. En G2/M, on retrouve au noyau le complexe E2F-4/p130 pour réprimer les gènes ayant un site de liaison E2F²⁹⁷. Les E2F répresseurs sont exprimés constitutivement, alors que les E2F activateurs sont induits juste avant la transition G1/S²⁹⁸. Quelques gènes voient leur expression augmentée prématurément dans la phase G1 précoce dans les cellules déficientes en E2F (ex : cycline E, E2F-1)^{280,295}. La répression transcriptionnelle, dans ce cas, nécessite la liaison sur le promoteur de E2F avec ses corépresseurs, Rb et HDAC²⁹⁵. D'autres gènes nécessitent l'activation de E2F sur leur promoteur tel que cdk1, les cyclines A et B (protéines requises pour la progression du cycle cellulaire)²⁹⁹⁻³⁰¹. Les mécanismes exacts de régulation de la transcription par E2F sont complexes, comparativement au modèle initial, d'autres études sont nécessaires pour compléter les nouveaux modèles.

Jusqu'à maintenant, le seul gène régulé par E2F capable de remplacer E2F est la cycline E³⁰². La mutation de Rb en une forme non-phosphorylable par les cyclines impose un blocage du cycle cellulaire en G1 qui peut être contré par la surexpression de la cycline E³⁰³. La phase S induite par la cycline E résulte en une réplication de l'ADN et a lieu sans transcription dépendante de E2F^{303,304}. De plus, les cdk liant la cycline E phosphorylent Rb et, potentiellement, agissent en amont de E2F, mais les explications sont incertaines³⁰⁵. Les fonctions de E2F et de la cycline E semblent converger vers le produit d'un gène cible de E2F qui agit à l'initiation de la synthèse

de l'ADN par un processus modulé par une phosphorylation dépendante de la cycline E, mais, jusqu'à maintenant, aucun candidat n'a cependant été trouvé²⁸⁰.

La cycline E se lie et active cdk2^{306,307}. Le complexe cycline E/cdk2 joue un rôle crucial dans la transition G1/S. L'expression et l'activité de la cycline E suit l'expression de la cycline D et commence à augmenter dans la phase G1 précoce et atteint son pic à la transition G1/S³⁰⁷⁻³⁰⁹. Des études cristallographiques de cdk2³¹⁰ ont montré que la sous-unité cdk est inactive tant qu'elle est monomérique et non-phosphorylée, car un changement conformationnel est requis pour permettre l'accès au site de liaison dans le noyau catalytique³¹¹. Suite à la liaison d'une cycline, la boucle T n'obstrue plus le site de liaison du substrat, il y a des changements de structure dans le site de liaison à l'ATP, menant au bon positionnement du phosphate de l'ATP pour la réaction de phospho-transfert entre l'ATP et la protéine cible^{268,271}. Alors que la liaison de la cycline E est suffisante pour activer cdk2, la phosphorylation par CAK de la Thr 160 sur cdk2 augmente son activité de 300 fois²⁷¹. Par contre, la phosphorylation de cdk2 sur la Thr 14 et/ou la Tyr 15 par, entre autres, Wee1 provoque l'inhibition de l'activité kinase³¹². Cdc25A est la phosphatase requise pour la déphosphorylation de la Thr 14 et la Tyr 15 et, ainsi, active cdk2³¹³. La phosphorylation de la Thr 14 et/ou la Tyr 15 permettrait à la cellule d'atteindre une concentration critique de complexe cycline E/cdk2 inactif qui, lors de l'activation, induit une transition complète et rapide du cycle cellulaire. Ces phosphorylations peuvent aussi fonctionner pour ralentir l'activation des cdk lors de dommages à l'ADN. Le complexe cycline E/cdk2 possède plusieurs substrats *in vitro* dont la protéine Rb et l'histone H1^{306,307}. Tout comme la cycline D, l'injection d'anticorps

dirigés contre la cycline E empêche l'entrée en phase S. Par contre, si l'injection se fait à la limite G1/S, le cycle cellulaire se poursuit²⁴³.

Les cyclines D et E agissent en coopérativité pour la phosphorylation de la protéine Rb³¹⁴. Rb possède plusieurs sites de phosphorylation et tous doivent être phosphorylés pour inhiber complètement plusieurs de ses fonctions. Lorsque cdk2 est inhibée, le complexe cycline D/cdk4-6 est incapable de phosphoryler la protéine Rb complètement. De son côté, le complexe cycline E/cdk2 est incapable de phosphoryler la protéine Rb à moins qu'elle n'ait été préalablement phosphorylée par le complexe cycline D/cdk4-6. Donc, l'inactivation de la protéine Rb est modulée par des phosphorylations séquentielles induites par les complexes cycline D/cdk4-6 et cycline E/cdk2³¹⁴. La protéine Rb inhibe la transcription de certains gènes qui possèdent un site de liaison de E2F^{276,315-317} par le recrutement de HDAC qui permet un remodelage inhibiteur de la chromatine³¹⁵⁻³¹⁷. L'altération de la structure de la chromatine maintient la répression des gènes de la phase S dans la phase G1 précoce²⁵⁰. La phosphorylation de Rb par cycline D/cdk4-6 détruit la liaison de Rb avec HDAC²⁷⁶. Ensuite, cycline E/cdk2 phosphoryle Rb et détruit la liaison Rb-E2F³¹⁸. E2F libéré de l'emprise de Rb peut lier DP1 et activer l'expression de gènes essentiels à la transition G1/S³¹⁹. La diminution de l'activité de cdk2 à la transition G1/S est contrôlée par la dégradation de la cycline E pour laquelle deux voies de protéolyse existent. Cul-3 promouvoit l'ubiquitination de la cycline E libre, puis la dirige vers la dégradation par le protéasome^{320,321}. Lorsque la cycline E est liée à cdk2, cdk2 phosphoryle la cycline E sur Ser 384. Par contre, la cycline E phosphorylée est susceptible à la dégradation, donc il existe un lien entre l'activité de cdk2 et la

dégradation de la cycline E. Ensuite, GSK-3 β phosphoryle la cycline E sur Thr 380 et d'autres kinases (non-identifiées) phosphorylent les Thr 62 et Ser 372 de la cycline E, ce qui accélère la dégradation de la cycline E³²². L'ubiquitine ligase cdc4/fbw7/ago recrute la cycline E phosphorylée³²³⁻³²⁵ et se charge de la diriger vers la voie du protéasome^{326,327}.

Le rôle principal de la cycline D est son association avec les cdk4-6 pour initier la phosphorylation de Rb, relâcher HDAC et permettre au complexe cycline E/cdk2 d'avoir accès à ses cibles, alors que le complexe cycline E/cdk2 a pour rôle la phosphorylation de Rb pour permettre la libération du facteur de transcription E2F et la transition en phase S.

b- Les cyclines de la progression des phases S et G2

La cycline A est présente en faible quantité lors de la phase G1, augmente de la phase S à G2, puis se dégrade durant la phase M^{328,329}. Cette régulation s'effectue à de multiples niveaux. L'induction de l'expression de la cycline A est due au site E2F situé sur le promoteur³³⁰. L'AMPc peut aussi stimuler sa transcription via l'élément de réponse de AMPc (CRE)³³¹. L'altération de la stabilité de l'ARNm (région 5' non-traduite) démontre une modulation post-transcriptionnelle³³². Le niveau protéique est régulé par la dégradation médiée par ubiquitination^{333,334}.

La cycline A contribue à la transition G1/S à la progression de la phase S et à la transition G2/M²⁴³. De nombreuses expériences ont démontré l'importance de la

cycline A. Par exemple, l'injection d'anticorps dirigés contre la cycline A empêche la réplication de l'ADN et un embryon déficient en cycline A n'entre pas en mitose^{335,336}. La cycline A s'associe avec cdk2 et cdk1^{329,337}. Le complexe cycline A/ckd2 serait requis pour la progression de la phase S alors que le complexe cycline A/ckd1 serait plutôt nécessaire pour la transition G2/M. Des cellules de souris ayant une mutation (sensible à la température) de cdk1 mène à un arrêt en G2, alors que dans des extraits cellulaires de *Xenopus*, cdk2 est requise pour qu'il y ait synthèse de l'ADN^{338,339}. L'activité du complexe cycline A/ckd2 se retrouve dans la phase S et G2 et ses substrats sont la protéine Rb^{305,340} et les facteurs de transcription E2F³⁴¹⁻³⁴⁴, DP³⁴⁵ et le récepteur d'œstrogène α ³⁴⁶. La phosphorylation de E2F par cycline A/ckd2 diminue la liaison à l'ADN et la phosphorylation de DP détache E2F de l'ADN et de DP. Ensuite, E2F est dirigé vers la dégradation par la liaison de p14^{ARF347,348}. L'activité du complexe cycline A/ckd1 se retrouve seulement lors de la phase G2 et a pour substrat l'histone H1³⁴⁹. Des sites de phosphorylation mutés sur Rb empêchent la progression de la phase S, donc la phosphorylation de Rb se poursuit pendant la phase S³⁵⁰. La protéine Rb inhibe l'expression de la cycline A^{330,351} et de cdk1^{301,352}, via l'inhibition de leur facteur de transcription E2F. Ainsi, cycline A et cdk1 sont sous le contrôle des cyclines, plus précisément sous le contrôle de cycline D/ckd4-6 et cycline E/ckd2 responsable de l'inactivation de Rb.

c- Les cyclines de la transition G2/M

La progression G2/M et l'entrée en phase M sont régulées par le MPF qui possède une activité kinase principalement médiée par le complexe cycline B/ckd1³⁵³⁻³⁵⁹. Le

niveau de cycline B oscille au cours du cycle cellulaire. La cycline B apparaît en phase S et augmente dans la phase G2 pour être dégradée pendant la mitose, plus précisément, à l'anaphase³⁶⁰. Une fois complexée avec une cycline, cdk1 doit être phosphorylée sur Thr 161 pour devenir active et cette phosphorylation activatrice est accomplie par CAK^{269,361}. Les molécules cdk1 sont phosphorylées sur les Thr 14-15 dans les phases G2 et S, lorsqu'elles s'associent à la molécule cycline B. Cette phosphorylation inhibe l'activité du complexe B/cdk1 et serait un mécanisme important pour prévenir l'activation prématurée du complexe cycline B/cdk1 avant l'entrée en mitose³⁶²⁻³⁶⁴. Les protéines kinases pouvant phosphoryler cdk1 sur Thr 14 et Thr 15 sont : Wee1, Mik1 et Myt1³⁶⁵⁻³⁶⁷. Thr 14-15 se retrouvent dans la poche liant l'ATP et leur phosphorylation désoriente la molécule d'ATP et, ainsi, inhibe l'activité kinase^{362,368}. L'activation du complexe cycline B/cdk1 vient de la déphosphorylation par la phosphatase à double spécificité Cdc25C capable de lier cycline B/cdk1 et de déphosphoryler les Thr 14 et Thr 15³⁶⁹⁻³⁷¹. Le complexe cycline B/cdk1, à son tour, phosphoryle Cdc25C, ce qui augmente son activité phosphatase³⁷². L'activation de la cycline B/cdk1 permet une activation rapide de Cdc25C et du complexe cycline B/cdk1. L'hyperphosphorylation de Cdc25C corrèle avec son activité phosphatase^{372,373}.

1.3.2- Système de surveillance

Lors de dommages à l'ADN, la cellule a la capacité d'arrêter la prolifération en G1, S, G2 et de repartir lorsqu'il y a réparation. La fonction « point de contrôle » implique souvent soit un délai dans l'activation, soit une inactivation d'un complexe

cycline/cdk particulier^{374,375}. La stabilité de l'ADN génomique dépend de la fidélité de la réplication de l'ADN et de la ségrégation des chromosomes. La progression en phase G1 est précisément régulée pour coordonner la division normale et la croissance cellulaire, alors que la réplication de l'ADN dans la phase S est précisément ordonnée pour prévenir des événements pouvant mener à l'instabilité génomique et au cancer.

1.3.2.1- Point de contrôle en G1

La carence de sérum est un activateur classique de l'arrêt en G0/G1 et de l'induction de l'apoptose des cellules. La régulation de la phosphorylation des cdk est une importante composante de la régulation de l'activité des complexes cyclines/cdk de la phase G1 dans le point de contrôle en G1 en réponse à des stress génotoxiques.

Plusieurs protéines (p19^{ARF}, MDMX, Rb, JNK) répondant à différents stimuli peuvent lier le complexe p53-MDM2 et empêcher le complexe de se diriger vers la voie du protéasome³⁷⁶⁻³⁸¹ (figure 6). L'arrêt du cycle cellulaire en G1, comme dans une situation d'absence de facteurs de croissance, dépend de l'action de p53. La stabilisation de p53 est un élément important dans l'arrêt en G1 tout comme dans l'apoptose. Suite à l'induction de l'arrêt en G1, p53 sert de pivot pour balancer la réponse cellulaire vers un maintien de la quiescence ou une activation de l'apoptose³⁸². p53 cible p21, mais l'accumulation³⁸² de p21 en réponse à p53 prend plusieurs heures puisque c'est une réponse transcriptionnelle¹¹⁴. p21 est de la famille WAF/KIP qui comprend aussi les membres p27 et p57^{383,384}. La protéine p21 lie

directement les complexes cycline/cdk et agit comme un inhibiteur de cdk (cki)^{385,386}. p21 peut inhiber l'activité kinase des complexes cycline E/cdk2, cycline D/cdk4-6, cycline A/cdk2 et, moins fortement, cycline B/cdk1³⁸⁶⁻³⁸⁹. Il semble que deux molécules de p21 ou plus soient nécessaires pour inhiber l'activité de cycline/cdk³⁹⁰. Par contre, en quantité stœchiométrique, p21 inhibe seulement cycline E/cdk2³⁹¹. La dégradation de la cycline D est une étape critique dans la promotion précoce de l'arrêt en G1, par exemple lors de carence en sérum. La cycline D est détruite par la voie du protéasome, ce qui entraîne la dissociation de p21 et de cdk4-6. Lorsque p21 est dissocié du complexe cycline D/cdk4/6, il se dirige sur cycline E/cdk2 pour l'inhiber³⁹²⁻³⁹⁵. Pour maintenir l'arrêt en G1, la synthèse de p21 p53-dépendante est requise lorsque des cellules sont exposées à un environnement sans facteur de croissance³⁹⁶. La surexpression de p21 entraîne un arrêt en G1³⁸⁸. Des cellules déficientes en p21 exposées à l'irradiation- γ ont un arrêt en G1 diminué, mais pas abolit ce qui implique qu'il existe d'autres mécanismes induisant l'arrêt en G1³⁹⁷.

Un autre régulateur de complexe cycline/cdk dans la transition G1/S est la famille de gènes INK4a-p16, b-p15, c-p18, d-p19³⁹¹. INK4 p16 inhibe cdk4-6 prévenant leur association avec la cycline D et, ainsi, empêche la phosphorylation de la protéine Rb³⁹⁸. La surexpression de p16 mène à l'arrêt en G1 dans les cellules Rb^{+/+}, mais pas dans les cellules Rb^{-/-}³⁹⁹. p19 interagit avec MDM2, bloque la dégradation de p53 via MDM2 et, ainsi, permet l'accumulation de p53^{400,401}.

La carence de sérum induit des changements dans les niveaux protéiques des régulateurs du cycle cellulaire impliqués dans le système de surveillance en G1. Les

cellules présentes dans un milieu sans facteurs de croissance pendant plusieurs heures ont des niveaux élevés de p53⁴⁰² et p21^{402,403} qui sont les grands inducteurs de l'arrêt en G1. On note également une diminution des niveaux protéiques de la cycline D⁴⁰⁴, la cycline E et de cdk2⁴⁰⁵ et une hypophosphorylation de la protéine Rb^{403,406}. Toutes ces conditions protéiques sont des indicateurs importants d'un arrêt du cycle cellulaire en G1.

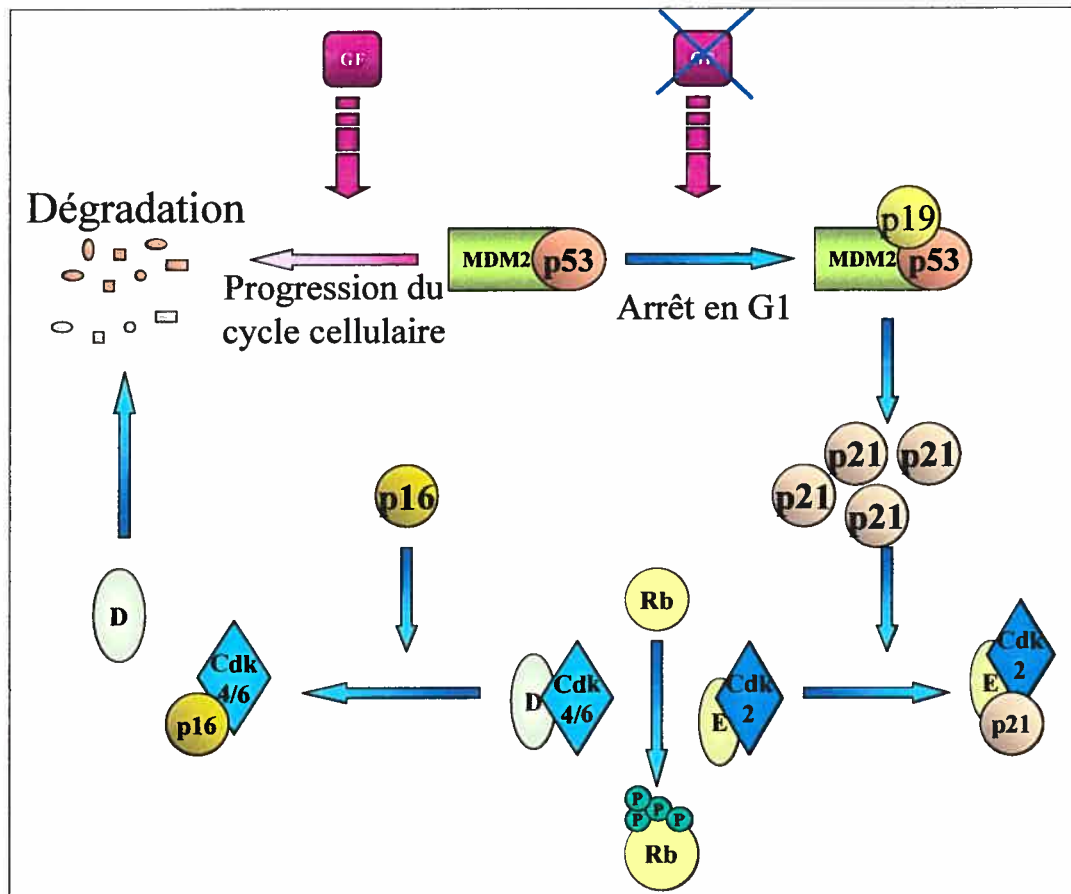


Figure 6 : Schéma simplifié de l'arrêt en G1. En présence de facteur de croissance (GF), MDM2 dirige p53 vers sa dégradation par la voie du protéasome. En absence de GF, p19 lie le complexe MDM2-p53 et permet l'accumulation de p53. p53 non-dégradé mène à l'accumulation de p21. p21 peut inhiber le complexe cycline E/cdk2. En parallèle, p16, qui est activée en absence de GF, inhibe la liaison de cdk 4/6 avec la cycline D. Lorsque la cycline D est libre, elle est dégradée par la voie du

protéasome. Ainsi, les complexes cycline D/cdk4/6 et cycline E/cdk2 sont inhibés et la protéine Rb n'est plus phosphorylée ce qui empêche la progression du cycle cellulaire, donc induit un arrêt en G1.

Les cellules requièrent des signaux prolifératifs extracellulaires pour poursuivre la progression du cycle cellulaire. La présence de facteurs de croissance peut mener à l'activation de la voie de la kinase de phosphatidyl inositol 3 (PI3K). PI3K induit l'activation de la protéine kinase B (PKB) ⁴⁰⁷ qui a la capacité de phosphoryler et d'inactiver une famille de facteur de transcription Forkhead de la classe box O (FOXO) ^{408,409}. FOXO phosphorylé perd sa capacité à lier l'ADN ⁴¹⁰. Alors, en absence de signaux de croissance, FOXO est actif. Il a été démontré que FOXO pouvait augmenter la transcription de p27 une protéine cki ⁴¹¹ et parallèlement pouvait réprimer la transcription de la cycline D ⁴¹², ce qui a pour conséquence d'arrêter la progression du cycle cellulaire.

1.3.3- Le cycle cellulaire et les désordres vasculaires

Les CML dans l'organisme mature sont sous une forme statique, donc les niveaux protéiques de cycline E, de cycline A et de cdk2 sont minimales⁸⁸. De plus, les niveaux protéiques élevés de p53¹⁹⁶ et p27^{413,414} préservent l'état statique des CML dans les vaisseaux. Par contre, p21 n'est pas exprimé dans les CML⁴¹⁴, donc ne semble pas responsable de la conservation de l'état quiescent dans l'organisme. Chez l'humain, dans les régions de lésion resténosiques, on note une expression abondante de cycline E et de cdk2 dans les CML en prolifération⁴¹⁵. De plus, suite à une angioplastie dans la carotide de rat, on note en moins de 24 heures une accumulation de cycline E et de

cycline A. Quelques heures plus tard, une augmentation de cdk2 concorde avec une induction de l'activité kinase cycline E/cdk2 et cycline A/cdk2⁸⁸. Dans l'artère carotide de rat, suite à une insulte par ballon, la prolifération des CML corrèle avec l'expression de cycline E, cycline A et de cdk2. De plus, un antisens dirigé contre cdk2 inhibe l'hyperplasie intimale dans un modèle d'angioplastie dans la carotide du rat^{416,417}. Plusieurs expériences ont démontré que le facteur de transcription E2F est un important composant de la cascade de signalisation liant l'activité de Ras à la transcription de la cycline A et à la prolifération des CML. Il est à noter que l'inhibition de Ras inhibe la formation de la néointima par les CML^{418,419}. L'induction de Ras dans les modèles d'hyperplasie active le facteur de transcription E2F qui permet l'expression entre autres des cyclines A, E et de cdk2, ce qui a pour conséquences d'activer le cycle cellulaire, donc la prolifération des CML⁴²⁰⁻⁴²⁶.

Les protéines impliquées dans le point de contrôle G1 ont aussi un rôle à jouer dans le remodelage vasculaire. Les changements initiaux menant à l'épaississement néointimal dans la paroi vasculaire seraient dus à la suppression de p53 par des mitogènes ce qui permettrait l'initiation de la migration et de la prolifération des CML¹⁹⁶. Il n'y a pas de p21 dans les CML de la carotide normale de rat, donc p21 n'est pas impliqué dans la conservation de l'état quiescent des CML. Le niveau de p21 également faible dans les CML qui entament une prolifération néointimale⁴¹⁴. Par contre, plusieurs jours après l'initiation de l'épaississement néointimal, p21 augmente dans les CML et ainsi, il y a un ralentissement de la progression intimale⁴¹⁴. Éventuellement, la néointima se résorbe lorsque l'endothélium et le vaisseau sont réparés. L'expression de p21 est inversement proportionnelle à la prolifération des

CML, suite à l'insulte au niveau de l'endothélium. La surexpression de p21 dans des artères endommagés limite le développement de l'hyperplasie intimale *in vivo*⁴²⁷⁻⁴²⁹.

1.4- PRÉMISSSE

David L. Vaux a suggéré en 1994 que la mort cellulaire programmée avait évolué, bien sûr, pour des raisons morphogénétiques et de développement, mais qu'elle s'avérait également être un important mécanisme de défense⁴³⁰. Une cellule recevant des signaux de mort peut mourir sans déclencher de réponse inflammatoire, ni endommager son environnement, mais elle se doit d'avertir le voisinage que cette cellule s'est suicidée pour une raison afin de préparer les cellules voisines à ce nouveau signal. La cellule mourant par apoptose aurait un impact sur son environnement. Par exemple, lorsqu'une cellule meurt d'apoptose suite à une infection virale, elle alerte les cellules voisines via l'interleukine-1 comme quoi cette cellule s'est détruite en réponse à une invasion virale. Les cellules exposées à l'interleukine-1 deviennent plus actives à combattre l'infection virale⁴³⁰. Les facteurs favorisant le remodelage vasculaire ont tous un effet pro-apoptotique (voir p.6) sur les CE. Il serait donc possible que l'apoptose endothéliale puisse induire des signaux d'alerte qui auraient pour conséquences l'initiation et la progression du remodelage vasculaire.

