

Université de Montréal

**La fibrose en deux parties :  
de la paille à la souris**

par  
Patrick Laplante

Programme de Biologie Moléculaire  
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Ph.D.  
en Biologie Moléculaire

Mars 2009

© Patrick Laplante, 2009

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

cette thèse intitulée :  
**La fibrose en deux parties :  
de la paille à la souris**

présentée par :  
Patrick Laplante

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Richard Bertrand, président-rapporteur

Marie-Josée Hébert, directeur de recherche

Yves Berthiaume, membre du jury

Jacques Huot, examinateur externe

## RÉSUMÉ

L'apoptose des cellules endothéliales (CE) représente un évènement initial dans le développement de plusieurs pathologies fibrotiques telles que le rejet chronique d'allogreffe et la sclérose systémique. Nous avons démontré que les médiateurs issus des CE apoptotiques entraîne la différenciation myofibroblastique et la résistance à l'apoptose, deux mécanismes centraux à la fibrogénèse. L'activation de PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) caractérise ces deux mécanismes. Un fragment C-terminal du perlécan (LG3) produit par les CE apoptotiques inhibe l'apoptose des fibroblastes. Les objectifs de ce travail étaient de : 1. définir les récepteurs et la signalisation impliqués dans la réponse anti-apoptotique et 2. caractériser les médiateurs fibrogéniques responsables de la différenciation myofibroblastique.

En ce qui a trait à la réponse anti-apoptotique, l'inhibition des intégrines  $\alpha2\beta1$  ou des kinases de la famille Src (SFK) chez les fibroblastes prévient la résistance à l'apoptose et la phosphorylation d'Akt normalement induites par le milieu conditionné par des CE apoptotiques (SSC) ou le LG3. Ces résultats suggèrent que le LG3 produit par les CE apoptotiques initie un état de résistance à l'apoptose chez les fibroblastes par des voies  $\alpha2\beta1$ intégrines/SFK/PI3K dépendantes. Le LG3 n'induit cependant pas la différenciation myofibroblastique. Nous avons donc caractérisé le milieu SSC de façon à identifier les médiateurs responsables de la différenciation myofibroblastique.

Les milieux conditionnés par des CE apoptotiques et non-apoptotiques (respectivement SSC et SSC-ZVAD) ont été analysés comparativement par chromatographie liquide bi-dimensionnelle, immunobuvardage et spectrométrie de masse. Le connective tissue growth factor (CTGF) est le seul facteur fibrogénique connu augmenté dans le milieu SSC. L'inhibition de la caspase-3 chez les CE prévient la relâche de CTGF. Au niveau du fibroblaste, l'inhibition de SFK ou de Pyk2 (proline-rich tyrosine kinase-2) prévient la différenciation myofibroblastique induite par le SSC ou le CTGF *in vitro*. L'anticorps neutralisant contre le TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) n'est pas en mesure de bloquer la différenciation myofibroblastique induite par le SSC ou le CTGF. Des injections quotidiennes sous-cutanées de SSC chez la souris C3H pour 3 semaines entraîne une augmentation de l'épaisseur de la peau et des niveaux protéiques d' $\alpha$ SMA, de vimentine et de collagène I. Cette réponse fibrogénique est réduite chez les souris qui ont reçu le SSC-ZVAD ou le SSC immunodéplété de son CTGF.

Ces résultats apportent de nouvelles issues mécanistiques au niveau de la réponse fibrogénique activée par la mort des CE. L'activation des caspases chez les CE apoptotiques entraîne la production de LG3 et de CTGF qui, à leur tour, activent des voies de signalisation pro-fibrotiques SFK/PI3K dépendantes chez les fibroblastes, et ce indépendamment du TGF- $\beta$ .