1.5- HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'équipe du Dre Hébert a tenté d'appliquer l'hypothèse de David L. Vaux au système vasculaire. Suite à un stress apoptotique des CE, on observe une augmentation de la prolifération et de la résistance à l'apoptose des CML pour produire la néointima. Nous avons donc postulé que les CE sous un stress apoptotique provoquent la libération de facteurs qui alertent le voisinage de l'insulte à l'endothélium et permettent aux cellules de l'entourage d'entamer une réparation du vaisseau. Ainsi, nous avons proposé que les CE en stress apoptotique envoient des signaux dans l'environnement via la libération de médiateurs solubles qui permettent la protection et la réparation de la paroi vasculaire. L'épaississement néointimal est une conséquence d'un dommage à l'endothélium qui permet l'infiltration vasculaire de leucocytes, de monocytes/macrophages et de lymphocytes T et à l'adhésion de plaquette^{15,16}. Ces cellules produisent plusieurs facteurs de croissance (cités plus tôt) favorisant l'épaississement néointimal^{15,17-25}. L'hypothèse que nous suggérons, n'exclut pas cette possibilité, mais nous tentons de définir des mécanismes qui joueraient un rôle additionnel dans l'épaississement néointimal.

Mon projet consistait, plus précisément à caractériser : 1- la libération des médiateurs prolifératifs par les CE sous un stress apoptotique; 2- la régulation moléculaire de la réponse proliférative des CML en présence des médiateurs relâchés par les CE en stress apoptotique; 3- l'effet des médiateurs identifiés, libérés par les CE en stress apoptotique.

2- MATÉRIELS & MÉTHODES

2.1- Culture cellulaire

Les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (CEh) et les cellules musculaires lisses d'aorte humaine (CMLh) ont été obtenues de Clonetics (San Diego, CA, USA). Les CEh sont cultivées (passages 2 à 4) sur des flasques gélatinisées (gélatine 1% de peau bovine) dans le milieu EGM (500ml Endothelial Growth Medium, 0.5ml hEGF (Facteur de croissance épidermal humain), 0.5ml hydrocortisone, 0.5ml GA-1000 (Gentamycine, Amphotérine-B), 2.0ml BBE (Extrait de cerveau bovin), 35ml FBS (sérum de bovin fœtal) (Cambrex, Walkersville, MD, USA). Les CMLh sont cultivées (passages 2 à 6) dans le milieu SmGM-2 (500ml Smooth Muscle Growth Medium, 0.5ml insuline, 1.0ml hFGF-basique (Facteur de croissance-basique de fibroblaste humain), 0.5ml GA-1000, 25ml FBS, 0.5ml hEGF) (Cambrex, Walkersville, MD, USA). Les cellules A7R5 (CMLr), une lignée cellulaire clonale de muscle lisse d'aorte thoracique d'embryon de rat (ATCC, Rockville, MD, USA) sont cultivées dans le milieu D-MEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient mixture F-12 (Ham) 1 :1, L-glutamine, 2.438g/l sodium bicarbonate, pyridoxine hydrochloride, filtré 0.1micron) enrichi avec 10% de FBS. Tous les types cellulaires prolifèrent à 37°C avec 5% de CO₂ et 95% d'humidité. Pour passer les cellules sont lavées avec du PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, pH 7.2), puis traitées avec de la trypsine (0.05% trypsine, 0.53mM EDTA .4Na dans HBSS (Hepes buffered saline solution)).

2.2- Production de milieu sans sérum conditionné (SSC)

Les CEh poussent jusqu'à confluence dans des flasques gélatinisées de 175cm². Le milieu de culture est enlevé et 25ml de milieu RPMI-1640 sans sérum sont ajoutés.

Pour faire du milieu sans sérum conditionné contrôle, le milieu sans sérum est conditionné pendant 30 secondes par des CEh, ensuite le milieu est récupéré. Le milieu SSC 30s contient les molécules libres résiduelles des CE en prolifération (la flasque n'est pas lavée au PBS avant la production du milieu conditionné) et les molécules libérées par les CEh en carence de sérum pour 30 secondes. Ce milieu est conditionné puisque contrairement au milieu sans sérum frais, il a été incubé avec des cellules endothéliales pendant 30 secondes ce qui consiste en un conditionnement. Pour le milieu sans sérum conditionné par des CEh en stress apoptotique, 25ml de milieu RPMI-1640 sans sérum sont incubés sur les cellules pendant quatre heures (SSC4h). Le SSC 4h contient les molécules libérées par les CEh en carence de sérum. Pour produire du SSC-ZVAD, les CEh sont pré-incubées pendant 2 heures leur milieu normal (EGM) dans lequel est ajouté soit 100 μ M de Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (z-VAD-fmk, inhibiteur irréversible pancaspase), soit une quantité équivalente de diméthylsulfoxyde (DMSO). Lorsque la pré-incubation est terminée, ce milieu est récupéré, puis du milieu RPMI-1640 sans sérum est conditionné pendant 4 heures par ces CEh. Le SSC-ZVAD contient les molécules libérées de façon indépendantes de l'activation des caspases par des CEh en carence de sérum, donc sous un stress apoptotique. Les milieux SSC sont aliquotés et congelés à -20°C entre chaque utilisation. La période de congélation n'a jamais excédé plus de 6 mois. Les aliquots subissent des rondes de décongélation et congélation, mais l'activité des milieux SSC n'est pas affectée avant que l'aliquot soit terminé.

2.3- Détermination de la viabilité et de la prolifération

La viabilité cellulaire est déterminée en utilisant une solution de cristal violet 0.75% (p/v) (EM Diagnostic System, Gibbstown, NJ, USA) dans l'acide acétique 30% (Anachemia, Rousses Point, NY, USA)^{431,432}. Les cellules sont déposées dans des plaques de 96 puits et exposées à 100µl de milieu composé de différentes conditions expérimentales. Lorsque la période d'incubation est terminée, 10µl de la solution de cristal violet 0.75% / acide acétique 30% est ajouté par puits pour 10 minutes. La plaque est ensuite lavée à l'eau, séchée et l'absorbance de chaque puits, qui est proportionnelle à la quantité de cellules viables, est déterminée à 550 nm avec un appareil AM OPSYS MR Dynex Technology Microplate Reader.

La mesure de l'incorporation de BrdU lors de la synthèse de l'ADN se fait sur des CMLr sous-confluentes en utilisant l'essai colorimétrique «Cell Proliferation ELISA BrdU» de Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)⁴³². Les cellules à 50% de confluence sont soumises à différentes conditions dans des plaques de 96 puits. 4 heures avant la fin de la période d'incubation, 1µl de la solution de BrdU 1000x (10mM 5-bromo-2'-deoxyuridine dans du PBS, pH 7.4) est ajouté à chacun des puits contenant 100µl de milieu. Une fois la période d'incubation terminée, la plaque est vidée et 200µl de FixDenat sont ajoutés pour 30 minutes. Les cellules fixées sont ensuite incubées avec 100µl de la solution contenant l'anticorps anti-BrdU conjugué à la peroxydase (Anticorps monoclonal provenant de cellules de souris hybrides, clone BMG 6H8, Fab fragments, dilué 1/100 avec la solution de dilution de l'anticorps) pendant 1 heure. Après trois lavages avec 200µl de tampon de lavage

dilué 1/10 (PBS), 100µl de la solution de substrat sont ajoutés par puits pour 15 minutes. La réaction est arrêtée par l'ajout de 25µl de H₂SO₄ 1M, puis la plaque est agitée pendant 1 minute à 300rpm. L'absorbance de chaque puits, qui est proportionnelle à l'incorporation de BrdU, est déterminée à 450 nm avec un appareil AM OPSYS MR Dynex Technology Microplate Reader.

2.4- Évaluation de l'apoptose par microscopie de fluorescence.

Le niveau d'apoptose est évalué par une méthode de microscopie par fluorescence de CMLr non-fixées/non-perméabilisées, colorées avec le Hoechst 33342 (2'-(4-éthoxyphényl)-5-(4-méthyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1H-benzimidazole) (Ho) et avec de l'iodure de propidium (Pi) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) tel que décrit dans les travaux précédents publiés par le laboratoire⁴³²⁻⁴³⁴. Il a été démontré que cette technique différencie avec exactitude les cellules en apoptose précoce, tardive et en nécrose primaire et est plus précise pour l'évaluation de l'apoptose que l'essai TUNEL⁴³²⁻⁴³⁴. Brièvement, les CMLr prolifèrent jusqu'à confluence dans une plaque de 24 puits. Suite à l'exposition aux différentes conditions, les cellules sont incubées avec le Ho (1ug/ml) pendant 10 minutes à 37°C. Ensuite, les cellules sont lavées au PBS, puis du PBS contenant du Pi (5ug/ml) est ajouté avant de procéder à l'analyse par microscopie de fluorescence (filtre d'excitation λ : 360-425nm). Le pourcentage de cellules normales, apoptotiques et nécrotiques adhérentes est déterminé par un évaluateur aveugle aux conditions expérimentales. Les cellules viables montrent un noyau et une morphologie cytoplasmique normale et sont colorées en bleu. Les cellules apoptotiques sont caractérisées par une condensation nucléaire et conservent

leur intégrité membranaire. La condensation de la chromatine est associée à une coloration au Ho plus intense, alors que la conservation de l'intégrité membranaire exclue la coloration au Pi. Les cellules nécrotiques sont caractérisées par une augmentation du volume cellulaire et une perte de la perméabilité membranaire, donc le Pi peut colorer ces cellules nécrotiques en rouge.

2.5- Analyse du cycle cellulaire

Les cellules sont lavées au PBS, trypsinisées et récupérées dans un tube contenant le milieu dans lequel les cellules ont été exposées. Les tubes sont centrifugés pendant 10 minutes à 1000g et resuspendues dans 1ml de PBS/EDTA 1.1%. (Ethylenediamine tetraacetic acid). Ensuite, les cellules sont fixées par l'ajout de 4ml d'éthanol 100% froid (Les alcools de commerce Inc, Brampton, ON, CA). Après le lavage du culot (PBS/EDTA 1.1%), les sont resuspendues dans 375 μ l d'une solution de sodium citrate 1.12% contenant 0.5mg/ml de Rnase A et sont incubées à 37°C pendant 30 minutes. Le Pi est ajouté à la concentration finale de 0.05mg/ml dans un volume de 500 μ l⁴³⁵. Le pourcentage de la population cellulaire dans chaque phase du cycle cellulaire est déterminé en fonction du contenu d'ADN en utilisant un cytomètre de flux FACScan équipé avec le logiciel CellFit (Beckton Dickinson).

2.6- Immunobuvardage pour p53, p21, cycline E et actine

Une fois les cellules traitées, lavées au PBS, trypsinisées, elles sont récupérées dans des tubes pour une centrifugation de 10 minutes à 1000g à 4°C. Ensuite, les cellules

sont lavées une fois au PBS, resuspendues et transférées dans un eppendorf avec le tampon de lyse RIPA (150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM Tris (Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane)-HCl, 0.1% SDS (sodium dodécyl sulfate) (PIERCE, Rockford, IL, USA), 0.1% sodium deoxycholate (Biochemical, Poole, England), 1% Igepal, pH8.0) contenant des inhibiteurs de protéases (0.04mg/ml aprotinine, 0.01mg/ml leupeptine et 0.1% phenylmethylsulfonyl fluoride) et de phosphatases (1mM sodium orthovanadate et 2µg/ml NaF)⁴³⁶. Après sonication de 30 secondes sur glace, les échantillons sont déposés sur glace pour 1 heure, centrifugés à 14 000rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le dosage des protéines du surnageant se fait par la méthode de l'acide bicinchoninic (BCA) selon le protocole fourni (PIERCE, Rockford, IL, USA). 5µL de chaque extrait protéique sont dilués dans 95µl d'eau, puis 2ml d'un mélange 50 :1 de la solution A (sodium carbonate, sodium bicarbonate, bicinchoninic acid, sodium tartrate dans 0.1M sodium hydroxyde) avec la solution B (4% cupric sulfate) sont ajoutés pour une incubation de 30 minutes à 37°C. La mesure d'absorbance, qui est proportionnelle à la quantité de protéines, de chaque échantillon se fait à 562nm sur un spectrophotomètre DU 800 BECKMAN COULTER.

Les échantillons contenant de 50 à 100µg de protéines sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE ayant un gel de concentration de 3.5% (3.5% acrylamide, 0.09% Bis N,N'-Méthylène-bis-acrylamide (Bio-Rad, Hercules, Ca, USA), 0.23M Tris-HCl pH6.8, 0.1% SDS, 0.9% ammonium persulfate, 0.2% TEMED (NNN'N'-tetraméthylethylènediamine)) et un gel de séparation de 12% (12% acrylamide,

0.32% bisacrylamide, 0.75M Tris-HCl pH8.8, 1% SDS, 0.03% ammonium persulfate, 0.06% TEMED). L'électrophorèse se fait avec l'appareil Bio-Rad Mini Protean 3 System à 40mA par gel pendant environ 2 heures 30 minutes dans le tampon d'électrophorèse (1.5% Glycine, 0.3% Tris pH8.3). Les gels sont transférés sur une membrane de nitrocellulose (Millipore, Bedford, MA, USA) avec l'appareil Bio-Rad Mini Protean 3 System dans le tampon de transfert (20% méthanol, 0.3% Tris, 1.44% glycine) à 30v pendant la nuit à 4°C. La membrane de nitrocellulose est bloquée avec une solution de TBS (20mM Tris pH7.5, 0.5M NaCl) contenant 5% (p/v) de lait (Nestlé, North York, ON, CA) pendant 1 heure à la température ambiante. Ensuite, les membranes sont incubées pour une période de 16h à 4°C avec une solution TBS/lait1%/1:1000 thimerosal contenant l'anticorps monoclonal approprié (1 :2500 anti-p53 de souris (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Ca, USA), 1.5µg/ml anti-p21 de souris (BD Biosciences Pharmingen, Mississauga, ON, CA), 1,0 µg/ml anti-cycline E de lapin (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), 5µg/ml anti-actine de souris (Cederlane, Hornby, ON, CA). Les membranes sont lavées 3 fois 5 minutes suivi d'une heure avec du TBS contenant 0.05% de Tween 20. Ensuite, les membranes sont exposées à l'anticorps secondaire dilué 1 :2000 dans une solution TBS/lait 1%, soit l'anti-Ig souris de chèvre, soit l'anti-Ig lapin de chèvre tous deux étant conjugués à la HRP (horseradish peroxydase) (Biosource, Camarillo, CA, USA). Les membranes sont lavées 3 fois 5 minutes suivi d'une heure avec du TBS contenant 0.05% de Tween 20. Finalement, les protéines reconnues par les anticorps sont révélées à l'aide du kit Lumi-Light^{PLUS} Western blotting substrate (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), suite à l'exposition des membranes à un film

Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England). L'intensité relative de chaque bande correspondant à la protéine à l'étude est obtenue avec le alpha-Imager 2000 Documentation & Analysis System.

2.7- Caractérisation des facteurs libérés par les CE en carence de sérum

750 mL de milieu sans sérum conditionné pendant 4 heures par des cellules endothéliales en stress apoptotique a été concentré par une ultrafiltration sur 2 membranes Amicon ayant une limite de 1kDa et 10kDa. La fraction bioactive a été dialysée et mise sur une colonne FPLC à échange d'anions MonoQ et éluée avec un gradient 0-0.5M de NaCl dans un tampon 5mM Phosphate de Sodium, pH7.5. 46 fractions de 2ml ont été récupérées. Un aliquot de chaque fraction a été dilué 1 :10 dans du RPMI-1640 et exposé en culture aux CMLr avec les contrôles appropriés correspondant à une fraction du milieu conditionné obtenue à chacune des étapes du processus de séparation. L'activité biologique sur les CMLr a été d'abord quantifiée en cristal violet, puis en BrdU. Les fractions ont été analysées par SDS-PAGE en utilisant un gel de concentration de 3.5% et de séparation de 12% et coloré par une méthode de coloration à l'argent compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse. Le gel est fixé pendant 30 minutes dans une solution 50%méthanol/10% acide acétique suivi d'une incubation dans une solution 50%méthanol pour 15 minutes. Ensuite, le gel est lavé 3 fois pendant 5 minutes avec de l'eau, puis sensibilisé dans une solution 0.2g/l de sodium thiosulfate pendant 1minute. Le gel est lavé 2 fois à l'eau pendant 1 minute, ensuite le gel est coloré avec une solution 2g/l de nitrate d'argent (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA). Le gel coloré est lavé 2 fois à l'eau

pendant 1 minute, puis développé avec 2 à 3 incubations de 3 à 5 minutes dans une solution de sodium carbonate anhydre 30g/l et la réaction est arrêtée avec une solution 5% d'acide acétique pendant 10 minutes. Finalement, le gel est lavé 2 fois à l'eau pendant 1 minute. Les bandes de protéines retrouvées dans les fractions bioactives sont excisées, digérées par la trypsine et soumises à l'analyse par spectromètre de masse (MS) utilisant un LC-MS-MS sur un instrument quadrupole/time-of-flight (micromass Q-TOF II). L'identification des protéines a été possible grâce à la base de données NCBI Mascot (Matrix Science, London, UK).

2.8- Réactifs

La solution de gélatine 1%, le Hoeschst 33342, le EDTA, l'Igepal, l'aprotinine, le NaF, le Thimerosal, le phosphate de sodium et le DMSO proviennent de Sigma (Oakville, ON, CA). Les milieux de culture D-MEM F-12 et RPMI-1640, le sérum de bovin foetal, les solutions de PBS pH7.2 10X, Trypsine-EDTA, et la glycine proviennent de Gibco (Grand Island, NY, USA). La Rnase A et l'acrylamide sont commandés chez Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA). Le H₂SO₄, le NaCl, le Tween 20, le sodium thiosulfate, le sodium carbonate anhydre proviennent de Fisher (Nepean, ON, CA). Le sodium citrate et le méthanol de LAB MAT (Montréal, Qc, CA), tandis que le Tris et Tris-HCl de ACP (Montréal, Qc, CA). La leupeptine, le sodium orthovanadate et le phenylmethylsulfonyl fluoride proviennent de Calbiochem (San Diego, CA, USA). L'ammonium persulfate et le TEMED proviennent de LKB-Produkt AB, Bromma Suède).

2.9- Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- l'écart-type divisé par la racine carré du nombre de données. Les données sont analysées en utilisant le test T de Student. Lors de multiples comparaisons, les données sont corrigées par la méthode de Bonferroni. Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme une différence statistiquement significative entre un groupe de moyennes.

3- RÉSULTATS

Avant-propos

Avant d'entreprendre la présentation des résultats, je vais résumer la contribution des membres du laboratoire à l'obtention de ces résultats. Les expériences en microscopie de fluorescence pour déterminer les niveaux d'apoptose selon différentes conditions ont été effectuées par Marc-André Raymond et j'ai collaboré à chacune d'entre-elles (Figure : 7A, 8 et 14B). J'ai déterminé les niveaux de prolifération par l'incorporation de BrdU (Figure : 7B, 9, 13, 14A, 15 et 16) et fait l'étude par cytométrie de flux (Figure : 10). J'ai fait les expériences d'immunobuvardage de p21, actine et cycline E dans les CMLr et CMLh (Figure : 11, 12B), alors que Marc-André Raymond a fait p53 et actine dans les CMLh (Figure : 12A). Le fractionnement du milieu SSC4h (Figure : 14A et 15A), le SDS-PAGE des fractions et l'analyse au spectromètre de masse ont été faits en collaboration avec le laboratoire du Dr Pshezhetsky. Normand Vigneault a fait l'analyse par cristal violet de l'activité protectrice des différentes fractions du SSC (Figure 14A). Dans tous les cas, la production des différents milieux SSC a été effectuée par Marc-André Raymond.

3.1- LA LIBÉRATION DE MÉDIATEURS PAR LES CE SOUMISES À UN STRESS APOPTOTIQUE

3.1.1- Effet anti-apoptotique sur les CML

Des résultats obtenus par le laboratoire suggèrent que l'induction d'un stress apoptotique sur des CE a un effet sur l'homéostasie des cellules voisines. Ces résultats montrent que les CE libèrent des médiateurs à la suite d'un stress apoptotique. Ces médiateurs ont pour effet l'augmentation de la prolifération et le développement de la résistance à l'apoptose des CE⁴³². L'exposition des CE à un stress apoptotique provoque l'activation d'une voie autocrine ayant un effet sur l'homéostasie des CE voisines. Selon l'hypothèse mentionnée, les médiateurs libérés par les CE auraient un effet sur les autres cellules de la paroi vasculaire, dont les CML. Pour vérifier cette hypothèse, des cellules endothéliales de veines ombilicales d'humain (CEh) ont été soumises à un stress apoptotique pendant 4 heures. Ensuite, ce milieu sans sérum conditionné (SSC4h) est récupéré. D'après les résultats précédents, le milieu SSC4h contient les molécules libérées par les CEh en réponse au stress apoptotique^{432,437}. Dans le présent projet, il s'agissait de déterminer si le SSC4h avait la capacité de mimer les conditions qui induisent la formation de la néointima, soit le développement de la résistance à l'apoptose et/ou une augmentation de la prolifération des CML. Pour ce faire, des CML d'aorte de rat (CMLr) sont exposées au SSC4h, pendant 8 à 24h et sont comparées à des CMLr dans un milieu sans sérum (SS) frais. Dans la figure 7A, les CMLr exposées à du milieu SS frais ont un pourcentage d'apoptose nettement supérieur aux cellules dans leur milieu normal (N). L'exposition des CMLr à du milieu SSC4h induit une résistance à l'apoptose, donc une diminution du pourcentage de mort cellulaire programmée, par rapport aux

cellules en présence du milieu SS frais. Les CEh ont libéré dans le milieu SSC4h des molécules capables d'induire une protection contre l'apoptose aux CMLr soumises à la carence de sérum.

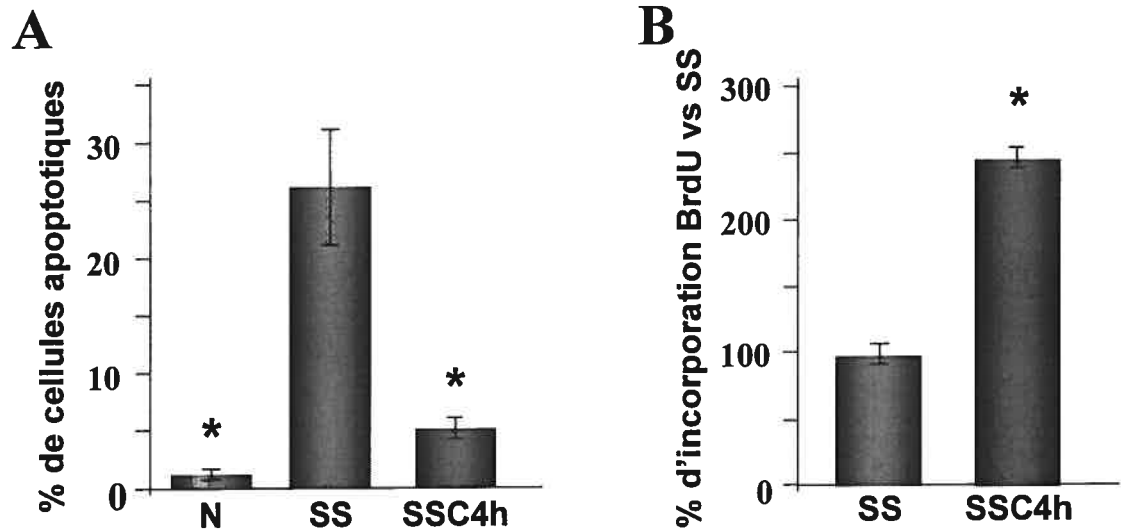


Figure 7: **A:** L'activité anti-apoptotique du milieu SSC4h. Les CMLr sont exposées pendant 24 heures à du milieu normal (N), du milieu sans sérum (SS) ou du milieu sans sérum conditionné pendant 4 heures par des CEh en carence de sérum (SSC4h). Le pourcentage de cellules apoptotiques est évalué par microscopie avec une coloration avec le Hoeschst 33342 et l'iodure de propidium. * $p < 0.01$ vs SS, $n \geq 4$. **B:** Détermination de l'activité pro-proliférative du milieu SSC4h. Le niveau de prolifération des cellules est évalué par l'incorporation de BrdU dans les CMLr exposées aux milieux SS ou SSC4h pour une période de 24 heures. * $p < vs SS$, $n = 8$.

3.1.2- Effet pro-prolifératif sur les CML

Pour déterminer si le SSC4h a aussi un effet sur la prolifération des CML, une expérience d'incorporation du BrdU a permis d'évaluer le niveau de prolifération des

cellules dans différentes conditions (Figure 7B). Les CMLr en présence de milieu SSC4h ont un niveau de prolifération supérieur au CMLr dans le milieu SS.

3.1.3- La libération caspase-dépendante des médiateurs anti-apoptotiques par les CE en carence de sérum

Pour déterminer l'état métabolique (CE vivantes ou CE en stress apoptotique) nécessaire aux CE pour relâcher les médiateurs, différentes expériences ont été effectuées. Afin de vérifier si l'activation des caspases était nécessaire aux CE pour permettre la libération des médiateurs, un inhibiteur pan-caspase, z-VAD-fmk, a été utilisé. Les CEh ont été préincubées, pendant 2 heures, dans le milieu N contenant 100 μ M de z-VAD-fmk ou son véhicule, le DMSO. Le milieu de pré-incubation a été retiré, puis du milieu sans sérum a été conditionné pendant 4 heures par ces CEh dont l'activité des caspases est inhibée. L'activité anti-apoptotique de ces milieux conditionnés (SSC+ZVAD, SSC+DMSO) a été vérifiée sur les CMLr (Figure 8). Les CMLr exposées au milieu SSC+ZVAD n'ont pas de résistance à l'apoptose tout comme les cellules exposées au milieu SS. La pré-incubation des CEh avec le DMSO n'a pas eu d'effet significatif sur l'effet anti-apoptotique du milieu SSC4h sur les CMLr. L'inhibition de l'activité des caspases dans les CEh empêche la libération de médiateurs anti-apoptotiques actifs sur les CMLr. L'activation des caspases est nécessaire à la relâche de médiateurs anti-apoptotiques par les CEh en carence de sérum.

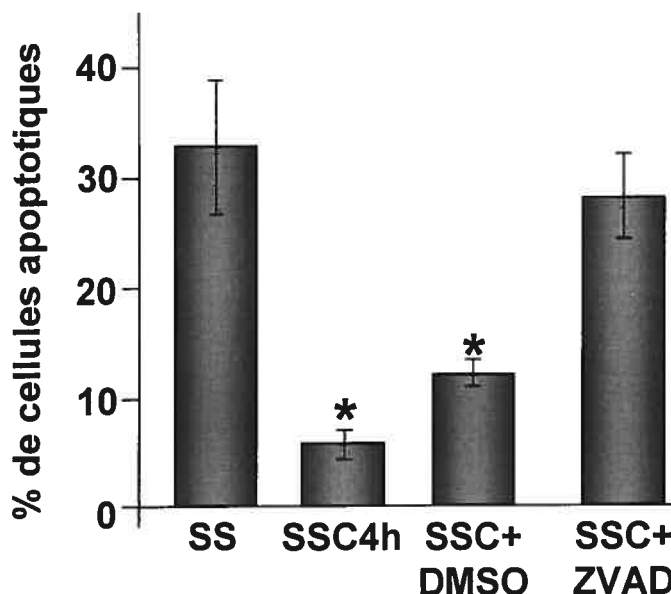


Figure 8: Effet de l'activation des caspases sur la libération des facteurs anti-apoptotiques par les CEh en carence de sérum. Les CMLr sont exposées pendant 24 heures à du milieu SS, SSC4h, SSC+ZVAD (des CEh sont pré-incubées dans du milieu normal contenant 100 μ M de z-VAD-fmk pendant 2 heures, puis du SSC4h est produit sur ces cellules dont les caspases sont inhibées) ou du SSC+DMSO (même principe que le SSC+ZVAD, mais pré-incubation de 2 heures des CEh avec le véhicule du z-VAD-fmk, soit le DMSO). Le pourcentage de cellules apoptotiques est évalué en microscopie avec une coloration avec le Hoeschst 33342 et l'iodure de propidium. * $p < 0.01$ vs SS, $n \geq 4$.

3.1.4- La libération caspases-indépendante des médiateurs pro-prolifératifs par les CE en carence de sérum

Pour vérifier si l'activation des caspases dans les CEh soumises à un stress apoptotique est nécessaire à la libération de médiateurs pro-prolifératifs, les mêmes conditions que précédemment, soit les milieux SS, SSC4h, SSC+ZVAD et SSC+DMSO, ont été utilisées. Les niveaux de prolifération des CMLr sont comparés par l'incorporation de BrdU (Figure 9). Les niveaux de prolifération des CMLr en

présence de milieux SSC4h, SSC+ZVAD ou SSC+DMSO sont comparables et tous significativement supérieurs au niveau de prolifération des CMLr en carence de sérum. Donc, la libération, par les CEh en carence de sérum, de médiateurs pro-prolifératifs est indépendante de l'activation des caspases.

3.1.5- Le stress apoptotique induit aux CE est requis à la libération des médiateurs pro-prolifératifs

Pour vérifier si le stress apoptotique était requis pour la libération des médiateurs par les CEh, un milieu sans sérum conditionné pendant 30 secondes par des CEh (SSC30s) a été produit. L'avantage du SSC30s est qu'il a subi le même traitement que le SSC4h, il consiste en du milieu sans sérum mis en présence de CEh. Ainsi, le SSC30s contient des résidus de CE en prolifération se retrouvant dans la flasque et/ou des résidus relâchés par les CE en présence du milieu SS pendant 30 secondes, alors que le SSC4h contient, en plus, des molécules libérées par des CE soumises à la carence en sérum pendant 4 heures. Dans la figure 9, les CMLr exposées au milieu SSC4h ont une prolifération significativement plus grande que les CMLr dans le milieu SSC30s. Il est à noter que les CMLr dans le milieu SSC30s prolifèrent significativement plus que les CMLr dans du milieu SS. Le SSC30s contient des molécules qui se retrouvent dans la flasque et/ou des molécules libérées par les CE permettant une augmentation de la prolifération des CMLr en présence de milieu SSC30s par rapport aux CMLr dans le milieu SS. Néanmoins, il est important de souligner que le milieu SSC4h contient des médiateurs supplémentaires libérés par les CE sous un stress apoptotique et ces médiateurs apportent un effet prolifératif

supplémentaire au milieu SSC4h par rapport au milieu SSC30s. Les CE requièrent un stress apoptotique pour libérer des médiateurs pro-prolifératifs supplémentaires. De plus, cette libération des médiateurs pro-prolifératifs par les CE en carence de sérum est indépendante de l'activation des caspases, ce qui implique que la libération des médiateurs pro-prolifératifs est un processus déclenché en amont de l'activation des caspases ou bien par un processus de mort cellulaire programmée indépendante des caspases.

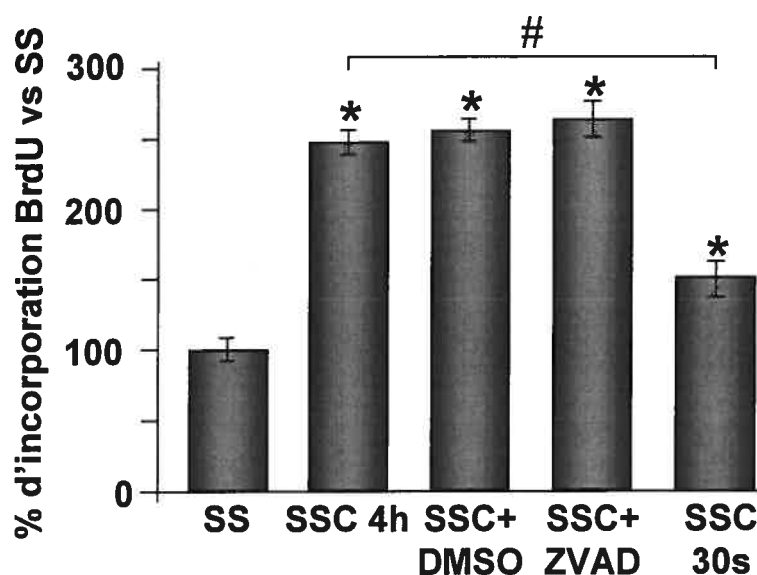


Figure 9: Effet de l'activation des caspases sur la libération des facteurs pro-prolifératifs par les CEh en carence de sérum. Les CMLr sont exposées pendant 24 heures à du milieu SS, SSC4h, SSC+ZVAD (des CEh sont pré-incubées dans du milieu normal contenant 100 μ M de z-VAD-fmk pendant 2 heures, puis le SSC4h est produit sur ces cellules dont les caspases sont inhibées), du SSC+DMSO (même principe que le SSC+ZVAD, mais les CEh sont pré-incubées avec le véhicule du z-VAD-fmk, soit le DMSO) ou du milieu sans sérum conditionné pendant 30s par des CEh (SSC30s). Le niveau de prolifération est évalué selon le pourcentage d'incorporation de BrdU par les CMLr dans les différentes conditions. *p < 0.01 vs SS, #p < 0.01 vs SSC 30s, n \geq 8.

3.2- LA RÉGULATION MOLÉCULAIRE DE LA RÉPONSE PROLIFÉRATIVE

3.2.1- Le milieu SSC4h contre l'arrêt en G1 des CML en carence de sérum

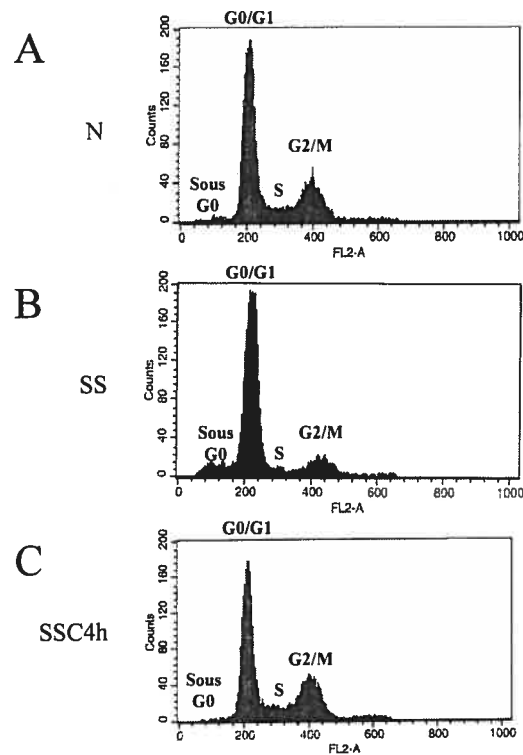
Il est bien connu que la carence de sérum induit un arrêt en phase G1 des cellules^{438,439}. Suite à l'exposition des CMLr au milieu N, SS ou SSC4h pendant 16 heures, les cellules sont perméabilisées pour permettre la coloration de l'ADN à l'iodure de propidium. Ensuite, par cytométrie de flux, les cellules sont cataloguées selon leur quantité d'ADN. Dans la figure 10, le graphique A montre le patron du cycle cellulaire représentatif d'une population de CMLr dans un milieu N. Lorsque les CMLr dans un milieu SS sont comparées aux CMLr dans un milieu N, une augmentation de la fraction de population de la phase sous G0 est observée. La phase sous G0 correspond aux corps apoptotiques. Aussi, la proportion des CMLr dans la phase G1 augmente dans la population en carence de sérum par rapport à la population de CMLr en milieu normal. Ces résultats démontrent un arrêt des cellules en G1 lorsque les CMLr sont exposées au milieu SS. Les niveaux de CMLr dans les phases S et G2/M ont diminués, donc moins de cellules ont la capacité de passer la barrière en G1 pour poursuivre leur cycle cellulaire. L'arrêt en G1 est significatif à 16 heures, donc avant l'atteinte d'un niveau d'apoptose significatif qui est à 24 heures. En temps normal, *in vivo*, les CML se retrouvent sous une forme statique dans la phase G0/G1, comme lorsqu'il y a une carence de sérum. Pour pouvoir proliférer dans la néointima, les CML doivent être capable de surpasser l'arrêt en G1 avec l'aide des signaux de l'environnement. Les CMLr exposées au milieu SSC4h retrouvent un patron de cycle cellulaire similaire aux CMLr en milieu N. Il n'y pas d'accumulation de cellules dans la phase G1 des CMLr exposées au milieu SSC4h par rapport au milieu SS. Les proportions de la population cellulaire dans les phases S

et G2/M des CMLr en présence de SSC4h sont similaires à celles retrouvées dans une population de cellules exposées à du milieu N. Le milieu sans sérum induit un arrêt en G1 dans les CMLr, alors que les médiateurs contenus dans le milieu SSC4h permettent de contrer cet arrêt en G1. Selon ces résultats, le SSC4h contient des médiateurs qui permettent aux CMLr d'outrepasser un arrêt en G1.

3.2.2- Certains acteurs de l'arrêt en G1.

Selon la littérature, l'arrêt en G1 induit par la carence de sérum a lieu en réponse à une augmentation de p53⁴⁰² et p21^{402,403} et une diminution de cycline E⁴⁰⁵ (d'autres facteurs sont impliqués, mais ne seront pas abordés). Par des expériences d'immunobuvardage, les niveaux protéiques de facteurs impliqués dans l'arrêt en G1 qui pourraient répondre aux médiateurs du milieu SSC4h pour permettre de contrer l'arrêt en G1 ont été vérifiés.

Dans la figure 11A, il y a une accumulation de p21 dans les CMLr exposées pendant 8 heures à la carence de sérum par rapport aux CMLr dans un milieu N. Par contre, les CMLr dans le milieu SSC4h ont un niveau de p21 significativement plus bas que dans les CMLr exposées au milieu SS.



D

	Sous G0	G0/G1	S	G2/M
N	2,39*	58,64*	13,72*	21,72*
SS	8,55	73,25	5,58	10,24
SSC4h	2,92*	61,83*	11,90*	20,09*

Figure 10: Patron du cycle cellulaire. Selon la quantité d'ADN, la phase du cycle cellulaire, dans laquelle une cellule se retrouve, est déterminée par cytométrie de flux avec l'incorporation d'iodure de propidium. Les cellules dans la phase sous G0 ont un contenu d'ADN $n < 1$ qui correspond à des corps apoptotiques. Les cellules de la phase G0/G1 ont un contenu d'ADN $n = 1$, alors que les cellules de la phase S entame le processus de synthèse d'ADN et leur contenu est $1 < n < 2$. Les cellules de la phase G2/M ont doublé leur contenu d'ADN ($n = 2$) et s'appêtent à se diviser en deux cellules filles. Les CMLr sont incubées pendant 24 heures dans les milieux N (A), SS (B) ou SSC4h (C). Les cellules sont perméabilisées pour permettre la coloration de l'ADN à l'iodure de propidium, puis les CMLr sont évaluées par cytométrie de flux.

Une autre protéine impliquée dans l'arrêt en G1, la cycline E, qui lorsqu'à de bas niveaux ne permet pas à la cellule de faire la transition de la phase G1/S (Figure 11B). Dans les CMLr exposées au milieu SS, pendant 30 minutes, le niveau de cycline E est bas ce qui démontre une réponse rapide et probablement indépendante de la transcription. Le niveau de cycline E dans les CMLr exposées au milieu SSC4h montre que la cycline E s'accumule en comparaison au niveau de cycline E dans les CMLr exposées au milieu SS.

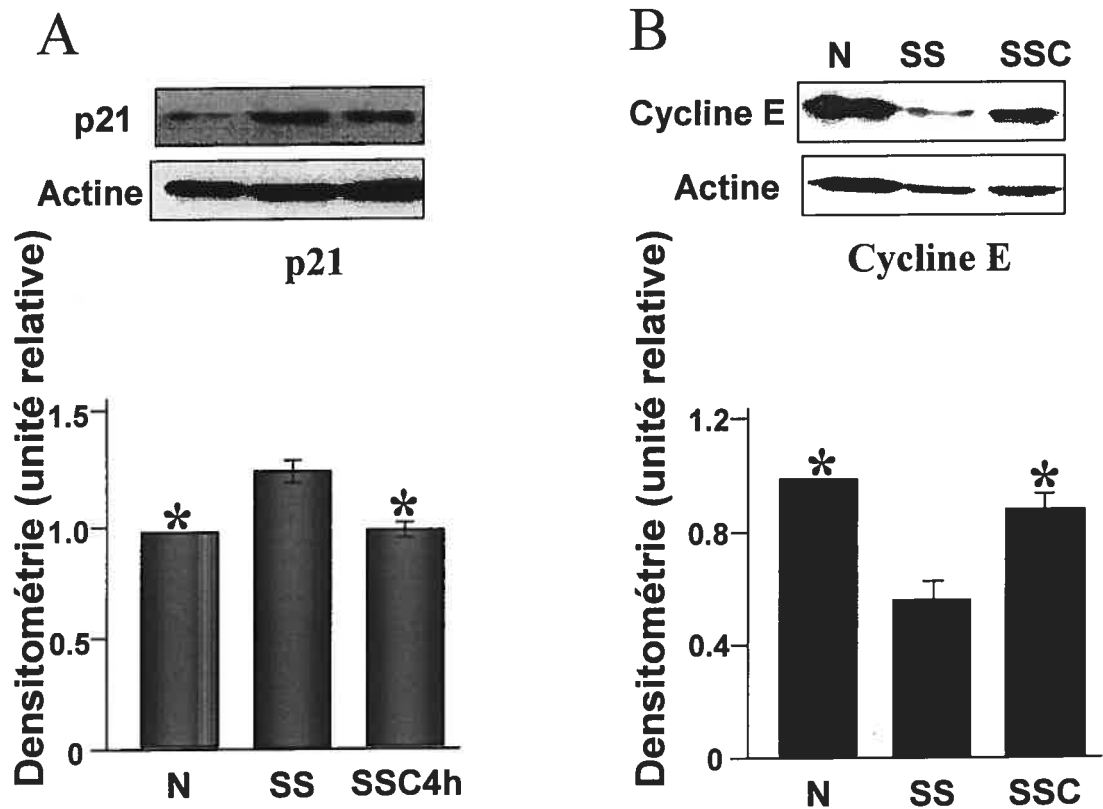


Figure 11: Niveaux protéiques, déterminés par immunobuvardage, de p21 et cycline E dans les CMLr exposées pendant 30 minutes ou 8 heures à du milieu normal (N), sans sérum (SS) ou sans sérum conditionné pendant 4 heures par des CE en carence de sérum (SSC4h). Les valeurs obtenues par densitométrie sont normalisées selon la valeur de l'actine de chaque condition (N cycline E/ N actine), ensuite les données de chaque membrane sont normalisées selon la valeur obtenue dans le milieu N qui équivaut à 1 $\{(SS \text{ cycline E} / SS \text{ actine}) / (N \text{ cycline E} / N \text{ actine})\}$. A: Photo d'une membrane incubée

avec l'anticorps anti-p21 et anti-actine qui est représentative des résultats obtenus dans le graphique suivant la photo. Le niveau protéique de p21 diminue dans les CMLr exposées au milieu SSC4h pendant 8 heures par rapport aux cellules exposées au milieu N. * $p < 0.05$ vs SS, $n=5$. **B:** Photo d'une membrane incubée avec l'anticorps anti-cycline E et anti-actine qui est représentative des résultats obtenus dans le graphique suivant la photo. Une augmentation du niveau de protéine de cycline E dans les CMLr exposées au SSC4h pendant 30 minutes en comparaison aux cellules exposées au SS. * $p < 0.05$ vs SS $n=5$.

Puisque les CMLr sont une lignée cellulaire immortalisée, elles sont plus facile à manipuler et à long terme sont moins dispendieuses. Par contre, ces cellules transformées ont de bas niveaux de p53 et cette protéine devient indétectable par immunobuvardage. Dans le laboratoire, il s'est avéré nécessaire de tester le système sur des cellules primaires, les CML d'aorte humaine (CMLh), alors ces cellules ont été utilisées pour déterminer les niveaux de p53 par immunobuvardage.

Dans la figure 12A, une accumulation de p53 est observée dans les CMLh dans un milieu SS par rapport aux CMLh exposées au milieu N. Les CMLh doivent être exposées pendant 48 heures aux différentes conditions pour obtenir une réponse significative, alors il est impossible d'étudier la chronologie des événements en comparant les deux types cellulaires. Dans les CMLh exposées au milieu SSC4h, il y a une diminution de p53 par rapport au niveau de p53 dans les CMLh exposées au milieu SS.

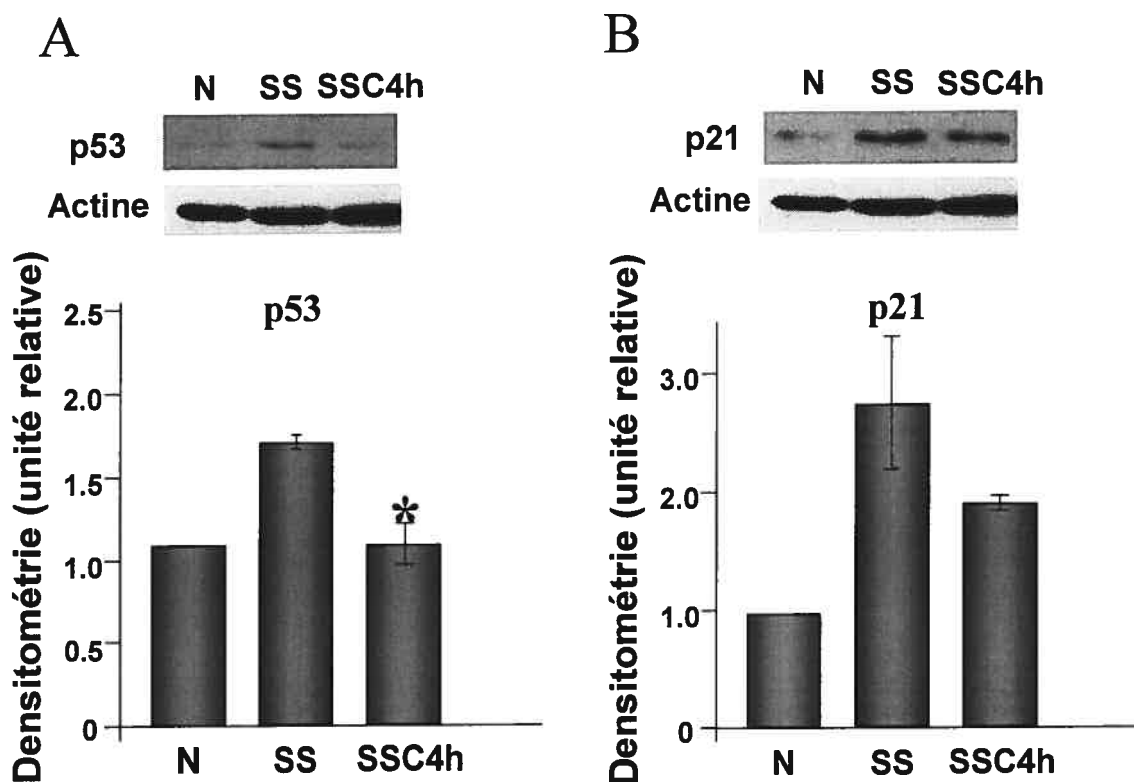


Figure 12: Niveaux protéiques, déterminés par immunobuvardage, de p53 et p21 dans les CMLh exposées pendant 48 heures à du milieu normal (N), sans sérum (SS) ou sans sérum conditionné pendant 4 heures par des CE en carence de sérum (SSC4h). Les valeurs obtenues par densitométrie sont normalisées selon la valeur de l'actine de chaque condition (N cycline E/ N actine), ensuite les données de chaque membrane sont normalisées selon la valeur obtenue dans le milieu N qui équivaut à 1 $\{ (SS \text{ cycline E} / SS \text{ actine}) / (N \text{ cycline E} / N \text{ actine}) \}$. **A:** Photo d'une membrane incubée avec l'anticorps anti-p53 et anti-actine qui est représentative des résultats obtenus dans le graphique suivant la photo. Une diminution du niveau de protéine de p53 dans les CMLh exposée au SSC4h pendant 48 heures en comparaison aux cellules exposées au SS. * $p < 0.05$ vs SS, $n = 3$. **B:** Photo d'une membrane incubée avec l'anticorps anti-p21 et anti-actine qui est représentative des résultats obtenus dans le graphique suivant la photo. Une diminution du niveau de protéine de p21 dans les CMLh exposée au SSC4h pendant 48 heures en comparaison aux cellules exposées au SS. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

Les niveaux de p21 augmentent dans les CMLh en carence de sérum par rapport aux CMLh dans un milieu N. Dans les CMLh exposées au milieu SSC4h, le niveau protéique de p21 a tendance à diminuer dans les CMLh soumises à la carence de sérum (figure 12B), mais des expériences supplémentaires sont requises pour obtenir une confirmation. Les niveaux protéiques de p53 et de p21 sont bas dans les CMLh exposées au milieu N. Pour que les cellules prolifèrent, les niveaux de p53 et p21 doivent être bas, la quantité de p53 et de p21 est inversement proportionnelle à la prolifération. Les CML exposées au milieu SSC4h sont capable de contrer l'arrêt en G1, entre autre par une diminution de leur niveau protéique de p53, p21 et une augmentation de cycline E ce qui permet aux cellules de poursuivre leur progression dans le cycle cellulaire. Tout comme lors de l'épaississement néointimal où les niveaux de p53 et de p21 sont bas, alors que le niveau de cycline E est augmenté.