**Mots clés :** apoptose, différenciation, cellule endothéliale, fibroblaste, myofibroblaste, CTGF, perlécan, Pyk2, Src, PI3K

## ABSTRACT

Apoptosis of endothelial cells (EC) is an early event in various fibrotic diseases including chronic allograft vasculopathy and systemic sclerosis. We showed previously that mediators released by apoptotic EC activate myofibroblast differentiation and resistance to apoptosis, two mechanisms pivotal to fibrogenesis. PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) activation was found to be central to these two mechanisms. A C-terminal fragment of perlecan (LG3) produced by apoptotic EC was found to inhibit apoptosis of fibroblasts. The aims of the present project were :

1. to define the receptors and pathways implicated in this anti-apoptotic response and
2. to characterize the fibrogenic mediators implicated in myofibroblast differentiation.

Concerning the anti-apoptotic response, the inhibition of  $\alpha 2\beta 1$  integrin activity in fibroblasts exposed to either medium conditioned by apoptotic EC (SSC) or LG3 prevented resistance to apoptosis and was associated with decreased levels of Akt phosphorylation. Neutralizing Src family kinases (SFK) activity in fibroblasts produced the same effects. These results suggest that LG3 produced by apoptotic EC initiate a state of resistance to apoptosis in fibroblasts via an  $\alpha 2\beta 1$  integrin/SFK/PI3K dependent pathway. LG3 did not induce myofibroblast differentiation. We went on to identify which mediators present in SSC are implicated in myofibroblast differentiation.

Media conditioned by apoptotic and non-apoptotic EC (respectively SSC and SSC-ZVAD) were analyzed comparatively by 2-dimension liquid chromatography, western blotting and mass spectrometry. Connective tissue growth factor (CTGF) was the only known fibrogenic factor increased in SSC. Caspase-3 silencing of EC demonstrated that CTGF is released by apoptotic EC downstream of caspase-3 activation. In fibroblasts, blocking the activation of SFK or silencing the proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) blocked myofibroblast differentiation triggered by either SSC or recombinant CTGF *in vitro*. Exposure to a pan-transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) neutralizing antibody failed to attenuate myofibroblast differentiation in fibroblasts exposed to either SSC or CTGF. Subcutaneous injection of mouse SSC to C3H mice daily for three weeks led to increased skin thickness, increased protein levels of  $\alpha$ SMA, vimentin and collagen I. This fibrogenic response was blunted in mice injected with either SSC-ZVAD or SSC immunodepleted of CTGF.

These results bring new mechanistic insights into the fibrogenic pathways activated by EC death. Caspase activation in apoptotic EC triggers the production of LG3 and CTGF which in turn activate SFK/PI3K dependant pathways in fibroblasts thus activating a TGF- $\beta$ -independent fibrogenic response.

**Key words :** apoptosis, differentiation, endothelial cell, fibroblast, myofibroblast, CTGF, perlecan, Pyk2, Src, PI3K.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b>	III
<b>ABSTRACT</b>	V
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	VII
<b>LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES</b>	X
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	XII
<b>1. INTRODUCTION</b>	
1.1. MORT CELLULAIRE PROGRAMMÉE	2
1.1.1. Aperçu	2
1.1.2. Apoptose	3
1.1.2.1. Caspases	4
1.1.2.2. Famille Bcl-2	6
1.1.2.3. Voie intrinsèque	9
1.1.2.4. Voie extrinsèque	12
1.1.3. Mort cellulaire programmée non-apoptotique	14
1.2. FIBROSE	20
1.2.1. Aperçu	20
1.2.2. Fibroblaste	23
1.2.3. Myofibroblaste	24
1.2.3.1. Caractéristiques	27
1.2.3.2. Fonctions	29