3.2.3- La prolifération des CML induite par SSC4h est PKC- et ERK 1/2-dépendante

Le laboratoire a déjà démontré que l'activation de ERK 1/2 était requise pour le développement de la résistance à l'apoptose des CML exposées au milieu SSC4h. Également, les travaux démontrent que la phosphorylation de ERK 1/2 qui permet leur activation est rapide et soutenue⁴³⁷.

La ou les voies de signalisation activée(s) par les molécules pro-prolifératives relâchées par les CEh soumises à un stress apoptotique restaient à être déterminée(s). L'activité du milieu SSC4h est testée en présence ou en absence d'inhibiteur de voies de signalisation au niveau de l'effet prolifératif par l'incorporation de BrdU (Figure

13). L'ajout de DMSO, le véhicule des inhibiteurs n'a pas d'effet sur la prolifération des CMLr en présence de SS. Les inhibiteurs de PKC (Calphostin C) et de ERK 1/2 (PD98059) n'ont pas d'effet sur les CMLr dans le milieu SS. L'ajout de DMSO dans le SSC4h n'apporte pas d'effet aux cellules. Par contre, l'ajout de Calphostin C ou de PD98059, bloque l'activité de prolifération transmise par les médiateurs contenus dans le SSC4h. Ces résultats suggèrent que l'effet prolifératif du SSC4h sur les CMLr est PKC- et/ou ERK1/2-dépendant.

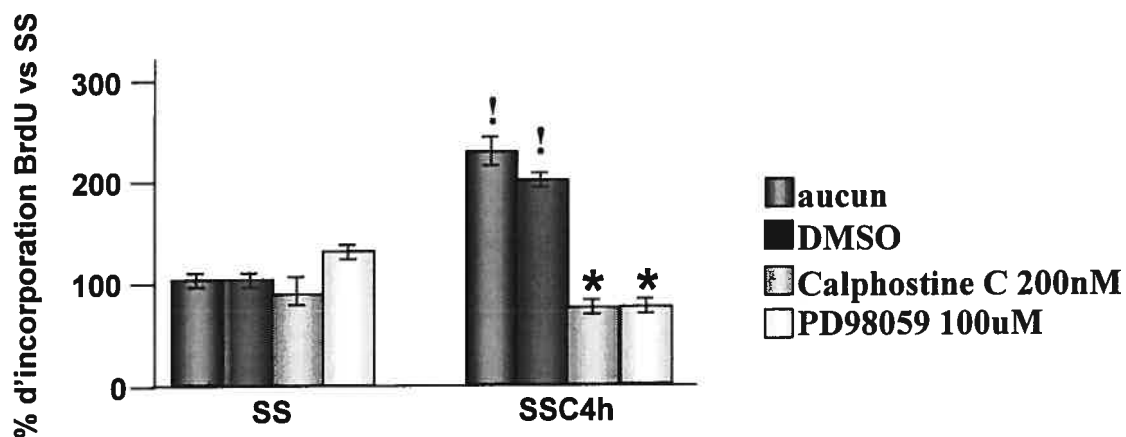


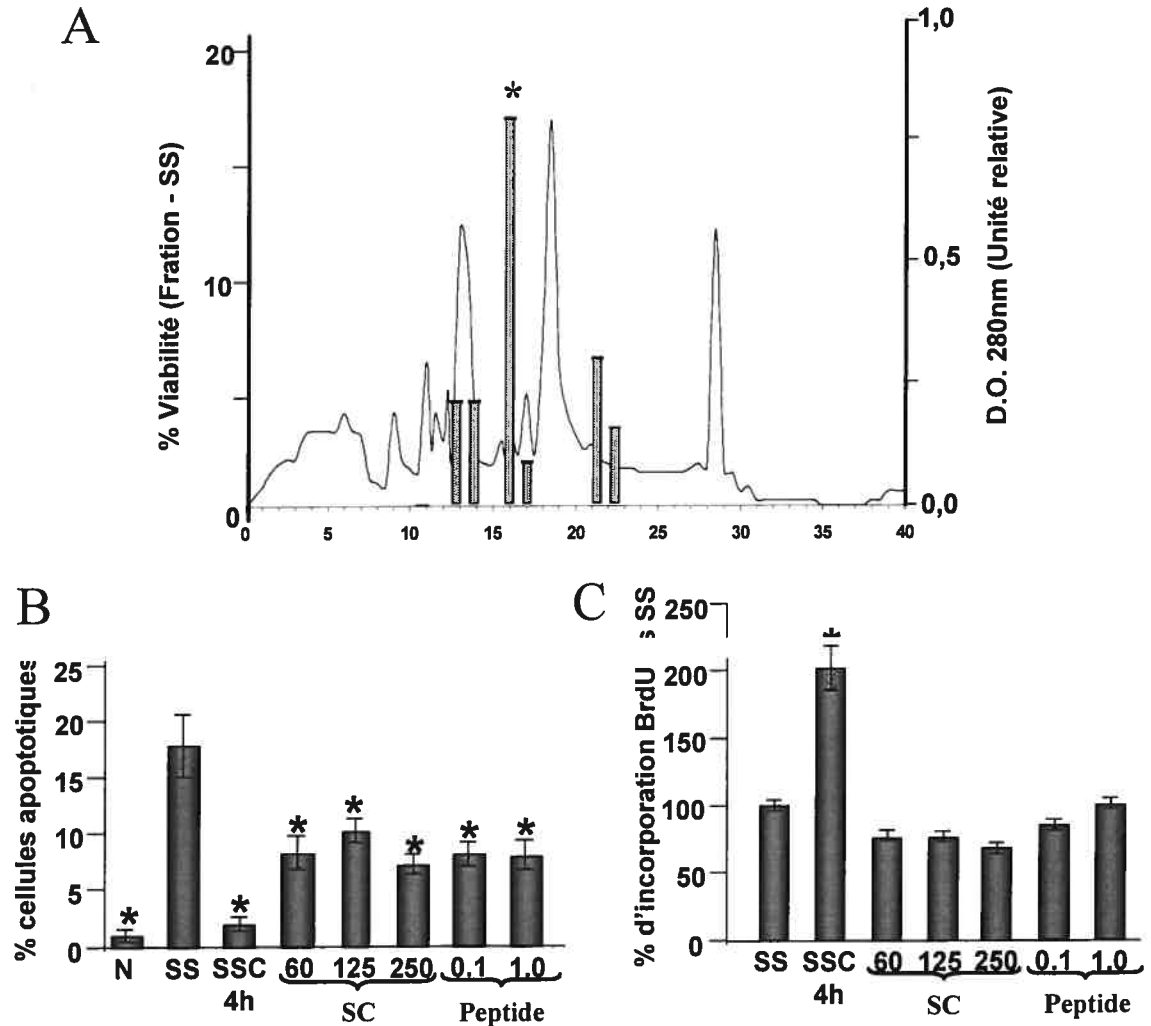
Figure 13: Détermination de la voie de signalisation pro-proliférative. Pourcentage d'incorporation de BrdU dans les CMLr en présence, pendant 24 heures, de milieu sans sérum (SS) ou sans sérum conditionné par des CEh soumises à la carence en sérum (SSC4h) avec ou sans inhibiteurs de différentes voies signalitiques. Le niveau de prolifération est déterminé selon le pourcentage d'incorporation de BrdU par les CMLr dans les différentes conditions. * $p < 0.05$ vs SSC aucun, ! $p < 0.05$ vs SS aucun, $n=8$.

3.3- LA CARACTÉRISATION DES MÉDIATEURS LIBÉRÉS PAR LES CE SOUMISES À LA CARENCE DE SÉRUM

3.3.1- Identification d'un médiateur anti-apoptotique

Pour tenter de caractériser les médiateurs libérés dans le SSC4h par les CE sous un stress apoptotique, 750ml de SSC4h ont été concentrés et fractionnés par une ultrafiltration. La fraction concentrée, bioactive est, une fois de plus, fractionnée par une chromatographie liquide de fast-protein (FPLC), plus précisément par une chromatographie échangeuse d'anions forts. Pour chacune des fractions, la quantité de protéines est évaluée par l'absorbance de lumière à une longueur d'onde de 280nm, puis l'activité de ces fractions est évaluée sur la viabilité des CMLr par l'incorporation de cristal violet (Figure 14A). Plus il y a d'incorporation de cristal violet plus il y a de cellules vivantes. Une seule fraction a montré de l'activité sur la viabilité des CMLr et cette fraction (#16) a été comparée aux autres fractions selon son patron de migration sur un SDS-PAGE coloré au nitrate d'argent⁴³⁷. Une bande (~23kDa) retrouvée exclusivement dans cette fraction a été excisée et analysée par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). L'analyse a permis d'identifier un fragment du domaine V du perlecan. Le perlecan est un protéoglycan composé de 5 domaines sécrétés par, entre autres, les CE. Le fragment séquencé par MS/MS retrouvé dans le milieu SSC est une portion en C-terminal du domaine V du perlecan. Ce domaine contient quatre motifs EGF et un site d'ancrage pour le sulfate de chondroïtine. Plus précisément, le fragment de 23kDa analysé contient un motif EGF et le site d'ancrage pour le sulfate de chondroïtine. L'ajout du perlecan dans le milieu SS n'induit pas une résistance à l'apoptose. Le fait que dans la fraction bioactive seulement un fragment du perlecan est retrouvé suggère que la protéine native ne médie pas la bioactivité, mais qu'une protéolyse permettrait la libération d'un domaine cryptique en C-terminal. L'addition au SS de sulfate de chondroïtine ou

d'un peptide synthétique ayant le motif EGF de la séquence du domaine V du perlecan (CQLREPCLHGGTCQGTRCLCLPGFSGPRCQQGSGHG) diminue



significativement l'apoptose des CMLr (figure 14B).

Figure 14: Identification de molécules candidates conférant l'activité anti-apoptotique. **A:** L'axe de droite: évaluation de la quantité de protéines dans chacune des fractions de la chromatographie, par absorbance de lumière à une longueur d'onde de 280nm. L'axe de gauche: Évaluation de l'activité de chacune des fractions au niveau de la viabilité cellulaire par l'incorporation de cristal violet. Les CMLr sont incubées pendant 24 heures avec du milieu sans sérum (SS) dans lequel est diluée 1:5 la fraction à l'étude. Seulement une fraction (#16) obtient une activité qui augmente la viabilité des CMLr en comparaison au milieu SS. **B:** Étude de l'activité anti-apoptotique de molécules candidates se retrouvant dans la fraction biologiquement active. Le pourcentage de CMLr apoptotiques exposées

pendant 24 heures à du milieu normal (N), sans sérum (SS), sans sérum conditionné par des CEh soumise à un stress apoptotique (SSC4h), sans sérum dans lequel a été ajouté du sulfate de chondroïtine (SC: 60µg/ml, 125µg/ml, 250µg/ml), ou le peptide synthétique (Peptide: 0.1µg/ml, 1.0µg/ml). * $p < 0.05$ vs SS, $n \geq 4$. C: Pourcentage d'incorporation de BrdU dans les CMLr en présence, pendant 24 heures, de milieu (SS), (SSC4h), sans sérum dans lequel a été ajouté du sulfate de chondroïtine (SC: 60µg/ml, 125µg/ml, 250µg/ml), ou le peptide synthétique (Peptide: 0.1µg/ml, 1.0µg/ml). * $p < 0.05$ vs SS, $n \geq 8$.

Par contre, l'utilisation des mêmes conditions sur les CMLr, mais cette fois-ci en mesurant l'incorporation de BrdU, démontre qu'il n'y a pas d'augmentation de la prolifération des CMLr (Figure 14C) en présence de milieu SS dans lequel ont été ajouté le sulfate de chondroïtine et le peptide synthétique du domaine V du perlecan ayant le motif EGF. Les médiateurs proférant une résistance à l'apoptose n'ont pas nécessairement une activité pro-proliférative.

3.3.2- Identification d'un médiateur pro-prolifératif

Puisque la mesure de la viabilité des CMLr en présence des différentes fractions de la chromatographie a permis de trouver des médiateurs, mais que ces médiateurs n'avaient pas d'activité proliférative, il s'est avéré nécessaire de tester l'augmentation de la prolifération des CMLr en présence des différentes fractions par l'incorporation de BrdU. Contrairement à l'expérience précédente où seulement une fraction avait une activité bioactive, dans ce cas-ci, les fractions 13 à 17 étaient bioactives (Figure 15A). Certains candidats se retrouvant dans des bandes du SDS-PAGE qui se retrouvaient dans les fractions 13 à 17 ont été suggérés. La protéine liant la vitamine

D (DBP) a été identifiée. Alors, le DBP est ajouté dans le milieu SS et son effet prolifératif est vérifié sur les CMLr par l'incorporation de BrdU (Figure 15B). Les CMLr sont exposées pendant 24 heures au milieu SS additionné de DBP, il y a une augmentation significative de la prolifération des CMLr en présence de DBP à une concentration de 5ug/ml par rapport au milieu SS frais.

3.3.3- Potentialisation des médiateurs

L'ajout de sulfate de chondroïtine au SS contenant du DBP potentialise l'effet prolifératif du DBP (Figure 15B). En effet, DBP à 50ug/ml a un effet proliférateur plus robuste lorsqu'il est combiné au sulfate de chondroïtine sur les CMLr. Alors que le sulfate de chondroïtine n'a pas d'effet sur la prolifération des CML en carence de sérum.

3.3.4- La prolifération des CML induite par DBP est ERK 1/2-dépendante

L'activité du DBP est testée en présence ou en absence de l'inhibiteur de la voie des ERK 1/2, PD98059, au niveau de l'effet prolifératif par l'incorporation de BrdU (Figure 16). L'ajout de DMSO, le véhicule des inhibiteurs n'a pas d'effet sur la prolifération des CMLr en présence de SS+DBP. Par contre, l'ajout de PD98059, bloque l'activité de prolifération transmise par le DBP contenu dans le SS. Ces résultats suggèrent que l'effet prolifératif du DBP sur les CMLr est ERK1/2-dépendant.

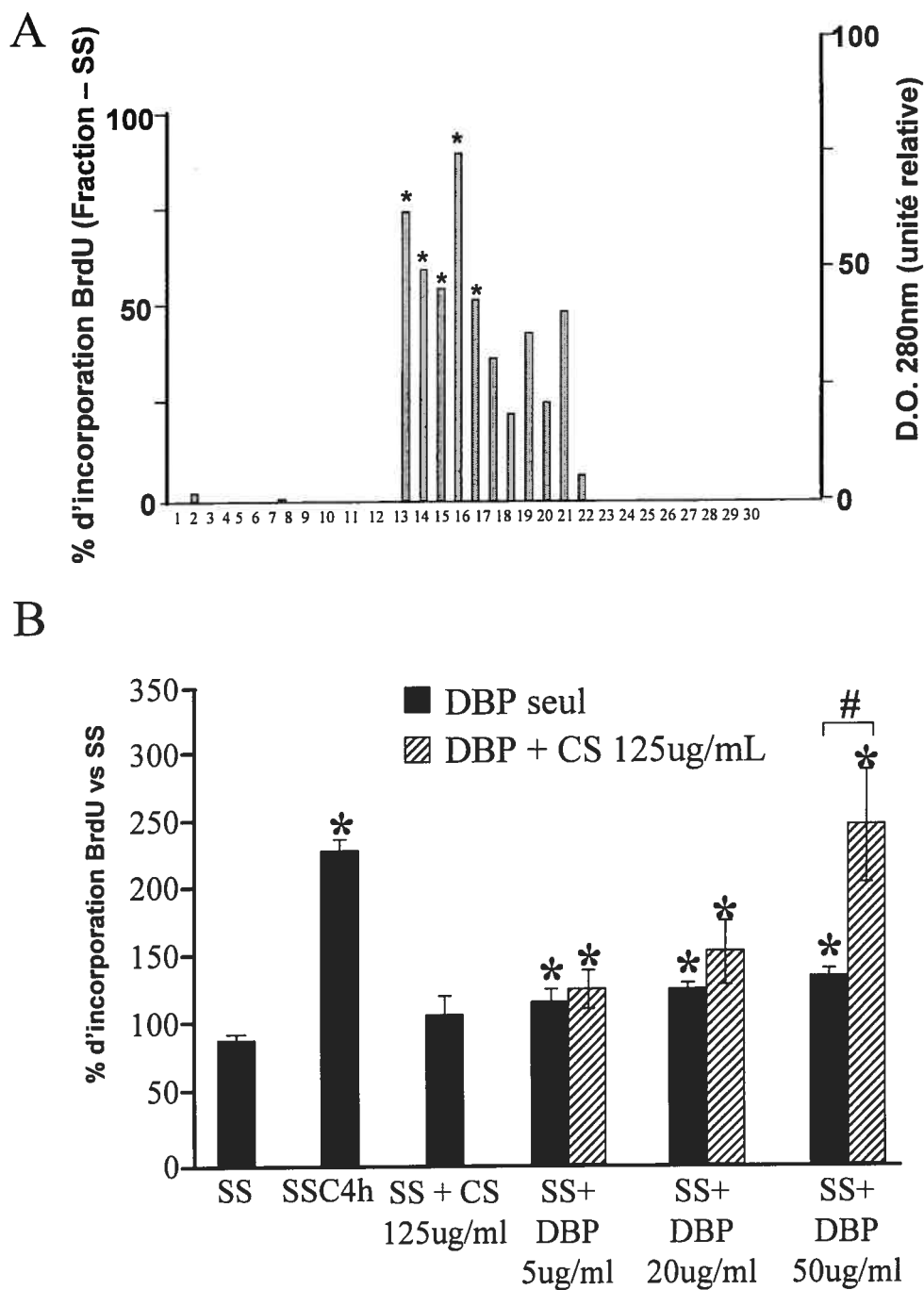


Figure 15: Identification de molécules candidates conférant l'activité pro-proliférative. A: L'axe de droite: évaluation de la quantité de protéines dans chacune des fractions de la chromatographie, par absorbance de lumière à une longueur d'onde de 280nm. L'axe de gauche: Évaluation de l'activité pro-proliférative de chacune des fractions par l'incorporation de BrdU dans les CMLr. Les CMLr sont incubées, pendant 24 heures, avec du milieu sans sérum (SS) dans lequel est diluée 1:5 la fraction à

l'étude. Plusieurs fractions augmentent la prolifération des CMLr en comparaison au milieu sans sérum frais. **B:** Étude de l'activité pro-proliférative de molécules candidates se retrouvant dans les fractions biologiquement actives. Le pourcentage d'incorporation de BrdU par les CMLr exposées pendant 24 heures à du milieu sans sérum (SS), sans sérum conditionné par des CEh en carence de sérum (SSC4h), sans sérum dans lequel a été ajouté la protéine liant la vitamine D (DBP: 5µg/ml, 20µg/ml, 50ug/ml) et/ou du sulfate de chondroïtine (SC: 125ug/ml). *p<0.05 vs SS, #p<0.05 vs SS+DBP50ug/ml, n≥8.

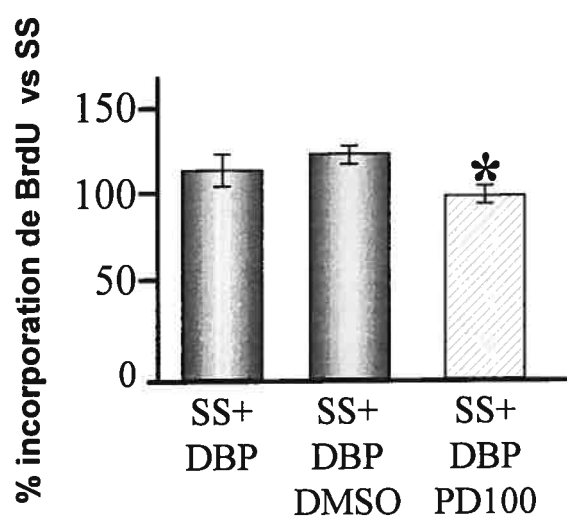


Figure 16: Détermination de la voie de signalisation pro-proliférative activée par DBP. Pourcentage d'incorporation de BrdU dans les CMLr en présence, pendant 24 heures, de milieu sans sérum (SS) additionné de DBP (20ug/ml) avec ou sans l'inhibiteur de la voie de ERK 1/2, PD98059. Une concentration de 100uM (PD100) de l'inhibiteur PD98059 est utilisée. Le niveau de prolifération est déterminé selon le pourcentage d'incorporation de BrdU par les CMLr dans les différentes conditions. *p < 0.05 vs SS+DMSO, n=6.

4- DISCUSSION

4.1- LA LIBÉRATION DE MÉDIATEURS PAR LES CE SOUMISES À UN STRESS APOPTOTIQUE

L'apoptose endothéliale est induite par plusieurs facteurs (hyperglycémie⁴⁴⁰⁻⁴⁴², hypertension⁴⁴³⁻⁴⁴⁵, etc.) et ceux-ci sont régulièrement associés à l'athérosclérose et d'autres maladies vasculaires. Plusieurs études suggèrent que l'apoptose endothéliale, la résistance à l'apoptose des CML, la prolifération des CML sont des facteurs important menant à l'initiation de l'épaississement intimal^{14,15}. Par le présent projet on tente de montrer que l'apoptose endothéliale peut avoir des effets sur l'environnement contrairement au concept initial qui voulait que l'apoptose soit un événement hautement régulé qui n'influence pas l'homéostasie des cellules voisines. L'apoptose endothéliale active différentes voies paracrines dans les CML. Dans les années 1970-1980 Morris J. Karnovsky proposait que les CE libéraient des médiateurs selon l'environnement dans lequel elles se trouvaient et ses médiateurs induiraient différentes réponses sur les CML⁴⁴⁶. Cette théorie a été proposée, alors que la compréhension du système vasculaire était élémentaire. Aujourd'hui avec les avancées technologiques, les expériences tendent à confirmer cette proposition qui a été émise il y a plus de 25 ans. Nos résultats appuient cette hypothèse proposée par Morris J. Karnovsky voulant que les CE, selon les conditions dans lesquels elles se retrouvent, produisent des médiateurs contrôlant les CML.

4.1.1- La carence de sérum; apoptose p53-dépendante

Différents facteurs pouvant induire biologiquement l'apoptose emprunte une voie p53 dépendante tel que les dommages à l'ADN^{447,448}, l'hypoxie⁴⁴⁹⁻⁴⁵¹, les LDL oxydés⁴⁵²⁻

⁴⁵⁴, l'hyperglycémie ^{455,456} et l'hypertension induite par l'angiotensine II⁴⁵⁷⁻⁴⁵⁹. C'est pourquoi on induit l'apoptose des CEh par la carence de sérum qui emprunte aussi une voie p53 dépendante^{460,461}. La carence de sérum permet d'imiter différents stress que les CE subissent provoquant l'activation de p53, de plus c'est un système simple qui ne nécessite pas l'ajout d'un corps étranger à l'environnement des cellules.

4.1.2- SSC4h anti-apoptotique et pro-prolifératif

Notre groupe a obtenu des résultats qui démontraient que la carence de sérum induit la relâche de médiateurs par les CE en carence de sérum et que ces molécules avaient un effet pro-prolifératif et anti-apoptotique sur les CE⁴³². On démontre que les médiateurs libérés déclenchent une voie paracrine qui a pour effet d'augmenter la prolifération et la résistance à l'apoptose des CML. Les CML dans un vaisseau normal se retrouvent dans la phase de quiescence G0⁴⁶². Ceci implique que les CML ne meurent pas ni ne prolifèrent et ne croissent pas. Les CML sont dans un environnement limité en facteur de croissance et n'ont pas la capacité de quitter leur forme statique. Lors de l'épaississement néointimal, les CML quittent leur quiescence, entame un cycle cellulaire et développent une résistance à l'apoptose^{25,462}. On tente de déterminer ce qui déclenche le départ des CML de leur forme statique. En temps normal, les CML diminuent leur prolifération au fur et à mesure que l'endothélium se répare^{89,90}. En culture cellulaire, les cellules ne sont pas dans un état statique, mais prolifératif. La carence de sérum induit une diminution de la prolifération en provoquant l'arrêt en G1 des cellules. Cet arrêt en G1 pourrait correspondre au moment où les CML freinent leur prolifération pour permettre la

diminution de la néointima et un retour au vaisseau normal réparé. Dans le cas où les signaux sont chroniques, les CML prolifèrent continuellement et le maintien de la résistance à l'apoptose empêche le vaisseau de retrouver sa forme initiale et on assiste à un remodelage pathologique¹. Le milieu SSC4h mime l'environnement qui permet le départ des CML de leur forme de quiescence G0/G1 vers un stade de prolifération et le développement d'une résistance à l'apoptose. Les résultats montrent que les médiateurs présents dans le SSC4h ont la capacité d'activer la prolifération de même que d'induire une résistance à l'apoptose dans les CML malgré la carence de sérum. Les CE soumises à un stress apoptotique libèrent des molécules capables d'imiter les effets de l'environnement des CML dans un vaisseau où il y a eu déclenchement de la formation d'une néointima.

Des résultats obtenus par le laboratoire démontraient que du milieu normal conditionné par des CE pendant 4 heures (NC) ne possédait pas d'activité cytoprotectrice. Des cellules endothéliales ont été soumises à un stress apoptotique (clivage de l'ADN par la mitomycine C) en présence de milieu N ou de milieu NC. Ni le milieu N, ni le milieu NC ne conférait une protection contre le stress apoptotique comme le milieu SSC4h. De plus, du milieu N contenant de la mitomycine C conditionné pendant 4h par des CE possédait une activité cytoprotectrice, ce qui valide l'utilisation de mitomycine C pour l'induction du stress apoptotique. Ces résultats suggèrent que le stress apoptotique des CE est nécessaire à la libération de facteurs ayant un effet pro-prolifératif et anti-apoptotique⁴³².

a- Effet anti-apoptotique caspase-dépendant

On démontre que l'activation des caspases dans les CE est requise pour la libération des médiateurs qui permettent le développement d'une résistance à l'apoptose dans les CML. Les CE sont pré-incubées avec l'inhibiteur pan-caspase z-VAD-fmk (la concentration utilisée a été démontré comme inhibant toutes les caspases^{463,464}). L'inhibiteur lie de façon irréversible les caspases et empêchent leur activation même lors d'un stress apoptotique. Le z-VAD-fmk inhibe l'apoptose caspase-dépendante dans les CE et bloque différents processus apoptotiques qui se déroulent en aval de l'activation des caspases^{209,211,220-224}. Les résultats suggèrent que l'activation des caspases est requise à la libération des facteurs anti-apoptotiques par les CE. La relâche des médiateurs anti-apoptotiques a lieu en aval de l'activation des caspases et la mort cellulaire caspases-indépendante n'est pas suffisante pour permettre cette libération.

b- Effet pro-prolifératif capase-indépendant

L'utilisation de l'inhibiteur pan-caspase a aussi permis de comprendre que les médiateurs prolifératifs ne sont pas les mêmes que les médiateurs anti-apoptotiques et qu'ils ne sont pas libérés par les mêmes mécanismes. En effet, puisque l'inhibition des caspases dans les CE subissant un stress apoptotique n'a pas d'effet sur la libération des molécules qui ont un effet pro-prolifératif sur les CML. La libération des facteurs pro-prolifératifs par les CE sous un stress apoptotique peut avoir lieu en amont de l'activation des caspases. Plusieurs facteurs en amont des caspases ont la capacité de réguler des protéines tant au niveau de leur expression, leur activation,

leur localisation ou bien leur dégradation. Des protéines de la famille des Bcl-2 peuvent induire la relâche de protéines par la mitochondrie et ces protéines pourraient avoir un effet direct ou indirect sur la libération de médiateurs pro-prolifératifs^{108,129-136}. La protéine p53 peut interagir directement avec plusieurs protéines dont Bax¹²⁷, ainsi p53 pourrait participer de près ou de loin à la libération de molécules pro-prolifératives. Une étude a démontré que malgré l'inhibition des caspases, une cellule peut emprunter une voie alternative et entamer un processus de mort cellulaire programmée indépendamment de l'activation des caspases. Certaines protéases (AIF¹⁵², EndoG¹⁵⁸, Cathepsine²²⁶) ont la capacité de mener au clivage de quelques substrats communs aux caspases. L'activation de ces substrats commanderait la libération de facteurs pro-prolifératifs.

L'utilisation du SSC30s confirme que les CE sous un stress apoptotique libèrent des médiateurs supplémentaires qui permettent une plus forte augmentation de la prolifération des CML. En effet, puisque le milieu SSC30s ne contenant que les molécules résiduelles libérées par les CE en prolifération et les molécules libérées par les CE sous un bref choc apoptotique induit une prolifération significativement plus petite que le milieu SSC4h qui contient des molécules supplémentaires libérées par les CE sous stress apoptotique pendant 4 heures. Lorsqu'on enlève l'endothélium, les CML prolifèrent, ceci suggère que les CE produiraient des molécules inhibitrices du cycle cellulaire des CML^{4,465}. Par contre, différentes études se contredisent en démontrant que les CE sécrètent des molécules ayant des effets inhibiteurs ou stimulateurs sur les CML⁴⁶⁶⁻⁴⁶⁸. Les CE statiques sécrètent-elles les mêmes molécules que les CE apoptotiques ou prolifératives ? Ceci pourrait suggérer que les CE

normales (SSC30s) produisent des molécules qui ont un effet prolifératif sur les CML parce que les CE sont dans un stade prolifératif plutôt que statique comme dans l'endothélium. Alors que les CE sous un stress apoptotique libèrent des molécules additionnelles ou différentes et induisent un effet prolifératif plus marqué sur les CML. Comme il a été mentionné plus tôt, l'hypothèse de Karnovsky suggèrent que selon les conditions dans lesquelles les CE se retrouvent elles libèrent différents médiateurs ayant des effets divers sur les CML⁴⁴⁶.

4.1.3- Arrêt en G1 contré par le SSC4h

Les CML quiescentes dans la média tout comme les CML qui cessent leur prolifération une fois la réparation d'un vaisseau terminée, se retrouvent dans la phase G0/G1⁴⁶². Les CML en carence de sérum s'arrêtent aussi dans la phase G0/G1^{438,439}. Les résultats montrent que le milieu SSC4h a la capacité de contrer l'arrêt en G0/G1 induit par la carence de sérum. Il est à noter que suite à 16 heures d'incubation dans le milieu SSC4h, la proportion de CML dans la phase G0/G1 est significativement plus petite que dans la population des CML exposées au milieu SS frais. Par contre, le développement de la résistance à l'apoptose n'a d'effet significatif qu'à partir de 24 heures dans les CML exposées au médiateurs libérés par les CE soumises à un stress apoptotique. Ces résultats proposent que les CML en présence de SSC4h activent le cycle cellulaire, prolifèrent et, ensuite, développent une résistance à l'apoptose.

a- Une augmentation de la cycline E, une diminution de p53 et p21 impliquées dans l'effet pro-prolifératif du SSC4h

Mes résultats suggèrent que le niveau de cycline E augmente dans les CML exposées au milieu SSC4h par rapport aux CML exposées au milieu SS. Les CML proliférant dans la néointima ont également un niveau de cycline E élevé, par rapport aux CML cessant de proliférer lors de la résorption de la néointima⁸⁸.

Les CML des vaisseaux dans leur forme statique n'exprime pas p21. Quelques heures suivant un dommage à l'endothélium, p21 est peu exprimé dans les CML et les CML prolifèrent pour former la néointima. En temps normal, p21 augmente considérablement dans les CML quelques jours post-insulte, lorsque l'endothélium est réparé. Cette augmentation de p21 a pour conséquences de freiner la prolifération des CML et éventuellement de résorber la néointima pour aboutir à un vaisseau réparé. Ensuite, p21 diminue et les cellules atteignent une forme statique comme dans un vaisseau normal⁴¹⁴. Par contre, lors du remodelage vasculaire pathologique où les CML poursuivent la prolifération, p21 n'est exprimé que dans les couches externes (la média et la néointima anti-luminale) les plus éloignées des facteurs mitogéniques⁴²⁸. J'ai démontré que les CML en carence de sérum ont un niveau de p21 élevé tout comme dans les CML qui arrêtent leur prolifération pour permettre la diminution de la néointima. Il a été démontré qu'une surexpression de p21 limitait l'épaississement intimal⁴²⁷⁻⁴²⁹. Les médiateurs contenus dans le SSC4h sont capables d'induire une prolifération des CML, malgré la carence de sérum. Le SSC4h mimerait la phase plus précoce de la réparation du vaisseau, soit le moment où les CML prolifèrent lors de la formation de la néointima. Les facteurs relâchés par les

CE sous un stress apoptotique ont la capacité de contrer l'arrêt en G1 induit par la carence de sérum.

Mes résultats démontrent qu'il y a une diminution rapide (30 minutes) de la cycline E dans les CMLr lors de la carence en sérum. La carence de sérum conduit à la dégradation de la cycline E, c'est une réponse rapide puisqu'elle n'implique pas la machinerie transcriptionnelle^{320,321}. Par contre, l'accumulation de p21 est plus tardive puisqu'elle nécessite la production de la protéine¹¹⁴. C'est pourquoi, on observe une accumulation significative de p21 dans les CMLr exposées au milieu SS qu'après 8 heures. La dégradation de la cycline E est suffisante pour induire l'arrêt en G1, mais l'accumulation de p21 est requise pour le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire³⁹⁶.

Les résultats montrent qu'il y a une diminution de p53 dans les CMLh exposées au milieu SSC4h par rapport au CMLh dans un milieu SS. Ces résultats sont en accord avec la diminution de p53 observée dans des modèles d'athérosclérose d'animaux et d'humains lors d'un développement accéléré de l'épaississement intimal⁴⁶⁹. De plus, la diminution de p53 est l'une des premières étapes dans la formation de la néointima. p53 est impliqué dans la maintenance de la quiescence des CML et les changements proathérosclérotiques dans les parois vasculaires sont dus à la suppression de p53 par la présence de mitogènes. Il n'y a pas de prolifération des CML de la média tant que p53 n'est pas supprimé¹⁹⁶. L'arrêt en G1 est contré dans les CML exposées au milieu SSC4h entre autre grâce à la diminution de p53, p21 et l'accumulation de la cycline E. La protéine p53 induit la dégradation rapide de cyclines comme la cycline D et la cycline E, puis induit la production de même que l'accumulation de p21^{260,261,396}.

Les CMLr sont des cellules transformées, immortelles où p53 est déficient. Ceci implique que l'arrêt en G1 a lieu de façon p53 indépendante. Récemment, il a été démontré que p73 était un candidat capable d'imiter p53. En effet, p73 peut transactiver p21, induire l'arrêt du cycle cellulaire et induire l'apoptose⁴⁷⁰. De plus, Sp-1 peut induire l'expression de p21 dans les cellules p53 déficientes soumise à la carence de sérum⁴⁷¹. Probablement, d'autres protéines encore inconnues servent d'alternatives à p53, afin d'éviter des catastrophes puisque p53 est impliquée dans plusieurs mécanismes cellulaires vitaux.

D'autres acteurs pourraient être étudiés pour compléter le portrait de l'effet du milieu SSC4h sur l'arrêt en G1. D'abord, la protéine Rb doit être hyperphosphorylée pour permettre la progression du cycle cellulaire, sinon la cellule arrête dans la phase G0/G1^{403,406}. Plusieurs évidences ont démontrés que la protéine Rb avait un rôle dans l'inhibition de la formation de la néointima lorsque Rb est pleinement actif⁴⁷². Il serait donc possible que Rb soit sous une forme hyperphosphorylée dans les CML exposées aux médiateurs libérés par les CE en carence de sérum pour permettre la prolifération des CML. L'inhibiteur des cdk, p27, serait aussi à étudier puisqu'il est associé aux CML proliférant dans la néointima. La quantité de CML positive à la détection de p27 est inversement proportionnelle à la prolifération des CML^{413,414}. De plus, il faudrait vérifier si le niveau protéique et de l'activité de cdk-2 est augmenté dans les CML exposées au milieu SSC4h par rapport au CML dans le milieu SS frais. En effet, les CML de la néointima ont une plus grande activité de cdk2 comparativement aux CML dans un état statique⁴¹⁶.

4.1.4- Les voies de transduction du signal des médiateurs du SSC4h

a- La voie ERK 1/2 activée par les médiateurs pro-prolifératifs et anti-apoptotiques

Le laboratoire a démontré que la réponse anti-apoptotique des CML activé par les médiateurs libérés par les CE en carence de sérum passe par l'activation des protéines ERK 1/2⁴³⁷. Les isoformes de MAP kinase de 42 et 44 kDa, nommées les kinases régulées par les signaux extracellulaires (ERK 1/2) sont exprimées dans la majorité des types cellulaire de mammifères. ERK 1/2 ont d'abord été identifiés comme étant des kinases qui deviennent phosphorylées en réponse à des facteurs de croissance. Les voies dont les signaux sont médiés par ERK 1/2 sont des cascades à plusieurs étapes de phosphorylation qui transmettent des signaux provenant de la surface cytosolique vers des cibles nucléaires, par exemple des facteurs de transcription nécessaire à l'expression de gènes impliqués dans la prolifération⁴⁷³. L'inhibition de ERK 1/2 par PD98059 inhibe autant l'effet prolifératif que anti-apoptotique dans les CML exposées au milieu SSC4h. Plusieurs études récentes suggèrent que l'activation de ERK 1/2, une importante voie signalitique promouvant la réponse anti-apoptotique⁴⁷⁴ et la prolifération dans les CML, est requise pour l'épaississement néointimal *in vivo*⁴⁷⁵. Les résultats du laboratoire démontrent que les médiateurs activent précisément ERK 1/2 dans les CML, puisque le milieu SSC4h contient des médiateurs libérés par les CE qui induisent une phosphorylation rapide et soutenue de ERK 1/2 dans les CML.

b- La voie PKC activée par les médiateurs pro-prolifératifs

Mes résultats démontrent que PKC a un rôle à jouer dans la transduction du signal des médiateurs libérés par les CE soumises à un stress apoptotique. L'addition de Calphostine C au milieu SSC4h bloque la prolifération des CML. Lorsque PKC est inhibée, les médiateurs pro-prolifératifs contenus dans le SSC4h n'ont plus la possibilité d'activer la prolifération des CML. Les médiateurs pro-prolifératifs empruntent une voie dépendante de la PKC pour induire la prolifération des CML.

La Calphostine C inhibe tous les types d'isoformes de PKC à 200nM et cette concentration est en deçà de la concentration nécessaire pour inhiber d'autres kinases tel que PKA ($IC_{50} > 50\mu M$) et PKG ($IC_{50} > 25\mu M$)⁴⁷⁶⁻⁴⁷⁹. L'activation de PKC, une Ser/Thr kinase, est un des événements les plus précoces dans une cascade de transduction du signal menant à une variété de réponses cellulaires⁴⁸⁰. L'état de phosphorylation est un déterminant critique de son activité⁴⁸¹⁻⁴⁸⁵. Traditionnellement, l'activation de PKC est détectée en mesurant sa translocation à la membrane plasmique, puisque après leur activation, la majorité des isoformes de PKC se transloque à la membrane en réponse à une augmentation transitoire de diacylglycérols à la membrane⁴⁸⁶. Il existe douze isoformes impliquées dans différentes réponses incluant la migration, la prolifération, l'apoptose⁴⁸⁷⁻⁴⁹¹. Les isoformes de PKC sont subdivisées en trois classes : les classiques (PKC α , β I, β II, γ (requièrent des phospholipides chargés négativement, diacylglycérol ou ester phorbol, et du calcium pour une activation optimale)^{492,493}; les nouveaux (PKC δ , ϵ , θ , η /L (souris/humain), μ (requièrent des phospholipides chargés négativement, diacylglycérol ou ester phorbol)^{493,494} et les atypiques (PKC λ 1 (souris/humain) et ζ (requièrent des phospholipides chargés négativement)⁴⁹³.

L'isoforme de PKC activée par le SSC4h n'a pas été déterminé. Par contre, des expériences préliminaires qui consistaient à ajouter un inhibiteur des isoformes classiques de PKC, soit le GF109203X, dans le milieu SSC4h, n'avait aucun effet sur la prolifération des CML. Alors, l'activation des PKC classiques n'est pas requise à l'induction de la prolifération des CMLr par les médiateurs libérés par les CE en carence de sérum. PKC- ϵ pourrait représenter un candidat potentiel. Des travaux ont démontrés qu'une protection contre les dommages induits par une ischémie peut être induite en soumettant le cœur à une ischémie de courte durée avant l'insulte prolongée^{495,496}. Cette forme de protection, nommée préconditionnement, s'apparente à l'effet retrouvé dans le SSC4h. Une première insulte, dans notre cas la carence de sérum et une ischémie dans le cas du préconditionnement, permet la libération de signaux qui sont récupérés dans le milieu SSC4h ou transmis dans le cœur qui permettent une protection contre une insulte du même type. Lors d'une expérience de préconditionnement par ischémie sur des myocytes cardiaques, seulement deux isoformes de PKC sont activés : PKC- δ et PKC- ϵ ⁴⁹⁷. Il s'est avéré que PKC- δ médie les dommages induits par l'ischémie⁴⁸⁶, alors que PKC- ϵ est requis et suffisant pour produire la protection contre les dommages par ischémie autant dans des cellules isolées que dans des souris transgéniques⁴⁹⁸. C'est pourquoi, on émet comme hypothèse que PKC- ϵ serait impliquée dans la transduction du signal prolifératif dans les CML transmis par les médiateurs libérés par les CE en carence de sérum. Une extraction des protéines membranaires de CML exposées à différentes conditions (N, SS, SSC4h) suivie d'une expérience d'immunobuvardage sur un gel SDS-PAGE permettrait de supporter l'hypothèse que PKC- ϵ est impliquée dans la transduction du message prolifératif dans les CML exposées aux médiateurs libérés par les CE

soumises à un stress apoptotique. Par contre, de cette façon, on ne pourra pas déterminer si l'activation de PKC- ϵ est un effet des molécules contenues dans le milieu SSC4h ou bien une réponse de la carence en sérum elle-même. En effet, puisque la carence en sérum induit l'activation de PKC- ϵ pour produire une protection contre les dommages.

Les médiateurs libérés par les CE en carence de sérum induisent la prolifération et la résistance à l'apoptose des CML via l'activation d'une voie ERK 1/2. Il reste à déterminer si l'activation de ERK 1/2 est dépendante ou indépendante de l'activation de PKC et déterminer qui de PKC ou de ERK 1/2 est activé prioritairement. Pour vérifier ces hypothèses, je procèderais à une extraction des protéines de CMLr exposés à du milieu SSC4h en présence ou en absence des inhibiteurs de ERK 1/2 ou de PKC, suivie d'un immunobuvardage d'un gel SDS-PAGE transféré sur une membrane. Avec des anticorps dirigés contre PKC ou ERK1/2 phosphorylé je pourrais déterminer si l'activation de l'une ou l'autre des protéines est influencée par un ou l'autre des inhibiteurs. C'est-à-dire, si l'inhibiteur de PKC empêche l'activation de ERK 1/2 par phosphorylation, alors PKC se trouve en amont de ERK 1/2 et est responsable de sa phosphorylation (directement ou indirectement). De plus, on doit vérifier si PKC et/ou ERK1/2 sont impliqués dans la diminution de p53, p21 et l'augmentation de la cycline E dans les CML exposées aux médiateurs libérés par les CE soumises à un stress apoptotique. Encore une fois, des extractions de protéines de CML exposées au milieu SSC 4h en présence ou en absence d'inhibiteur de PKC et/ou de ERK 1/2 permettront de déterminer si PKC et/ou ERK 1/2 sont impliqués dans la modulation des niveaux de protéines de p53, p21 et cycline E.

4.1.5- Caractérisation des médiateurs

On a tenté d'identifier les médiateurs capables d'induire la prolifération et la résistance à l'apoptose des CML. Les CE endommagées libèrent des molécules d'adhésion et des facteurs de croissance qui attirent les monocytes et les leucocytes (des cellules inflammatoire du sang) qui eux-mêmes peuvent libérer des facteurs de croissance^{15,16}. On s'est d'abord tourné vers des facteurs classiques, c'est-à-dire, des facteurs de croissance et des cytokines ayant un rôle dans la prolifération et qui sont surexprimés dans les lésions athérosclérotiques^{2,499,500}. Des résultats obtenus par le laboratoire ont permis de suggérer que IGF-1, VEGF, bFGF, PDGF BB, interleukine-1, TGF- β , NO, endothelin, angiopoietin-1, angiopoietine-2 ne sont pas impliqués dans l'activité protectrice paracrine du milieu SSC4h⁴³⁷. Les CE libèrent certainement des facteurs de croissance, mais dans notre système, ce ne sont pas ces derniers qui induisent la prolifération et la résistance à l'apoptose des CML. D'autres facteurs sont libérés par les CE en carence de sérum et permettent la prolifération et la résistance à l'apoptose des CML.

a- Un fragment C-terminal du domaine V du perlecan

Le laboratoire a tenté de caractériser les médiateurs en fractionnant le milieu SSC4h, dont une seule fraction a démontré une activité anti-apoptotique sur les CML. Cette fraction bioactive a été analysée par SDS-PAGE, où une bande d'environ 23kDa a été trouvée exclusivement dans la fraction bioactive et a été identifiée par spectrométrie de masse⁴³⁷. Cette bande correspondait à un fragment C-terminal du domaine V du perlecan. Le perlecan est un protéoglycan de 467kDa composé de cinq domaines et

cette protéine est un constituant normal de la membrane basale⁵⁰¹⁻⁵⁰³. Le domaine V du perlecan contient un site d'ancrage pour le sulfate de chondroïtine, trois motifs laminine G et quatre modules du motif EGF. La protéine entière du perlecan ne permet pas la résistance à l'apoptose ni la prolifération des CML suggérant que la protéine entière n'a pas d'effet dans la bioactivité du milieu SSC4h. De plus les fractions du milieu SSC contenant les protéines avec un poids moléculaire plus grand que 50kDa ne sont pas bioactives et aucun autre fragment du perlecan n'a été identifié dans la fraction bioactive⁴³⁷. Le peptide synthétique contenant le motif EGF de même que le sulfate de chondroïtine ont démontré une activité anti-apoptotique sur les CML⁴³⁷. Nos résultats suggèrent qu'une protéase activée lors de l'exposition des CE à un stress apoptotique serait responsable de la libération d'un domaine cryptique du perlecan qui est actif sur les CML. Par contre, le peptide synthétique contenant le motif EGF et le sulfate de chondroïtine n'ont pas d'effet sur la prolifération des CML lorsqu'ils sont ajoutés dans du milieu sans sérum. De plus, des résultats préliminaires effectués dans le laboratoire suggèrent que ni le peptide, ni le sulfate de chondroïtine n'ont d'effet sur la modulation de p53. Effectivement, les CMLh exposées au milieu SS additionné du peptide synthétique contenant le motif EGF ou du sulfate de chondroïtine ne diminuent pas le niveau de p53 par rapport aux CMLh en carence de sérum. Ces résultats suggèrent que p53 serait un inhibiteur de la prolifération des CML et que les médiateurs anti-apoptotiques n'inhiberaient pas p53 pour développer la résistance à l'apoptose. De plus, puisque la prolifération des CMLh dépend d'une diminution de p53, les médiateurs pro-prolifératifs contenu dans le SSC4h devront avoir la capacité d'inhiber p53. Ceci implique, encore une fois, que les médiateurs pro-prolifératifs diffèrent des médiateurs anti-apoptotiques.