1.2.3.3. Mécanismes de différenciation	30
1.2.4. Pathologies classiques	33
1.2.4.1. Sclérose systémique	34
1.2.4.1.1. Modèles murins	37
1.2.4.2. Rejet chronique d'allogreffe	39
1.2.4.3. Graft versus Host Disease	41
1.2.5. Endothélium et membrane basale	42
1.2.5.1. Perlécan	44
1.2.5.2. Connective tissue growth factor	48
<b>1.3 INTERACTIONS CELLULE-MATRICE EXTRACELLULAIRE</b>	<b>52</b>
1.3.1. Aperçu	52
1.3.2. Matrice extracellulaire	53
1.3.2.1. Transforming growth factor beta-1	57
1.3.3. Intégrines	59
1.3.3.1. Focal adhesion kinase / Proline rich tyrosine kinase 2	61
1.3.3.2. Src family kinase	64
1.3.3.3. Phosphatidylinositol-3 kinase	65
1.3.4. Signalisation versus apoptose	68
1.3.5. Signalisation versus différenciation myofibroblastique	70
<b>2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS</b>	<b>72</b>
2.1. PRÉMISSSES	73
2.2. HYPOTHÈSE	74



2.3. OBJECTIFS	75
<b>3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX</b>	<b>76</b>
3.1. ARTICLE #1	77
Perlecan proteolysis induces an $\alpha 2\beta 1$ integrin-and Src family kinase-dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of Focal adhesion kinase activation	
3.2. ARTICLE #2	116
Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis	
<b>4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>167</b>
Fibrose	168
Apoptose endothéliale	170
Médiateurs	181
Indépendance du Transforming growth factor beta	186
Signalisation	190
<b>5. CONCLUSION</b>	<b>201</b>
<b>6. RÉFÉRENCES</b>	<b>206</b>
<b>7. ANNEXE</b>	<b>264</b>
Annexe 1. Prolifération des fibroblastes et différenciation myofibroblastique	265

## **LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES**

### **INTRODUCTION**

Figure 1. Schématisation des voies apoptotiques	15
Figure 2. Différenciation myofibroblastique TGF- $\beta$ 1 dépendante	25
Figure 3. Perlécan	46
Figure 4. Connective tissue growth factor	50
Figure 5. Signalisation intégrine dépendante	66

### **RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX (article #1)**

Figure 1. Anti-apoptotic response induced by the third laminin G motif (LG3) of the C-terminal fragment of perlecan	110
Figure 2. Molecular regulation of resistance to apoptosis in fibroblasts exposed to mediators produced by apoptotic EC	111
Figure 3. Mediators produced by apoptotic EC activate a SFK-dependent anti-apoptotic phenotype in fibroblasts	112
Figure 4. FAK activation is dispensable in the development of an anti-apoptotic phenotype	113
Figure 5. $\alpha$ 2 $\beta$ 1 integrin activation leads to a PI3K-dependent anti-apoptotic phenotype in fibroblasts	114
Figure 6. Schematic diagram	115

## **RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX (article #2)**

Figure 1. Apoptosis of EC induces dermal fibrosis	153
Figure 2. Caspase activation in EC induces the release of fibrogenic mediators	154
Figure 3. Caspase-3 activation in EC is required for release of mediators that induce myofibroblast differentiation	155
Figure 4. Importance of SFK and Pyk2 in myofibroblast differentiation induced by SSC	156
Figure 5. Caspase-3 activation triggers the release of active CTGF by apoptotic EC	157
Figure 6. CTGF reproduces the signaling signature of SSC	158
Figure 7. CTGF is a key fibrogenic mediator released by apoptotic EC	159
Figure S1. LG3 does not induce myofibroblast differentiation	163
Figure S2. ZVAD-FMK inhibits apoptosis in serum-starved EC isolated from C3H mice	164
Figure S3. Importance of SFK in myofibroblast differentiation induced by endothelial apoptosis.	165
Figure S4. CTGF induces myofibroblast differentiation in wild-type mouse fibroblasts.	166

## **DISCUSSION**

Figure 6. Schéma récapitulatif	175
--------------------------------	-----

## **ANNEXE**

Annexe 1. Prolifération des fibroblastes et différenciation myofibroblastique	265
---	-----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