On a démontré que les médiateurs anti-apoptotiques ne sont pas libérés par les CE en carence de sérum lorsque les caspases sont inhibés. On pourrait suggérer que l'activation des caspases est requises à la libération du domaine cryptique du perlecan qui a un effet anti-apoptotique sur les CML. Puisque le perlecan ne contient pas de site de clivage pour les caspases, les caspases activeraient ou permettraient la relâche d'une protéase qui serait capable de cliver le perlecan. La protéolyse de composantes de la membrane basale et la libération de facteur cryptique bioactif a été impliquée dans le contrôle de l'angiogénèse^{504,505}. Nos résultats suggèrent qu'un phénomène similaire a lieu lors du stress apoptotique induit aux CE par la protéolyse de protéoglycan et la libération de facteurs cryptiques anti-apoptotiques actifs sur les CML. Lors de l'apoptose, la cellule se contracte et se détache de la matrice extracellulaire dans le but d'être phagocytée par les cellules voisines⁵⁰⁶. Nous proposons que la protéolyse de la matrice extracellulaire par les CE soumises à un stress apoptotique seraient nécessaire à la libération des CE de la matrice extracellulaire afin de permettre la phagocytose subséquente de la cellule apoptotique. Ainsi, la protéolyse de la matrice extracellulaire entraînerait la libération d'un fragment bioactif du perlecan avant que la cellule apoptotique ne soit entraînée par le flux ou retirée par phagocytose. Les CML de la néointima dans une lésion athérosclérotique synthétisent de nouvelles composantes de la matrice extracellulaire et induisent l'expression de protéase dégradant la matrice et qui remodelent la matrice extracellulaire environnante⁵⁰⁷. En soumettant les CE à un stress apoptotiques, nous déclenchons peut-être une réponse similaire en induisant la synthèse de nouvelles composantes de la membrane basale et de protéases en réponse au stress apoptotique.

Les intégrines lient plusieurs ligands, principalement des molécules de la matrice extracellulaire, et stimulent une variété de signaux de transduction^{508,509}.

b- La protéine liant la vitamine D (DBP)

On a aussi testé l'activité proliférative des fractions du SSC4h. Cinq fractions ont démontrés une augmentation significative de la prolifération des CMLr. À partir d'un gel SDS-PAGE des bandes se retrouvant dans toutes les fractions actives ont été sélectionnées et séquencées par spectrométrie de masse. Un des candidats retenu est le DBP. Il est intéressant de noter qu'en 1977, R.S. Pennock et son équipe ont démontrés que le niveau sérique de DBP est augmenté dans les patients ayant un épisode coronarien aigu⁵¹⁰. Ces résultats supportent notre hypothèse que la molécule DBP est relâchée lors d'un stress vasculaire. L'ajout de 5ug/ml de DBP à du milieu SS augmente la prolifération des CMLr par rapport à des CMLr en carence de sérum. La prolifération induite par DBP est plus faible que le niveau de prolifération induit par le milieu SSC4h. Le milieu SSC4h contient une panoplie de facteurs autant pro-prolifératifs que anti-apoptotiques qui auraient un effet additif ou même synergique qui permettrait d'obtenir une si grande augmentation de la prolifération des CMLr.

DBP nécessiterait la coopération de d'autres médiateurs qui auraient un effet additif ou même synergique pour induire la prolifération des CML en carence de sérum. DBP est une protéine de 458 acides aminés sécrétée par plusieurs tissus et se retrouve dans le sérum⁵¹¹. C'est une protéine multifonctionnelle dont la première fonction décrite est son rôle de transporteur des formes hydrolysées de la vitamine D (25-OH

VitD et 1,25-(OH)₂ VitD)⁵¹². Par contre DBP en circulation à une concentration 20 fois plus élevée que la vitamine D, donc DBP a certainement d'autres fonctions. En effet, il a été démontré que DBP lie l'actine-G monomérique lors de bris cellulaire⁵¹³ et prévient la formation de microemboli⁵¹⁴. Si la capacité de DBP à lier l'actine-G est surpassée dans la circulation, la mort du patient est imminente. De plus, DBP augmente l'effet chemotactique pour les macrophages et les neutrophiles^{515,516}.

L'ajout de sulfate de chondroïtine à DBP dans un milieu SS augmente la capacité de DBP à induire la prolifération des CMLr. La présence de sulfate de chondroïtine potentialise l'effet de DBP sur la prolifération des CMLr. Il a été démontré que DBP se liait à un protéoglycan de sulfate de chondroïtine pour se fixer aux cellules. Des expériences ont été effectuées pour tenter d'identifier le récepteur cellulaire sur lequel DBP se lierait⁵¹⁷. Les résultats démontraient que le récepteur a la propriété d'être insaturable et que l'utilisation d'une chondroïtinase inhibe toutes liaisons de DBP à la cellule. Les résultats suggèrent que le sulfate de chondroïtine se lie aux CMLr puisque l'ajout de sulfate de chondroïtine au milieu SS permet le développement d'une résistance à l'apoptose dans les CMLr. Alors, on suppose que DBP par sa liaison avec le sulfate de chondroïtine pourrait, plus facilement, transmettre son effet proliférateur sur les CMLr. L'augmentation de la prolifération induite par une plus petite concentration de DBP et le sulfate de chondroïtine est faible comparativement à l'effet prolifératif du milieu SSC4h sur les CMLr. On suggère que DBP travaille en coopération avec d'autres médiateurs qui n'ont pas été identifiés. La concentration de chacun des médiateurs est sûrement plus petite que la dose de DBP, sulfate de chondroïtine ou du peptide synthétique ayant le domaine V du perlecan que l'on

utilise. La multitude des médiateurs coopèreraient afin de potentialiser l'effet soit pro-prolifératif, soit anti-apoptotique et peut-être même migratoire de chacun d'entre eux.

La figure 16, démontre que la prolifération des CMLr induite par le DBP dans le milieu sans sérum utilise une voie ERK1/2 dépendante. En effet, puisque l'ajout de PD98059, l'inhibiteur de la voie ERK1/2, bloque la prolifération des CMLr induite par le DBP. Ces résultats suggèrent que DBP aurait un rôle dans l'activation de la voie ERK1/2 et dans la prolifération des CML parmi les médiateurs retrouvés dans le milieu SSC4h. Avant de conclure que le DBP est bel et bien un médiateur libéré par les CE soumises à un stress apoptotique responsable d'une augmentation de la prolifération des CMLr, il est primordial de poursuivre les études au niveau moléculaire, de vérifier si DBP module les protéines de manière équivalente au SSC4h. C'est-à-dire, vérifier si DBP est capable de diminuer les niveaux de p53, p21 et d'augmenter la cycline E. (ou d'autres facteurs qui n'ont pas été étudiés) dans les CML pour contrer l'arrêt en G1 induit par la carence en sérum.

Les CML dans les vaisseaux reçoivent des signaux qui quasi-simultanément induisent la prolifération, la survie et la migration des CML. On a démontré que le SSC4h pouvait augmenter la prolifération et la survie des CMLr en carence de sérum (donc dans un état de quiescence). Il est donc inévitable de faire des études sur la migration des CMLr en présence de milieu SSC4h.

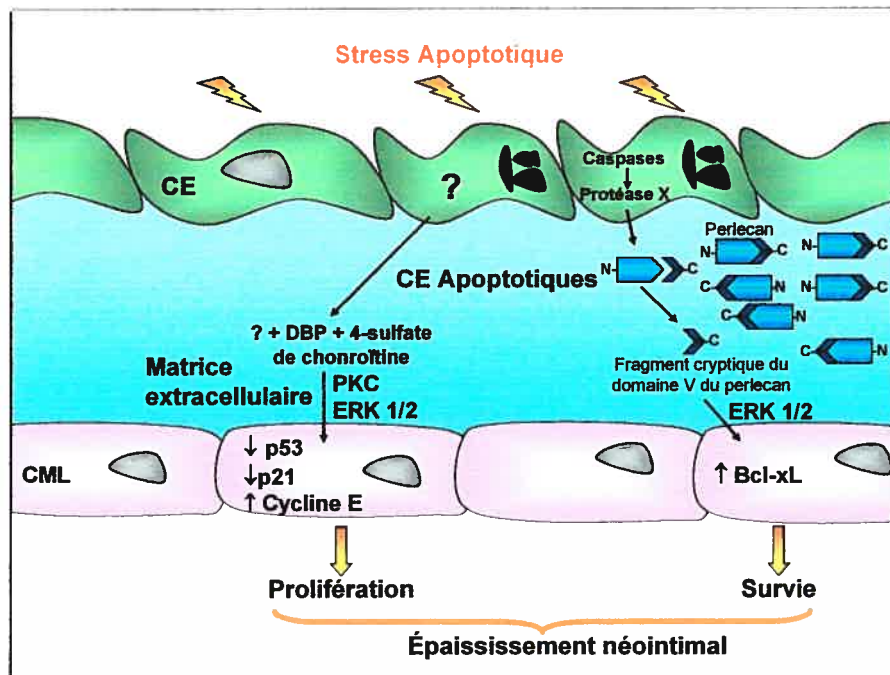


Figure 17: Schéma récapitulatif

4.2- MODÈLE HYPOTHÉTIQUE

En résumé, le modèle que l'on propose est que l'exposition des CE à un stress apoptotique permet la libération d'une variété de signaux qui ont des effets prolifératifs et anti-apoptotiques. Lors du stress apoptotique des CE, les caspases s'activent et permettraient l'activation d'une protéase X. Cette protéase acquiert la capacité de cliver le perlecan dans la membrane basale, ce qui libère un fragment du domaine V du perlecan. Ce fragment active une voie ERK 1/2 dépendante et permet le développement de la résistance à l'apoptose dans les CML, entre autre grâce à une diminution de Bcl-xL⁴³⁷. D'autres médiateurs sont certainement impliqués dans la survie, le développement de la résistance à l'apoptose des CML. Au même moment,

des médiateurs sont relâchés par les CE soumises à un stress apoptotique indépendamment de l'activation des caspases, par exemple le DBP. Ces médiateurs par des voies PKC et/ou ERK 1/2 dépendante induisent la prolifération des CML. Les CML prolifèrent en quittant leur stade statique, suite à une diminution de p53, p21 et une augmentation de cycline E. Ainsi, la prolifération et la survie des CML permettent la formation d'une néointima nécessaire à la réparation du vaisseau. Si l'apoptose des CE est chronique, la libération des médiateurs pro-prolifératifs et anti-apoptotiques persiste, on assiste à un remodelage vasculaire pathologique et même à l'obstruction de certains vaisseaux.

5-RÉFÉRENCES

1. Jobin, F. *La thrombose*, 319 (Les Presses de l'Université Laval, Québec, 1995).
2. Lusis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-41 (2000).
3. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-26 (1999).
4. Clowes, A.W., Reidy, M.A. & Clowes, M.M. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* **49**, 327-33 (1983).
5. Laurence, J. & Mitra, D. Apoptosis of microvascular endothelial cells in the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura/sporadic hemolytic uremic syndrome. *Semin Hematol* **34**, 98-105 (1997).
6. Mitra, D. et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells. *Blood* **89**, 1224-34 (1997).
7. Bombeli, T., Karsan, A., Tait, J.F. & Harlan, J.M. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* **89**, 2429-42 (1997).
8. Bombeli, T., Schwartz, B.R. & Harlan, J.M. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* **93**, 3831-8 (1999).
9. Casciola-Rosen, L., Rosen, A., Petri, M. & Schlissel, M. Surface blebs on apoptotic cells are sites of enhanced procoagulant activity: implications for coagulation events and antigenic spread in systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1624-9 (1996).
10. Greeno, E.W., Bach, R.R. & Moldow, C.F. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab Invest* **75**, 281-9 (1996).
11. Shimizu, A., Yamada, K., Sachs, D.H. & Colvin, R.B. Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine. *Lab Invest* **82**, 673-86 (2002).
12. Suzuki, J. et al. Antisense Bcl-x oligonucleotide induces apoptosis and prevents arterial neointimal formation in murine cardiac allografts. *Cardiovasc Res* **45**, 783-7 (2000).
13. Sata, M. & Walsh, K. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* **102**, 1682-9 (1998).
14. Munro, J.M. & Cotran, R.S. The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* **58**, 249-61 (1988).
15. Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**, 801-9 (1993).
16. Jonasson, L., Holm, J., Skalli, O., Bondjers, G. & Hansson, G.K. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* **6**, 131-8 (1986).
17. Banskota, N.K., Taub, R., Zellner, K. & King, G.L. Insulin, insulin-like growth factor I and platelet-derived growth factor interact additively in the induction of the protooncogene c-myc and cellular proliferation in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *Mol Endocrinol* **3**, 1183-90 (1989).
18. Hultgardh-Nilsson, A., Krondahl, U., Querol-Ferrer, V. & Ringertz, N.R. Differences in growth factor response in smooth muscle cells isolated from adult and neonatal rat arteries. *Differentiation* **47**, 99-105 (1991).

19. Majack, R.A. Beta-type transforming growth factor specifies organizational behavior in vascular smooth muscle cell cultures. *J Cell Biol* **105**, 465-71 (1987).
20. Majack, R.A., Majesky, M.W. & Goodman, L.V. Role of PDGF-A expression in the control of vascular smooth muscle cell growth by transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* **111**, 239-47 (1990).
21. Majesky, M.W., Benditt, E.P. & Schwartz, S.M. Expression and developmental control of platelet-derived growth factor A-chain and B-chain/Sis genes in rat aortic smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1524-8 (1988).
22. Raines, E.W., Dower, S.K. & Ross, R. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science* **243**, 393-6 (1989).
23. Salhany, K.E., Robinson-Benion, C., Candia, A.F., Pledger, W.J. & Holt, J.T. Differential induction of the c-fos promoter through distinct PDGF receptor-mediated signaling pathways. *J Cell Physiol* **150**, 386-95 (1992).
24. Sjolund, M. et al. Expression of PDGF alpha- and beta-receptors in rat arterial smooth muscle cells is phenotype and growth state dependent. *Growth Factors* **3**, 191-203 (1990).
25. Thyberg, J., Hedin, U., Sjolund, M., Palmberg, L. & Bottger, B.A. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* **10**, 966-90 (1990).
26. Alexander, R.W. & Dzau, V.J. Vascular biology: the past 50 years. *Circulation* **102**, IV112-6 (2000).
27. Libby, P., Sukhova, G., Lee, R.T. & Liao, J.K. Molecular biology of atherosclerosis. *Int J Cardiol* **62 Suppl 2**, S23-9 (1997).
28. Libby, P. Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* **247**, 349-58 (2000).
29. Baralle, M. & Baralle, F.E. Genetics and molecular biology. *Curr Opin Lipidol* **11**, 653-6 (2000).
30. Gimbrone, M.A., Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol* **75**, 67B-70B (1995).
31. Aviram, M. Review of human studies on oxidative damage and antioxidant protection related to cardiovascular diseases. *Free Radic Res* **33 Suppl**, S85-97 (2000).
32. Cathcart, M.K. & Folcik, V.A. Lipoxygenases and atherosclerosis: protection versus pathogenesis. *Free Radic Biol Med* **28**, 1726-34 (2000).
33. Cai, H. & Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* **87**, 840-4 (2000).
34. Tardif, J.C. Insights into oxidative stress and atherosclerosis. *Can J Cardiol* **16 Suppl D**, 2D-4D (2000).
35. Chai, Y.C., Howe, P.H., DiCorleto, P.E. & Chisolm, G.M. Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2. *J Biol Chem* **271**, 17791-7 (1996).
36. Zalba, G. et al. Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* **56**, 57-64 (2000).

37. Dhalla, N.S., Temsah, R.M. & Netticadan, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* **18**, 655-73 (2000).
38. Ruef, J. et al. Oxidative stress and atherosclerosis: its relationship to growth factors, thrombus formation and therapeutic approaches. *Thromb Haemost* **82 Suppl 1**, 32-7 (1999).
39. Paolisso, G., Esposito, R., D'Alessio, M.A. & Barbieri, M. Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? *Diabetes Metab* **25**, 298-306 (1999).
40. Irani, K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* **87**, 179-83 (2000).
41. Jeremy, J.Y., Rowe, D., Emsley, A.M. & Newby, A.C. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **43**, 580-94 (1999).
42. Zettler, M.E. & Pierce, G.N. Growth-promoting effects of oxidized low density lipoprotein. *Can J Cardiol* **17**, 73-9 (2001).
43. Chisolm, G.M., 3rd & Chai, Y. Regulation of cell growth by oxidized LDL. *Free Radic Biol Med* **28**, 1697-707 (2000).
44. Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K. & Paules, R.S. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* **28**, 1387-404 (2000).
45. Bartsch, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutat Res* **462**, 255-79 (2000).
46. Marnett, L.J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361-70 (2000).
47. Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J. & Zeiher, A.M. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* **95**, 1760-3 (1997).
48. Escargueil-Blanc, I. et al. Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 331-9 (1997).
49. Harada-Shiba, M., Kinoshita, M., Kamido, H. & Shimokado, K. Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem* **273**, 9681-7 (1998).
50. Li, D., Yang, B. & Mehta, J.L. Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol* **275**, H568-76 (1998).
51. Miller, E.R., 3rd, Appel, L.J., Jiang, L. & Risby, T.H. Association between cigarette smoking and lipid peroxidation in a controlled feeding study. *Circulation* **96**, 1097-101 (1997).
52. Marathe, G.K., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. & McIntyre, T.M. Oxidized LDL contains inflammatory PAF-like phospholipids. *Trends Cardiovasc Med* **11**, 139-42 (2001).

53. Chobanian AV, D.V. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. in *Atherosclerosis and coronary artery disease*, Vol. 1 (ed. Lippincott-Raven) 237-242 (Philadelphia, 1996).
54. Thomas, G.N. et al. Deleterious Impact of "High Normal" Glucose Levels and Other Metabolic Syndrome Components on Arterial Endothelial Function and Intima-Media Thickness in Apparently Healthy Chinese Subjects: The CATHAY Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2004).
55. Harker, L.A., Ross, R., Slichter, S.J. & Scott, C.R. Homocystine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* **58**, 731-41 (1976).
56. Thompson, E.B. & Ayala-Torres, S. Oxysterols and apoptosis: evidence for gene regulation outside the cholesterol pathway. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **34**, 25-32 (1999).
57. Negoro, N. et al. Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J Clin Invest* **95**, 1140-50 (1995).
58. Kabat, A., Ponicke, K., Salameh, A., Mohr, F.W. & Dhein, S. Effect of a beta 2-adrenoceptor stimulation on hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther* **308**, 564-73 (2004).
59. Majors, A., Ehrhart, L.A. & Pezacka, E.H. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 2074-81 (1997).
60. Gerhard, G.T. & Duell, P.B. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **10**, 417-28 (1999).
61. Malinow, M.R. Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases: a mini-review. *Clin Chem* **41**, 173-6 (1995).
62. McCully, K.S. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* **56**, 111-28 (1969).
63. Mudd, S.H. et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *Am J Hum Genet* **37**, 1-31 (1985).
64. Nehler, M.R., Taylor, L.M., Jr. & Porter, J.M. Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: a review. *Cardiovasc Surg* **5**, 559-67 (1997).
65. Nygard, O. et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* **337**, 230-6 (1997).
66. Knowles, J.W. et al. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)ApoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* **105**, 451-8 (2000).
67. Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S. & Mulligan, R.C. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med* **183**, 1797-806 (1996).
68. Gussoni, E. et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* **401**, 390-4 (1999).
69. Asahara, T. et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* **275**, 964-7 (1997).

70. Asahara, T. et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* **85**, 221-8 (1999).
71. Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I. & Blau, H.M. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-9 (2000).
72. Habib, R., Mathieu, H. & Royer, P. [Hemolytic-uremic syndrome of infancy: 27 clinical and anatomic observations]. *Nephron* **4**, 139-72 (1967).
73. Habib, R., Courtecuisse, V., Leclerc, F., Mathieu, H. & Royer, P. [Anatomopathologic study of 35 cases of hemolytic and uremic syndrome in children]. *Arch Fr Pediatr* **26**, 391-416 (1969).
74. Vitsky, B.H., Suzuki, Y., Strauss, L. & Churg, J. The hemolytic-uremic syndrome: a study of renal pathologic alterations. *Am J Pathol* **57**, 627-47 (1969).
75. Gervais, M., Richardson, J.B., Chiu, J. & Drummond, K.N. Immunofluorescent and histologic findings in the hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics* **47**, 352-9 (1971).
76. Morel-Maroger, L., Kanfer, A., Solez, K., Sraer, J.D. & Richet, G. Prognostic importance of vascular lesions in acute renal failure with microangiopathic hemolytic anemia (hemolytic-uremic syndrome): clinicopathologic study in 20 adults. *Kidney Int* **15**, 548-58 (1979).
77. Remuzzi, G. & Ruggenti, P. The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* **48**, 2-19 (1995).
78. Pisoni, R. & Remuzzi, G. Thrombotic microangiopathy. *Eur J Intern Med* **11**, 135-139 (2000).
79. Lian, E.C. Thrombotic thrombocytopenic purpura--a syndrome caused by multiple pathogenetic mechanisms. *Invest Clin* **42 Suppl 1**, 75-86 (2001).
80. Kakishita, E. Pathophysiology and treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura/hemolytic uremic syndrome (TTP/HUS). *Int J Hematol* **71**, 320-7 (2000).
81. Renaud, C., Niaudet, P., Gagnadoux, M.F., Broyer, M. & Habib, R. Haemolytic uraemic syndrome: prognostic factors in children over 3 years of age. *Pediatr Nephrol* **9**, 24-9 (1995).
82. Gagnadoux, M.F., Habib, R., Gubler, M.C., Bacri, J.L. & Broyer, M. Long-term (15-25 years) outcome of childhood hemolytic-uremic syndrome. *Clin Nephrol* **46**, 39-41 (1996).
83. Matsumae, T., Takebayashi, S. & Naito, S. The clinico-pathological characteristics and outcome in hemolytic-uremic syndrome of adults. *Clin Nephrol* **45**, 153-62 (1996).
84. Wight, T.N. Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* **9**, 1-20 (1989).
85. Bobik, A. & Campbell, J.H. Vascular derived growth factors: cell biology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **45**, 1-42 (1993).
86. Cho, A., Mitchell, L., Koopmans, D. & Langille, B.L. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in carotid arteries of immature rabbits. *Circ Res* **81**, 328-37 (1997).

87. Perlman, H., Maillard, L., Krasinski, K. & Walsh, K. Evidence for the rapid onset of apoptosis in medial smooth muscle cells after balloon injury. *Circulation* **95**, 981-7 (1997).
88. Wei, G.L. et al. Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty. *Circ Res* **80**, 418-26 (1997).
89. Han, D.K. et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* **147**, 267-77 (1995).
90. Bochaton-Piallat, M.L., Gabbiani, F., Redard, M., Desmouliere, A. & Gabbiani, G. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol* **146**, 1059-64 (1995).
91. Sulston, J.E. & Horvitz, H.R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56**, 110-56 (1977).
92. Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G. & Thomson, J.N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **100**, 64-119 (1983).
93. Kimble, J. & Hirsh, D. The postembryonic cell lineages of the hermaphrodite and male gonads in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **70**, 396-417 (1979).
94. Ellis, H.M. & Horvitz, H.R. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* **44**, 817-29 (1986).
95. Conradt, B. & Horvitz, H.R. The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* **93**, 519-29 (1998).
96. Shaham, S. & Horvitz, H.R. An alternatively spliced *C. elegans* ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor. *Cell* **86**, 201-8 (1996).
97. Vaux, D.L. CED-4--the third horseman of apoptosis. *Cell* **90**, 389-90 (1997).
98. Metzstein, M.M., Stanfield, G.M. & Horvitz, H.R. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* **14**, 410-6 (1998).
99. Chinnaiyan, A.M., Chaudhary, D., O'Rourke, K., Koonin, E.V. & Dixit, V.M. Role of CED-4 in the activation of CED-3. *Nature* **388**, 728-9 (1997).
100. Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Lane, B.R. & Dixit, V.M. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* **275**, 1122-6 (1997).
101. Wu, D., Wallen, H.D., Inohara, N. & Nunez, G. Interaction and regulation of the *Caenorhabditis elegans* death protease CED-3 by CED-4 and CED-9. *J Biol Chem* **272**, 21449-54 (1997).
102. Wyllie, A.H., Kerr, J.F. & Currie, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* **68**, 251-306 (1980).
103. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57 (1972).
104. Fadok, V.A. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**, 2207-16 (1992).
105. Savill, J., Fadok, V., Henson, P. & Haslett, C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* **14**, 131-6 (1993).

106. Rich, T., Allen, R.L. & Wyllie, A.H. Defying death after DNA damage. *Nature* **407**, 777-83 (2000).
107. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310 (2000).
108. Nakano, G. & Vousden, K.H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**, 683-694 (2001).
109. Oren, M., Maltzman, W. & Levine, A.J. Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* **1**, 101-10 (1981).
110. Ferri, K.F. & Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology* **3**, E255-E263 (2001).
111. Kern, S.E. et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* **252**, 1708-11 (1991).
112. Funk, W.D., Pak, D.T., Karas, R.H., Wright, W.E. & Shay, J.W. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol* **12**, 2866-71 (1992).
113. Kastan, M.B. et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-97 (1992).
114. el-Deiry, W.S. et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**, 1169-74 (1994).
115. Adams, J.M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326 (1998).
116. Tsujimoto, Y. & Shimizu, S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett* **466**, 6-10 (2000).
117. Reed, J.C. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**, 773-776 (1997).
118. Antonsson, B. & Martinou, J.C. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* **256**, 50-57 (2000).
119. Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. & Martinou, J.C. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* **20**, 929-35 (2000).
120. Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. & Martinou, J.C. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* **276**, 11615-23 (2001).
121. Wei, M.C. et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* **14**, 2060-71 (2000).
122. Wolter, K.G. et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**, 1281-92 (1997).
123. Desagher, S. et al. Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* **144**, 891-901 (1999).
124. Griffiths, G.J. et al. Cell damage-induced conformational changes of the proapoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **144**, 903-14 (1999).
125. Goping, I.S. et al. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* **143**, 207-15 (1998).

126. Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. & Martinou, J.C. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* **345 Pt 2**, 271-8 (2000).
127. Chipuk, J.E. et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-4 (2004).
128. Roucou, X., Montessuit, S., Antonsson, B. & Martinou, J.C. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. *Biochem J* **368**, 915-21 (2002).
129. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase-8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* **94**, 491-501 (1998).
130. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X. Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptor. *Cell* **94**, 481-490 (1998).
131. Heibein, J.A. et al. Granzyme B-mediated cytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members bid and Bax. *J Exp Med* **192**, 1391-402 (2000).
132. Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. & Korsmeyer, S.J. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* **87**, 619-28 (1996).
133. Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M. & Strasser, A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* **3**, 287-96 (1999).
134. Puthalakath, H. et al. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* **293**, 1829-32 (2001).
135. Oda, E. et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-8 (2000).
136. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**, 673-82 (2001).
137. Hengartner, M.O. & Horvitz, H.R. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* **76**, 665-76 (1994).
138. Cheng, E.H. et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**, 705-11 (2001).
139. van Gurp, M., Festjens, N., van Loo, G., Saelens, X. & Vandenabeele, P. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 487-97 (2003).
140. Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* **341 (Pt 2)**, 233-49 (1999).
141. Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kühnle, S. & Nicotera, P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* **185**, 1481-1486 (1997).

142. Waterhouse, N.J. et al. Cytochrome c maintains mitochondrial transmembrane potential and ATP generation after outer mitochondrial membrane permeabilization during the apoptotic process. *J Cell Biol* **153**, 319-28 (2001).
143. Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I. & Green, D.R. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* **2**, 156-62 (2000).
144. Zamzami, N. & Kroemer, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 67-71 (2001).
145. Martinou, J.C. & Green, D.R. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 63-7 (2001).
146. Suzuki, M., Youle, R.J. & Tjandra, N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**, 645-54 (2000).
147. Wei, M.C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-30 (2001).
148. Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* **407**, 770-6 (2000).
149. Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-57 (1996).
150. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42 (2000).
151. Verhagen, A.M. et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP protein. *Cell* **102**, 43 (2000).
152. Susin, S.A. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446 (1999).
153. Hegde, R. et al. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* **277**, 432-8 (2002).
154. Suzuki, Y. et al. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**, 613-21 (2001).
155. Martins, L.M. et al. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem* **277**, 439-44 (2002).
156. van Loo, G. et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* **9**, 20-6 (2002).
157. Verhagen, A.M. et al. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **277**, 445-54 (2002).
158. Li, L.Y., Luo, X. & Wang, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99 (2001).
159. Keilin, D. Cytochrome and intracellular oxidase. *Proc. R. Soc. Lond. B* **106**, 418-444 (1930).
160. Ameisen, J.C. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* **9**, 367-93 (2002).
161. Clarke, P.G. Apoptosis: from morphological types of cell death to interacting pathways. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 308-9; author reply 310 (2002).

162. Li, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-89 (1997).
163. Adams, J.M. & Cory, S. Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 715-20 (2002).
164. Acehan, D. et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**, 423-32 (2002).
165. Li, K. et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* **101**, 389-99 (2000).
166. Yang, X., Chang, H.Y. & Baltimore, D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* **281**, 1355-7 (1998).
167. Rodriguez, J. & Lazebnik, Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* **13**, 3179-84 (1999).
168. Earnshaw, W.C., Martins, L.M. & Kaufmann, S.H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* **68**, 383-424 (1999).
169. Thornberry, N.A. et al. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17907-11 (1997).
170. Vanags, D.M., Porn-Ares, M.I., Coppola, S., Burgess, D.H. & Orrenius, S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Bio Chem* **271**, 31075-31085 (1996).
171. Geng, Y.J. et al. Caspase-3-induced gelsolin fragmentation contributes to actin cytoskeletal collapse, nucleolysis, and apoptosis of vascular smooth muscle cells exposed to proinflammatory cytokines. *Eur J Cell Biol* **77**, 294-302 (1998).
172. Kothakota, S. et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* **278**, 294 (1997).
173. Rao, L., Perez, D. & White, E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* **135**, 1441-1455 (1996).
174. Buendia, B., Santa-Maria, A. & Courvalin, J.C. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex protein during apoptosis. *J Cell Sci* **112**, 1743-1753 (1999).
175. Rudel, T. & Bokoch, G.M. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase mediated activation of PAK2. *Science* **278**, 1571-1574 (1997).
176. Nicholson, D.W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* **6**, 1028-42 (1999).
177. Deveraux, Q.L. et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* **17**, 2215-23 (1998).
178. Wu, G. et al. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. *Nature* **408**, 1008-12 (2000).
179. Srinivasula, S.M. et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112-106 (2001).

180. Chai, J. et al. Structural basis of caspase-7 inhibition of XIAP. *Cell* **104**, 769-780 (2001).
181. Faccio, L. et al. Characterization of a novel human serine protease that has extensive homology to bacterial heat shock endoprotease HtrA and is regulated by kidney ischemia. *J Biol Chem* **275**, 2581-8 (2000).
182. Gray, C.W. et al. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur J Biochem* **267**, 5699-710 (2000).
183. Itoh, N. & Nagata, S. A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J Biol Chem* **268**, 10932-7 (1993).
184. Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. & Wallach, D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-15 (1996).
185. Muzio, M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell* **85**, 817-27 (1996).
186. Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. & Dixit, V.M. I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17255-7 (1997).
187. Irmeler, M. et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**, 190-5 (1997).
188. Srinivasula, S.M. et al. FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 18542-5 (1997).
189. Shu, H.B., Halpin, D.R. & Goeddel, D.V. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* **6**, 751-63 (1997).
190. Han, D.K. et al. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 11333-8 (1997).
191. Rasper, D.M. et al. Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* **5**, 271-88 (1998).
192. Thome, M. et al. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* **386**, 517-21 (1997).
193. Hu, S., Vincenz, C., Buller, M. & Dixit, V.M. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 9621-4 (1997).
194. Bertin, J. et al. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 1172-6 (1997).
195. Scaffidi, C. et al. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**, 1675-87 (1998).
196. Rodriguez-Campos, A., Ruiz-Enriquez, P., Faraudo, S. & Badimon, L. Mitogen-induced p53 downregulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**, 214-9 (2001).

197. Guevara, N.V., Kim, H.S., Antonova, E.I. & Chan, L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat Med* **5**, 335-9 (1999).
198. Pollman, M.J., Hall, J.L., Mann, M.J., Zhang, L. & Gibbons, G.H. Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med* **4**, 222-7 (1998).
199. Pollman, M.J., Hall, J.L. & Gibbons, G.H. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype. *Circ Res* **84**, 113-21 (1999).
200. Fukuo, K. et al. Possible participation of Fas-mediated apoptosis in the mechanism of atherosclerosis. *Gerontology* **43 Suppl 1**, 35-42 (1997).
201. Cai, W., Devaux, B., Schaper, W. & Schaper, J. The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **131**, 177-86 (1997).
202. Geng, Y.J., Henderson, L.E., Levesque, E.B., Muszynski, M. & Libby, P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 2200-8 (1997).
203. Schneider, D.B. et al. Expression of Fas ligand in arteries of hypercholesterolemic rabbits accelerates atherosclerotic lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 298-308 (2000).
204. Dong, C., Wilson, J.E., Winters, G.L. & McManus, B.M. Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. *Lab Invest* **74**, 921-31 (1996).
205. Takahashi, T. et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**, 969-76 (1994).
206. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C.I., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. & Nagata, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* **356**, 314-7 (1992).
207. Sata, M. & Walsh, K. Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J Biol Chem* **273**, 33103-6 (1998).
208. Imanishi, T. et al. Expression of cellular FLICE-inhibitory protein in human coronary arteries and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* **156**, 125-37 (2000).
209. Holler, N. et al. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* **1**, 489-95 (2000).
210. Mateo, V. et al. CD47 ligation induces caspase-ondependent cell death in chronic lymphocytic leukemia. *Nature Med* **5**, 1277-1284 (1999).
211. Vercammen, D. et al. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* **188**, 919-930 (1998).
212. Foghsgaard, L. et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**, 999-1010 (2001).
213. Roberts, L.R., Adjei, P.N. & Gores, G.J. Cathepsins as effector proteases in hepatocyte apoptosis. *Cell Biochem Biophys* **30**, 71-88 (1999).

214. Lavoie, J.N., Nguyen, M., Marcellus, R.C., Branton, P.E. & Shore, G.C. E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53-independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk. *J Cell Biol* **140**, 637-45 (1998).
215. Berndt, C., Mopps, B., Angermuller, S., Gierschik, P. & Krammer, P.H. CXCR4 and CD4 mediate a rapid CD95-independent cell death in CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12556-61 (1998).
216. Kitanaka, C. & Kuchino, Y. Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ* **6**, 508-15 (1999).
217. Mathiasen, I.S., Lademann, U. & Jaattela, M. Apoptosis induced by vitamin D compounds in breast cancer cells is inhibited by Bcl-2 but does not involve known caspases or p53. *Cancer Res* **59**, 4848-56 (1999).
218. Elliott, K., Ge, K., Du, W. & Prendergast, G.C. The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene* **19**, 4669-84 (2000).
219. Woodle, E.S. et al. Anti-human class I MHC antibodies induce apoptosis by a pathway that is distinct from the Fas antigen-mediated pathway. *J Immunol* **158**, 2156-64 (1997).
220. Matsumura, H. et al. Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J Cell Biol* **151**, 1247-56 (2000).
221. Khwaja, A. & Tatton, L. Resistance to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor alpha can be overcome by inhibition of a FADD/caspase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem* **274**, 36817-23 (1999).
222. Luschen, S., Ussat, S., Scherer, G., Kabelitz, D. & Adam-Klages, S. Sensitization to death receptor cytotoxicity by inhibition of fas-associated death domain protein (FADD)/caspase signaling. Requirement of cell cycle progression. *J Biol Chem* **275**, 24670-8 (2000).
223. Xue, L., Fletcher, G.C. & Tolkovsky, A.M. Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* **14**, 180-98 (1999).
224. McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S. & Evan, G.I. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J Cell Biol* **136**, 215-27 (1997).
225. Wang, K.K. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* **23**, 20-6 (2000).
226. Leist, M. & Jäätelä, M. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* **8**, 324-326 (2001).
227. Yu, S.W. et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**, 259-63 (2002).
228. Susin, S.A. et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**, 571-80 (2000).
229. Exley, G.E., Tang, C., McElhinny, A.S. & Warner, C.M. Expression of caspase and BCL-2 apoptotic family members in mouse preimplantation embryos. *Biol Reprod* **61**, 231-9 (1999).
230. Samejima, K., Tone, S. & Earnshaw, W.C. CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis. *J Biol Chem* **276**, 45427-32 (2001).

231. Sakahira, H., Enari, M. & Nagata, S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**, 96-9 (1998).
232. Mate, M.J. et al. The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol* **9**, 442-6 (2002).
233. McIlroy, D. et al. An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* **14**, 549-58 (2000).
234. Miramar, M.D. et al. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* **276**, 16391-8 (2001).
235. Klein, J.A. et al. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* **419**, 367-74 (2002).
236. Ohsato, T. et al. Mammalian mitochondrial endonuclease G. Digestion of R-loops and localization in intermembrane space. *Eur J Biochem* **269**, 5765-70 (2002).
237. van Loo, G. et al. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* **8**, 1136-42 (2001).
238. Widlak, P., Li, L.Y., Wang, X. & Garrard, W.T. Action of recombinant human apoptotic endonuclease G on naked DNA and chromatin substrates: cooperation with exonuclease and DNase I. *J Biol Chem* **276**, 48404-9 (2001).
239. Smith, K.G., Strasser, A. & Vaux, D.L. CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *Embo J* **15**, 5167-76 (1996).
240. Doerfler, P., Forbush, K.A. & Perlmutter, R.M. Caspase enzyme activity is not essential for apoptosis during thymocyte development. *J Immunol* **164**, 4071-9 (2000).
241. Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P. & Golstein, P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr Biol* **9**, 967-70 (1999).
242. Joza, N. et al. Essential role of mitochondria apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**, 549-554 (2001).
243. Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K. & Paules, R.S. Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect* **107 Suppl 1**, 5-24 (1999).
244. Howard, A. & Pelc, S.R. Synthesis of nucleoprotein in bean root cells. *Nature* **167**, 599-600 (1951).
245. Baserga, R. Growth in size and cell DNA replication. *Exp Cell Res* **151**, 1-5 (1984).
246. Pardee, A.B., Dubrow, R., Hamlin, J.L. & Kletzien, R.F. Animal cell cycle. *Annu Rev Biochem* **47**, 715-50 (1978).
247. Nasmyth, K. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science* **274**, 1643-5 (1996).
248. Rao, P.N. & Johnson, R.T. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* **225**, 159-64 (1970).
249. Johnson, R.T. & Rao, P.N. Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. *Nature* **226**, 717-22 (1970).

250. Coqueret, O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* **299**, 35-55 (2002).
251. Matsushime, H., Roussel, M.F., Ashmun, R.A. & Sherr, C.J. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell* **65**, 701-13 (1991).
252. Matsushime, H. et al. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **14**, 2066-76 (1994).
253. Ajchenbaum, F., Ando, K., DeCaprio, J.A. & Griffin, J.D. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G1 phase in primary human T lymphocytes. *J Biol Chem* **268**, 4113-9 (1993).
254. Won, K.A., Xiong, Y., Beach, D. & Gilman, M.Z. Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9910-4 (1992).
255. Motokura, T. et al. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* **350**, 512-5 (1991).
256. Kiyokawa, H. et al. Cloning of a D-type cyclin from murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2444-7 (1992).
257. Motokura, T., Keyomarsi, K., Kronenberg, H.M. & Arnold, A. Cloning and characterization of human cyclin D3, a cDNA closely related in sequence to the PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene. *J Biol Chem* **267**, 20412-5 (1992).
258. Filmus, J. et al. Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* **9**, 3627-33 (1994).
259. Chang, L. & Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40 (2001).
260. Yu, Z.K., Gervais, J.L. & Zhang, H. Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21(CIP1/WAF1) and cyclin D proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11324-9 (1998).
261. Russell, A. et al. Cyclin D1 and D3 associate with the SCF complex and are coordinately elevated in breast cancer. *Oncogene* **18**, 1983-91 (1999).
262. Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**, 3499-511 (1998).
263. Alt, J.R., Cleveland, J.L., Hannink, M. & Diehl, J.A. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* **14**, 3102-14 (2000).
264. Quelle, D.E. et al. Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev* **7**, 1559-71 (1993).
265. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M.J., Pagano, M. & Draetta, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* **7**, 812-21 (1993).
266. Matsushime, H., Roussel, M.F. & Sherr, C.J. Novel mammalian cyclins (CYL genes) expressed during G1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **56**, 69-74 (1991).
267. Meyerson, M. & Harlow, E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* **14**, 2077-86 (1994).

268. Matsushime, H. et al. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* **71**, 323-34 (1992).
269. Nigg, E.A. Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* **8**, 312-7 (1996).
270. Harbour, J.W. & Dean, D.C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**, 2393-409 (2000).
271. Morgan, D.O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**, 261-91 (1997).
272. Zhang, H.S., Postigo, A.A. & Dean, D.C. Active transcriptional repression by the Rb-E2F complex mediates G1 arrest triggered by p16INK4a, TGFbeta, and contact inhibition. *Cell* **97**, 53-61 (1999).
273. Ferreira, R. et al. Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter. *EMBO Rep* **2**, 794-9 (2001).
274. Lai, A. et al. RBP1 recruits the mSIN3-histone deacetylase complex to the pocket of retinoblastoma tumor suppressor family proteins found in limited discrete regions of the nucleus at growth arrest. *Mol Cell Biol* **21**, 2918-32 (2001).
275. Lai, A. et al. RBP1 recruits both histone deacetylase-dependent and -independent repression activities to retinoblastoma family proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 6632-41 (1999).
276. Zhang, H.S. et al. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**, 79-89 (2000).
277. Dowdy, S.F. et al. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* **73**, 499-511 (1993).
278. Ewen, M.E. et al. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* **73**, 487-97 (1993).
279. Trimarchi, J.M. & Lees, J.A. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 11-20 (2002).
280. Dyson, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**, 2245-62 (1998).
281. Helin, K. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* **8**, 28-35 (1998).
282. Bandara, L.R., Buck, V.M., Zamanian, M., Johnston, L.H. & La Thangue, N.B. Functional synergy between DP-1 and E2F-1 in the cell cycle-regulating transcription factor DRTF1/E2F. *Embo J* **12**, 4317-24 (1993).
283. Helin, K. et al. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev* **7**, 1850-61 (1993).
284. Krek, W., Livingston, D.M. & Shirodkar, S. Binding to DNA and the retinoblastoma gene product promoted by complex formation of different E2F family members. *Science* **262**, 1557-60 (1993).
285. Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J. & Helin, K. Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol* **16**, 1047-57 (1996).

286. Mann, D.J. & Jones, N.C. E2F-1 but not E2F-4 can overcome p16-induced G1 cell-cycle arrest. *Curr Biol* **6**, 474-83 (1996).
287. Schwarz, J.K. et al. Expression of the E2F1 transcription factor overcomes type beta transforming growth factor-mediated growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 483-7 (1995).
288. DeGregori, J., Kowalik, T. & Nevins, J.R. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* **15**, 4215-24 (1995).
289. DeGregori, J., Leone, G., Ohtani, K., Miron, A. & Nevins, J.R. E2F-1 accumulation bypasses a G1 arrest resulting from the inhibition of G1 cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev* **9**, 2873-87 (1995).
290. Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D. & Nevins, J.R. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**, 349-52 (1993).
291. Pierce, A.M., Fisher, S.M., Conti, C.J. & Johnson, D.G. Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development. *Oncogene* **16**, 1267-76 (1998).
292. Wu, L. et al. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**, 457-62 (2001).
293. Wang, D., Russell, J.L. & Johnson, D.G. E2F4 and E2F1 have similar proliferative properties but different apoptotic and oncogenic properties in vivo. *Mol Cell Biol* **20**, 3417-24 (2000).
294. Pierce, A.M., Schneider-Broussard, R., Philhower, J.L. & Johnson, D.G. Differential activities of E2F family members: unique functions in regulating transcription. *Mol Carcinog* **22**, 190-8 (1998).
295. Zwicker, J. & Muller, R. Cell-cycle regulation of gene expression by transcriptional repression. *Trends Genet* **13**, 3-6 (1997).
296. Muller, H. et al. Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Mol Cell Biol* **17**, 5508-20 (1997).
297. Ikeda, M.A., Jakoi, L. & Nevins, J.R. A unique role for the Rb protein in controlling E2F accumulation during cell growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3215-20 (1996).
298. Mundle, S.D. & Saberwal, G. Evolving intricacies and implications of E2F1 regulation. *Faseb J* **17**, 569-74 (2003).
299. Furukawa, Y., Terui, Y., Sakoe, K., Ohta, M. & Saito, M. The role of cellular transcription factor E2F in the regulation of cdc2 mRNA expression and cell cycle control of human hematopoietic cells. *J Biol Chem* **269**, 26249-58 (1994).
300. Schulze, A. et al. Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11264-8 (1995).
301. Tommasi, S. & Pfeifer, G.P. In vivo structure of the human cdc2 promoter: release of a p130-E2F-4 complex from sequences immediately upstream of the transcription initiation site coincides with induction of cdc2 expression. *Mol Cell Biol* **15**, 6901-13 (1995).
302. Duronio, R.J. & O'Farrell, P.H. Developmental control of the G1 to S transition in Drosophila: cyclin Eis a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev* **9**, 1456-68 (1995).

303. Lukas, J. et al. Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway. *Genes Dev* **11**, 1479-92 (1997).
304. Leng, X., Connell-Crowley, L., Goodrich, D. & Harper, J.W. S-Phase entry upon ectopic expression of G1 cyclin-dependent kinases in the absence of retinoblastoma protein phosphorylation. *Curr Biol* **7**, 709-12 (1997).
305. Hinds, P.W. et al. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **70**, 993-1006 (1992).
306. Dulic, V., Lees, E. & Reed, S.I. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science* **257**, 1958-61 (1992).
307. Koff, A. et al. Formation and activation of a cyclin E-cdk2 complex during the G1 phase of the human cell cycle. *Science* **257**, 1689-94 (1992).
308. Lew, D.J., Dulic, V. & Reed, S.I. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast. *Cell* **66**, 1197-206 (1991).
309. Koff, A. et al. Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* **66**, 1217-28 (1991).
310. De Bondt, H.L. et al. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**, 595-602 (1993).
311. Jeffrey, P.D. et al. Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**, 313-20 (1995).
312. Russell, P. & Nurse, P. Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* **49**, 559-67 (1987).
313. Russell, P. & Nurse, P. *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**, 145-53 (1986).
314. Lundberg, A.S. & Weinberg, R.A. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**, 753-61 (1998).
315. Magnaghi-Jaulin, L. et al. Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase. *Nature* **391**, 601-5 (1998).
316. Luo, R.X., Postigo, A.A. & Dean, D.C. Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Cell* **92**, 463-73 (1998).
317. Brehm, A. et al. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* **391**, 597-601 (1998).
318. Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A. & Dean, D.C. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**, 859-69 (1999).
319. Weinberg, R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-30 (1995).
320. Singer, J.D., Gurian-West, M., Clurman, B. & Roberts, J.M. Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev* **13**, 2375-87 (1999).
321. Clurman, B.E., Sheaff, R.J., Thress, K., Groudine, M. & Roberts, J.M. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* **10**, 1979-90 (1996).
322. Welcker, M. et al. Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3 controls cyclin E degradation. *Mol Cell* **12**, 381-92 (2003).

323. Koepp, D.M. et al. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* **294**, 173-7 (2001).
324. Moberg, K.H., Bell, D.W., Wahrer, D.C., Haber, D.A. & Hariharan, I.K. Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* **413**, 311-6 (2001).
325. Strohmaier, H. et al. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* **413**, 316-22 (2001).
326. Feldman, R.M., Correll, C.C., Kaplan, K.B. & Deshaies, R.J. A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**, 221-30 (1997).
327. Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J. & Harper, J.W. F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**, 209-19 (1997).
328. Minshull, J., Golsteyn, R., Hill, C.S. & Hunt, T. The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *Embo J* **9**, 2865-75 (1990).
329. Pines, J. & Hunter, T. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**, 760-3 (1990).
330. Huet, X., Rech, J., Plet, A., Vie, A. & Blanchard, J.M. Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle. *Mol Cell Biol* **16**, 3789-98 (1996).
331. Desdouets, C. et al. Cell cycle regulation of cyclin A gene expression by the cyclic AMP-responsive transcription factors CREB and CREM. *Mol Cell Biol* **15**, 3301-9 (1995).
332. Maity, A., McKenna, W.G. & Muschel, R.J. Cyclin A message stability varies with the cell cycle. *Cell Growth Differ* **8**, 311-8 (1997).
333. Murray, A. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* **81**, 149-52 (1995).
334. Tin Su, T. Cell cycle: how, when and why cells get rid of cyclin A. *Curr Biol* **11**, R467-9 (2001).
335. Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A. & Lamb, N.J. Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67**, 1169-79 (1991).
336. Lehner, C.F. & O'Farrell, P.H. The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell* **61**, 535-47 (1990).
337. Rosenblatt, J., Gu, Y. & Morgan, D.O. Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2824-8 (1992).
338. Fang, F. & Newport, J.W. Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* **66**, 731-42 (1991).
339. Th'ng, J.P. et al. The FT210 cell line is a mouse G2 phase mutant with a temperature-sensitive CDC2 gene product. *Cell* **63**, 313-24 (1990).
340. Hall, F.L. et al. Two potentially oncogenic cyclins, cyclin A and cyclin D1, share common properties of subunit configuration, tyrosine phosphorylation and physical association with the Rb protein. *Oncogene* **8**, 1377-84 (1993).