$\alpha$ -SMA	: alpha smooth muscle actin
a.a.	: acides aminés
AACE	: anticorps anti-cellule endothéliale
ADN	: acide désoxyribonucléique
AIF	: apoptosis inducing factor
ATM	: ataxia telangiectasia mutated
ATP	: adénosine triphosphate
ATR	: ataxia telangiectasia related
Bcl	: B-cell lymphoma
bFGF	: basic fibroblast growth factor
BH	: homologie de séquence Bcl-2
BIR	: baculovirus IAP repeat
BMP	: bone morphogenetic protein
CAD	: caspase activated DNase
CARD	: caspase activation recruitment domain
CE	: cellule endothéliale
CML	: cellules vasculaires musculaires lisses
CR	: cystein rich
CS	: 4-sulfate de chondroïtine
CT	: cystine knot

CTGF	: connective tissue growth factor
DD	: death domain
DED	: death effector domain
DFP	: DNA fragmentation factor
DNA-PK	: DNA protein kinase
DTR	: diphtheria toxin receptor
EGF	: epidermal growth factor
ELISA	: enzyme-linked immunosorbent assay
endoG	: endonucléase G
ERK	: extracellular signal-regulated kinase
FADD	: Fas associated death domain
FAK	: focal adhesion kinase
FasL	: Fas ligand
FAT	: focal adhesion targeting
FERM	: FAK N-terminal band 4.1, ezrin, radixin, moesin homology domain
FGF	: fibroblast growth factor
FPLC	: fast protein liquid chromatography
GAG	: glycosaminoglycan
GAPDH	: glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GM-CSF	: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GvHD	: graft vs host disease
hbEGF	: heparin binding epidermal growth factor
HS	: sulphate d'héparane

HUVEC	: human umbilical vein endothelial cell
IAP	: inhibitor of apoptosis protein
ICAD	: inhibitor of CAD
ICAM	: molécule d'adhésion intercellulaire
Ig	: immunoglobuline
IGFB	: insulin-like growth factor binding domain
IL	: interleukine
ILK	: integrin-linked kinase
kD	: kiloDaltons
LAP	: latency associated peptide
LC	: liquid chromatography
LDL	: low-density lipoprotein
LG	: laminin type G domain
LLC	: large latent complex
LTBP	: large latent TGF $\beta$ -binding protein
MAPK	: mitogen activated protein kinase
MB	: membrane basale
MCP	: mort cellulaire programmée
MEC	: matrice extracellulaire
MMP	: matrix metalloproteinase
MS	: spectromètre de masse
MT	: microangiopathie thrombotique

mTOR	: mammalian target of rapamycin
NO	: oxyde nitrique
PAI	: plasminogen activator inhibitor
PDGF	: platelet derived growth factor
PDK1	: phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K	: phosphatidylinositol-3 kinase
PIP3	: phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKB	: protein kinase B
PKC	: protein kinase C
PP2	: 4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PP3	: 4-Amino-7-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidine
Pyk2	: proline-rich tyrosine kinase 2
PTEN	: phosphatase and TENsin homolog
RIP	: receptor interacting protein
SBE	: smad-binding element repeats
SFK	: src family kinases
SH	: src homology
siRNA	: short interfering RNA
SLC	: small latent complex
SSc	: sclérose systémique
SSC	: milieu sans sérum conditionné par des CE apoptotiques
TGF- $\beta$	: transforming growth factor beta

Tk	: thymidine kinase
TNF- $\alpha$	: tumour necrosis factor alpha
TSC	: tuberous sclerosis complexe
TSP-1	: thrombospondin type I repeat
VCAM	: molécule d'adhésion cellulaire vasculaire
VEGF	: vascular endothelial growth factor



# **1. INTRODUCTION**

## 1.1. Mort Cellulaire Programmée

### 1.1.1. Aperçu

Depuis plus de deux décennies, la mort cellulaire programmée est considérée comme un phénomène d'élimination cellulaire orchestré et silencieux quant aux perturbations environnementales encourues. Les pages qui suivent vous permettront d'apprécier l'envers de la médaille dans la mesure où la mort cellulaire programmée, au contraire, engendre des perturbations au niveau de son environnement. Depuis la caractérisation de l'apoptose chez *Caenorhabditis elegans* au début des années «90s» (1), les voies de mort cellulaire n'ont fait que se complexifier; autrement dit, nous n'avons qu'éclairci notre compréhension.