341. Kitagawa, M. et al. Phosphorylation of E2F-1 by cyclin A-cdk2. *Oncogene* **10**, 229-36 (1995).
342. Krek, W., Xu, G. & Livingston, D.M. Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint. *Cell* **83**, 1149-58 (1995).
343. Krek, W. et al. Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* **78**, 161-72 (1994).
344. Dynlacht, B.D., Flores, O., Lees, J.A. & Harlow, E. Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev* **8**, 1772-86 (1994).
345. Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S. & Piwnicka-Worms, H. Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol Cell Biol* **14**, 8420-31 (1994).
346. Rogatsky, I., Trowbridge, J.M. & Garabedian, M.J. Potentiation of human estrogen receptor alpha transcriptional activation through phosphorylation of serines 104 and 106 by the cyclin A-CDK2 complex. *J Biol Chem* **274**, 22296-302 (1999).
347. Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M. & Krek, W. Interaction between ubiquitin-protein ligase SCF^{SKP2} and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat Cell Biol* **1**, 14-9 (1999).
348. Bates, S. et al. p14^{ARF} links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**, 124-5 (1998).
349. Peeper, D.S. et al. A- and B-type cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *Embo J* **12**, 1947-54 (1993).
350. Knudsen, E.S., Buckmaster, C., Chen, T.T., Feramisco, J.R. & Wang, J.Y. Inhibition of DNA synthesis by RB: effects on G1/S transition and S-phase progression. *Genes Dev* **12**, 2278-92 (1998).
351. Philips, A. et al. The retinoblastoma protein is essential for cyclin A repression in quiescent cells. *Oncogene* **16**, 1373-81 (1998).
352. Dalton, S. Cell cycle regulation of the human cdc2 gene. *Embo J* **11**, 1797-804 (1992).
353. Lee, M. & Nurse, P. Cell cycle control genes in fission yeast and mammalian cells. *Trends Genet* **4**, 287-90 (1988).
354. Lohka, M.J., Hayes, M.K. & Maller, J.L. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 3009-13 (1988).
355. Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P. & Maller, J. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+. *Cell* **54**, 433-9 (1988).
356. Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L. & Beach, D. cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* **55**, 371-8 (1988).
357. Dunphy, W.G., Brizuela, L., Beach, D. & Newport, J. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* **54**, 423-31 (1988).

358. Labbe, J.C. et al. MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *Embo J* **8**, 3053-8 (1989).
359. Gautier, J. et al. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* **60**, 487-94 (1990).
360. Pines, J. & Hunter, T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2. *Cell* **58**, 833-46 (1989).
361. Draetta, G.F. Cell cycle: will the real Cdk-activating kinase please stand up. *Curr Biol* **7**, R50-2 (1997).
362. Gould, K.L. & Nurse, P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**, 39-45 (1989).
363. Norbury, C., Blow, J. & Nurse, P. Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *Embo J* **10**, 3321-9 (1991).
364. McGowan, C.H. & Russell, P. Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *Embo J* **12**, 75-85 (1993).
365. Booher, R.N., Holman, P.S. & Fattaey, A. Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J Biol Chem* **272**, 22300-6 (1997).
366. Parker, L.L. et al. Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner. *Embo J* **10**, 1255-63 (1991).
367. Lundgren, K. et al. mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64**, 1111-22 (1991).
368. Atherton-Fessler, S., Parker, L.L., Geahlen, R.L. & Piwnicka-Worms, H. Mechanisms of p34cdc2 regulation. *Mol Cell Biol* **13**, 1675-85 (1993).
369. Strausfeld, U. et al. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* **351**, 242-5 (1991).
370. Gautier, J., Solomon, M.J., Booher, R.N., Bazan, J.F. & Kirschner, M.W. cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* **67**, 197-211 (1991).
371. Kumagai, A. & Dunphy, W.G. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* **64**, 903-14 (1991).
372. Hoffmann, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E. & Draetta, G. Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *Embo J* **12**, 53-63 (1993).
373. Kumagai, A. & Dunphy, W.G. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* **70**, 139-51 (1992).
374. Elledge, S.J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664-72 (1996).
375. Hartwell, L.H. & Kastan, M.B. Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-8 (1994).
376. Boyd, S.D., Tsai, K.Y. & Jacks, T. An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol* **2**, 563-8 (2000).
377. Geyer, R.K., Yu, Z.K. & Maki, C.G. The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat Cell Biol* **2**, 569-73 (2000).

378. Hsieh, J.K. et al. RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol Cell* **3**, 181-93 (1999).
379. Sharp, D.A., Kratowicz, S.A., Sank, M.J. & George, D.L. Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J Biol Chem* **274**, 38189-96 (1999).
380. Zhang, Y. & Xiong, Y. Mutations in human ARF exon 2 disrupt its nucleolar localization and impair its ability to block nuclear export of MDM2 and p53. *Mol Cell* **3**, 579-91 (1999).
381. Fuchs, S.Y. et al. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev* **12**, 2658-63 (1998).
382. Vousden, K.H. & Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* **2**, 594-604 (2002).
383. Toyoshima, H. & Hunter, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**, 67-74 (1994).
384. Matsuoka, S. et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* **9**, 650-62 (1995).
385. Xiong, Y. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-4 (1993).
386. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S.J. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-16 (1993).
387. Dulic, V. et al. p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**, 1013-23 (1994).
388. Harper, J.W. et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* **6**, 387-400 (1995).
389. Dulic, V., Stein, G.H., Far, D.F. & Reed, S.I. Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol* **18**, 546-57 (1998).
390. Zhang, H., Hannon, G.J. & Beach, D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* **8**, 1750-8 (1994).
391. Malumbres, M. & Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**, 222-31 (2001).
392. Sherr, C.J. & Roberts, J.M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**, 1501-12 (1999).
393. Blain, S.W., Montalvo, E. & Massague, J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem* **272**, 25863-72 (1997).
394. LaBaer, J. et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* **11**, 847-62 (1997).
395. Cheng, M. et al. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* **18**, 1571-83 (1999).
396. Walworth, N.C. Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 697-704 (2000).

397. Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. & Leder, P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675-84 (1995).
398. Serrano, M., Hannon, G.J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704-7 (1993).
399. Lukas, J. et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* **375**, 503-6 (1995).
400. Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. & Sherr, C.J. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**, 993-1000 (1995).
401. Pomerantz, J. et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-23 (1998).
402. Sheikh, M.S. et al. Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. *Oncogene* **9**, 3407-15 (1994).
403. Matsumoto, T. et al. Cell cycle-dependent modulation of promoter activities of RB and WAF1/Cip1 genes. *Jpn J Cancer Res* **89**, 626-33 (1998).
404. Motomura, S., Fukushima, K., Nishitani, H., Nawata, H. & Nishimoto, T. A hamster temperature-sensitive G1 mutant, tsBN250 has a single point mutation in histidyl-tRNA synthetase that inhibits an accumulation of cyclin D1. *Genes Cells* **1**, 1101-12 (1996).
405. Cereseto, A., Washington Parks, R., Rivadeneira, E. & Franchini, G. Limiting amounts of p27Kip1 correlates with constitutive activation of cyclin E-CDK2 complex in HTLV-I-transformed T-cells. *Oncogene* **18**, 2441-50 (1999).
406. Sage, J. et al. Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev* **14**, 3037-50 (2000).
407. Coffey, P.J., Jin, J. & Woodgett, J.R. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J* **335** (Pt 1), 1-13 (1998).
408. Brunet, A. et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* **96**, 857-68 (1999).
409. Tang, E.D., Nunez, G., Barr, F.G. & Guan, K.L. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem* **274**, 16741-6 (1999).
410. Cahill, C.M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling inhibits DAF-16 DNA binding and function via 14-3-3-dependent and 14-3-3-independent pathways. *J Biol Chem* **276**, 13402-10 (2001).
411. Medema, R.H., Kops, G.J., Bos, J.L. & Burgering, B.M. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* **404**, 782-7 (2000).
412. Schmidt, M. et al. Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol* **22**, 7842-52 (2002).
413. Chen, D. et al. Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J Clin Invest* **99**, 2334-41 (1997).

414. Sakai, T. et al. Cell cycle regulator expression after coronary stenting in humans. *Jpn Heart J* **45**, 133-45 (2004).
415. Kearney, M. et al. Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* **95**, 1998-2002 (1997).
416. Abe, J. et al. Suppression of neointimal smooth muscle cell accumulation in vivo by antisense cdc2 and cdk2 oligonucleotides in rat carotid artery. *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 16-24 (1994).
417. Morishita, R. et al. Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides. *J Clin Invest* **93**, 1458-64 (1994).
418. Ueno, H., Yamamoto, H., Ito, S., Li, J.J. & Takeshita, A. Adenovirus-mediated transfer of a dominant-negative H-ras suppresses neointimal formation in balloon-injured arteries in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 898-904 (1997).
419. Indolfi, C. et al. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nat Med* **1**, 541-5 (1995).
420. Winston, J.T., Coats, S.R., Wang, Y.Z. & Pledger, W.J. Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. *Oncogene* **12**, 127-34 (1996).
421. Aktas, H., Cai, H. & Cooper, G.M. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* **17**, 3850-7 (1997).
422. Kerkhoff, E. & Rapp, U.R. Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. *Mol Cell Biol* **17**, 2576-86 (1997).
423. Leone, G., DeGregori, J., Sears, R., Jakoi, L. & Nevins, J.R. Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F. *Nature* **387**, 422-6 (1997).
424. Lloyd, A.C. et al. Cooperating oncogenes converge to regulate cyclin/cdk complexes. *Genes Dev* **11**, 663-77 (1997).
425. Peeper, D.S. et al. Ras signalling linked to the cell-cycle machinery by the retinoblastoma protein. *Nature* **386**, 177-81 (1997).
426. Zou, X., Rudchenko, S., Wong, K. & Calame, K. Induction of c-myc transcription by the v-Abl tyrosine kinase requires Ras, Raf1, and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* **11**, 654-62 (1997).
427. Chang, M.W., Barr, E., Lu, M.M., Barton, K. & Leiden, J.M. Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty. *J Clin Invest* **96**, 2260-8 (1995).
428. Yang, Z.Y. et al. Role of the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferation in response to arterial injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7905-10 (1996).
429. Ueno, H. et al. Adenovirus-mediated transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor-p21 suppresses neointimal formation in the balloon-injured rat carotid arteries in vivo. *Ann N Y Acad Sci* **811**, 401-11 (1997).
430. Vaux, D.L., Haecker, G. & Strasser, A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* **76**, 777-9 (1994).

431. Santos, B.C., Chevaile, A., Hebert, M.J., Zagajeski, J. & Gullans, S.R. A combination of NaCl and urea enhances survival of IMCD cells to hyperosmolality. *Am J Physiol* **274**, F1167-73 (1998).
432. Raymond, M.A., Vigneault, N., Luyckx, V. & Hébert, M.J. Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* **291**, 261-269 (2002).
433. Hebert, M.J., Gullans, S.R., Mackenzie, H.S. & Brady, H.R. Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1beta-dependent paracrine loop. *Am J Pathol* **152**, 523-32 (1998).
434. Raymond, M.A. et al. Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *Faseb J* **17**, 515-7 (2003).
435. Braylan, R.C., Benson, N.A., Nourse, V. & Kruth, H.S. Correlated analysis of cellular DNA, membrane antigens and light scatter of human lymphoid cells. *Cytometry* **2**, 337-43 (1982).
436. Schonbeck, U. et al. Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase-1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta. *J Biol Chem* **272**, 19569-74 (1997).
437. Raymond, M.A. et al. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *Faseb J* **18**, 705-7 (2004).
438. Zetterberg, A. & Larsson, O. Kinetic analysis of regulatory events in G1 leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 5365-9 (1985).
439. Chen, D.J. & Wang, R.J. Cell division cycle in mammalian cells. VIII. Mapping of G1 into six segments using temperature-sensitive cell cycle mutants. *Exp Cell Res* **155**, 549-56 (1984).
440. Chai, W. et al. The effects of glucose, insulin and oxidized low density lipoprotein on apoptosis in vascular endothelial cells. *Chin Med J (Engl)* **113**, 903-6 (2000).
441. Du, X.L. et al. Introduction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia* **41**, 249-56 (1998).
442. Baumgartner-Parzer, S.M. et al. High-glucose--triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* **44**, 1323-7 (1995).
443. Taraseviciene-Stewart, L. et al. A bradykinin antagonist and a caspase inhibitor prevent severe pulmonary hypertension in a rat model. *Can J Physiol Pharmacol* **80**, 269-74 (2002).
444. Vega, F., Panizo, A., Pardo-Mindan, J. & Diez, J. Susceptibility to apoptosis measured by MYC, BCL-2, and BAX expression in arterioles and capillaries of adult spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* **12**, 815-20 (1999).
445. Gobe, G. et al. Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced microvascular rarefaction. *J Struct Biol* **118**, 63-72 (1997).
446. Karnovsky, M.J. Endothelial--vascular smooth muscle cell interactions. Rous-Whipple Award Lecture. *Am J Pathol* **105**, 200-6 (1981).

447. Kastan, M.B. P53: a determinant of the cell cycle response to DNA damage. *Adv Exp Med Biol* **339**, 291-3; discussion 295-6 (1993).
448. Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Craig, R.W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**, 6304-11 (1991).
449. Long, X. et al. p53 and the hypoxia-induced apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* **99**, 2635-43 (1997).
450. Amellem, O., Stokke, T., Sandvik, J.A., Smedshammer, L. & Pettersen, E.O. Hypoxia-induced apoptosis in human cells with normal p53 status and function, without any alteration in the nuclear protein level. *Exp Cell Res* **232**, 361-70 (1997).
451. Graeber, T.G. et al. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* **14**, 6264-77 (1994).
452. Kinscherf, R. et al. Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent. *Faseb J* **12**, 461-7 (1998).
453. Heinloth, A., Brune, B., Fischer, B. & Galle, J. Nitric oxide prevents oxidised LDL-induced p53 accumulation, cytochrome c translocation, and apoptosis in macrophages via guanylate cyclase stimulation. *Atherosclerosis* **162**, 93-101 (2002).
454. Maziere, C., Meignotte, A., Dantin, F., Conte, M.A. & Maziere, J.C. Oxidized LDL induces an oxidative stress and activates the tumor suppressor p53 in MRC5 human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 718-23 (2000).
455. Fiordaliso, F. et al. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* **50**, 2363-75 (2001).
456. Keim, A.L., Chi, M.M. & Moley, K.H. Hyperglycemia-induced apoptotic cell death in the mouse blastocyst is dependent on expression of p53. *Mol Reprod Dev* **60**, 214-24 (2001).
457. Leri, A. et al. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J Clin Invest* **101**, 1326-42 (1998).
458. Pierzchalski, P. et al. p53 Induces myocyte apoptosis via the activation of the renin-angiotensin system. *Exp Cell Res* **234**, 57-65 (1997).
459. Leri, A. et al. Inhibition of p53 function prevents renin-angiotensin system activation and stretch-mediated myocyte apoptosis. *Am J Pathol* **157**, 843-57 (2000).
460. Inoue, R., Asker, C., Klangby, U., Pisa, P. & Wiman, K.G. Induction of the human ARF protein by serum starvation. *Anticancer Res* **19**, 2939-43 (1999).
461. Hasan, N.M., Adams, G.E. & Joiner, M.C. Effect of serum starvation on expression and phosphorylation of PKC-alpha and p53 in V79 cells: implications for cell death. *Int J Cancer* **80**, 400-5 (1999).
462. Sriram, V. & Patterson, C. Cell cycle in vasculoproliferative diseases: potential interventions and routes of delivery. *Circulation* **103**, 2414-9 (2001).
463. Choi, K.S., Lim, I.K., Brady, J.N. & Kim, S.J. ICE-like protease (caspase) is involved in transforming growth factor beta1-mediated apoptosis in FaO rat hepatoma cell line. *Hepatology* **27**, 415-21 (1998).

464. Garcia-Calvo, M. et al. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* **273**, 32608-13 (1998).
465. Benitz, W.E. & Bernfield, M. Endothelial cell proteoglycans: possible mediators of vascular responses to injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2**, 407-8 (1990).
466. Fillinger, M.F., O'Connor, S.E., Wagner, R.J. & Cronenwett, J.L. The effect of endothelial cell coculture on smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Surg* **17**, 1058-67; discussion 1067-8 (1993).
467. Peiro, C. et al. Influence of endothelium on cultured vascular smooth muscle cell proliferation. *Hypertension* **25**, 748-51 (1995).
468. Xu, C.B., Stavenow, L. & Pessah-Rasmussen, H. Interactions between cultured bovine arterial endothelial and smooth muscle cells; further studies on the effects of injury and modification of the consequences of injury. *Artery* **20**, 163-79 (1993).
469. Mayr, U. et al. Loss of p53 accelerates neointimal lesions of vein bypass grafts in mice. *Circ Res* **90**, 197-204 (2002).
470. Oniscu, A., Sphyris, N., Morris, R.G., Bader, S. & Harrison, D.J. p73alpha is a candidate effector in the p53 independent apoptosis pathway of cisplatin damaged primary murine colonocytes. *J Clin Pathol* **57**, 492-8 (2004).
471. Sowa, Y. et al. Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Ann N Y Acad Sci* **886**, 195-9 (1999).
472. Smith, R.C. et al. Adenoviral constructs encoding phosphorylation-competent full-length and truncated forms of the human retinoblastoma protein inhibit myocyte proliferation and neointima formation. *Circulation* **96**, 1899-905 (1997).
473. Kyriakis, J.M. & Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807-69 (2001).
474. Shichiri, M., Yokokura, M., Marumo, F. & Hirata, Y. Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP kinase pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 989-97 (2000).
475. Hu, Y., Dietrich, H., Metzler, B., Wick, G. & Xu, Q. Hyperexpression and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 18-26 (2000).
476. Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. & Tamaoki, T. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* **159**, 548-53 (1989).
477. Tamaoki, T. & Nakano, H. Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Biotechnology (N Y)* **8**, 732-5 (1990).
478. Bruns, R.F. et al. Inhibition of protein kinase C by calphostin C is light-dependent. *Biochem Biophys Res Commun* **176**, 288-93 (1991).
479. Gopalakrishna, R., Chen, Z.H. & Gundimeda, U. Irreversible oxidative inactivation of protein kinase C by photosensitive inhibitor calphostin C. *FEBS Lett* **314**, 149-54 (1992).

480. Nishizuka, Y. Studies and perspectives of the protein kinase c family for cellular regulation. *Cancer* **63**, 1892-903 (1989).
481. Behn-Krappa, A. & Newton, A.C. The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr Biol* **9**, 728-37 (1999).
482. Chou, M.M. et al. Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr Biol* **8**, 1069-77 (1998).
483. Dutil, E.M. & Newton, A.C. Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J Biol Chem* **275**, 10697-701 (2000).
484. Dutil, E.M., Toker, A. & Newton, A.C. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol* **8**, 1366-75 (1998).
485. Le Good, J.A. et al. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* **281**, 2042-5 (1998).
486. Dempsey, E.C. et al. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L429-38 (2000).
487. Das, M., Stenmark, K.R., Ruff, L.J. & Dempsey, E.C. Selected isozymes of PKC contribute to augmented growth of fetal and neonatal bovine PA adventitial fibroblasts. *Am J Physiol* **273**, L1276-84 (1997).
488. Dempsey, E.C., Badesch, D.B., Dobyns, E.L. & Stenmark, K.R. Enhanced growth capacity of neonatal pulmonary artery smooth muscle cells in vitro: dependence on cell size, time from birth, insulin-like growth factor I, and auto-activation of protein kinase C. *J Cell Physiol* **160**, 469-81 (1994).
489. Dempsey, E.C., McMurtry, I.F. & O'Brien, R.F. Protein kinase C activation allows pulmonary artery smooth muscle cells to proliferate to hypoxia. *Am J Physiol* **260**, L136-45 (1991).
490. Harrington, E.O. et al. Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells. *J Biol Chem* **272**, 7390-7 (1997).
491. Lew, D.B., Brown, E.R., Dempsey, B.K., Wright, H.M. & Malik, K.U. Contribution of PKC to beta-hexosaminidase-induced airway smooth muscle proliferation. *Am J Physiol* **272**, L639-43 (1997).
492. Hug, H. & Sarre, T.F. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* **291** (Pt 2), 329-43 (1993).
493. Jaken, S. Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 168-73 (1996).
494. Johannes, F.J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P. & Pfizenmaier, K. PKCu is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem* **269**, 6140-8 (1994).
495. Ping, P. et al. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res* **81**, 404-14 (1997).
496. Speechly-Dick, M.E., Mocanu, M.M. & Yellon, D.M. Protein kinase C. Its role in ischemic preconditioning in the rat. *Circ Res* **75**, 586-90 (1994).

497. Gray, M.O., Karliner, J.S. & Mochly-Rosen, D. A selective epsilon-protein kinase C antagonist inhibits protection of cardiac myocytes from hypoxia-induced cell death. *J Biol Chem* **272**, 30945-51 (1997).
498. Dorn, G.W., 2nd et al. Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12798-803 (1999).
499. Gluckman, P.D. et al. Asphyxial brain injury--the role of the IGF system. *Mol Cell Endocrinol* **140**, 95-9 (1998).
500. Mooney, A., Jobson, T., Bcon, R., Kitamura, M. & Savill, J. Cytokines promote glomerular mesangial cell survival in vitro by stimulus -dependent inhibition of apoptosis. *J Immunol* **159**, 3949-3960 (1997).
501. Cohen, I.R., Grassel, S., Murdoch, A.D. & Iozzo, R.V. Structural characterization of the complete human perlecan gene and its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10404-8 (1993).
502. Kallunki, P. & Tryggvason, K. Human basement membrane heparan sulfate proteoglycan core protein: a 467-kD protein containing multiple domains resembling elements of the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Cell Biol* **116**, 559-71 (1992).
503. Mongiat, M., Sweeney, S.M., San Antonio, J.D., Fu, J. & Iozzo, R.V. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem* **278**, 4238-49 (2003).
504. Kalluri, R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 422-33 (2003).
505. Iozzo, R.V. & San Antonio, J.D. Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* **108**, 349-55 (2001).
506. Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* **407**, 789-795 (2000).
507. Tao, Z., Smart, F.W., Figueroa, J.E., Glancy, D.L. & Vijayagopal, P. Elevated expression of proteoglycans in proliferating vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **135**, 171-9 (1997).
508. Moiseeva, E.P. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc Res* **52**, 372-86 (2001).
509. Raines, E.W., Koyama, H. & Carragher, N.O. The extracellular matrix dynamically regulates smooth muscle cell responsiveness to PDGF. *Ann N Y Acad Sci* **902**, 39-51; discussion 51-2 (2000).
510. Snyder, S., Coodley, E.L., Durham, B.C. & Pennock, R.S. Serum glycoproteins in coronary artery disease. *Circulation* **56**, 359-62 (1977).
511. Cooke, N.E. & Haddad, J.G. Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocr Rev* **10**, 294-307 (1989).
512. Cooke, N.E.a.H., J.G. *Vitamin D*, (Academic Press, 1997).
513. Van Baelen, H., Bouillon, R. & De Moor, P. Vitamin D-binding protein (Gc-globulin) binds actin. *J Biol Chem* **255**, 2270-2 (1980).
514. Haddad, J.G., Harper, K.D., Guoth, M., Pietra, G.G. & Sanger, J.W. Angiopathic consequences of saturating the plasma scavenger system for actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1381-5 (1990).

515. Yamamoto, N. & Naraparaju, V.R. Vitamin D3-binding protein as a precursor for macrophage activating factor in the inflammation-primed macrophage activation cascade in rats. *Cell Immunol* **170**, 161-7 (1996).
516. Yamamoto, N. & Kumashiro, R. Conversion of vitamin D3 binding protein (group-specific component) to a macrophage activating factor by the stepwise action of beta-galactosidase of B cells and sialidase of T cells. *J Immunol* **151**, 2794-802 (1993).
517. DiMartino, S.J. & Kew, R.R. Initial characterization of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) binding site on the neutrophil plasma membrane: evidence for a chondroitin sulfate proteoglycan. *J Immunol* **163**, 2135-42 (1999).