La mort cellulaire programmée est un phénomène de suicide cellulaire essentiel au développement, au maintien et à l'intégrité des organismes multicellulaires assurant ainsi l'homéostasie de l'être vivant (2-5). En effet, la mort cellulaire programmée permet d'assurer un équilibre entre les composantes cellulaires d'un tissu/organe en répondant, avec l'aide d'une machinerie moléculaire sophistiquée, à divers stimuli physiologiques, pathogéniques ou cytotoxiques (6). L'équilibre entre la survie et la mort cellulaire permet une régulation du nombre de cellules et un ajustement constant des différents types cellulaires qui composent nos tissus/organes (7). De ce fait, un désordre au niveau des mécanismes contrôlant le suicide cellulaire joue un rôle important dans la pathogénèse d'un grand nombre de maladies (2, 5). À ce jour, plusieurs recherches ont été effectuées de façon à mieux comprendre la régulation moléculaire de ce suicide cellulaire, mais elles en ont aussi démontré la

complexité du fait qu'il existe différentes voies parallèles d'auto-destruction dans une même cellule et ce, en réponse à divers stimuli (2). Par ailleurs, le destin de chaque cellule est soumis aux interactions qu'elle entretient avec les autres cellules de l'organisme, laissant ainsi entrevoir l'existence d'un contrôle social et du coup, d'un système de communication efficace. Ce qui fait de la mort cellulaire programmée un processus complexe et régulé permettant aux êtres vivants multicellulaires une adaptation efficace aux divers changements environnementaux. Il existe plusieurs types de mort cellulaire programmée (4, 8) dont la principale forme est dite apoptotique, soit l'apoptose.

#### 1.1.2. Apoptose

L'apoptose est la forme la plus caractérisée des morts cellulaires programmées et est considérée comme une mort cellulaire silencieuse permettant un retrait des cellules non désirées sans initiation de réaction inflammatoire, limitant ainsi les dommages à l'environnement local (5, 9). Son exécution est caractérisée par des changements morphologiques et biochimiques qui ont été observés pour la première fois par *Kerr et al.* en 1972 où la cellule est décrite pour mourir et disparaître en 3 étapes bien définies : l'engagement, l'exécution et l'élimination de la cellule (10). Aujourd'hui, durant l'apoptose, on observe : condensation du noyau, du cytoplasme et de la chromatine (11), fragmentation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) (5, 12), formation de boursofflures au niveau de la membrane plasmique menant à la formation de corps apoptotique et ce, tout en conservant l'intégrité membranaire (5, 10). Ceux-ci peuvent alors être rapidement reconnus, phagocytés et digérés par les

macrophages ou cellules avoisinantes grâce à l'externalisation des phosphatidylsérines au niveau de la membrane plasmique de la cellule apoptotique, le tout sans réaction inflammatoire (11, 13). L'apoptose est normalement associée à l'activation d'endonucléases qui dégradent l'ADN chromosomique en fragments de 50 à 300 kilobases et subséquemment en plus petits fragments d'environ 180 paires de bases (14, 15). La fragmentation en échelle de l'ADN par les endonucléases est elle-même soumise au contrôle de protéases activées spécialement dans les cellules apoptotiques : les caspases. Celles-ci sont responsables de plusieurs changements morphologiques au niveau de la cellule. Leur activation est cependant soumise à la signalisation hautement régulée des programmes apoptotiques de la cellule pouvant découler principalement de deux voies : la voie intrinsèque (ou mitochondriale) et la voie extrinsèque (ou récepteur de mort) (16-18).

#### 1.1.2.1. Les caspases

Les caspases (*Cysteine ASParyl-specific ProteASES*) ont un rôle clé dans l'exécution cellulaire (19, 20). Elles ont été hautement conservées au cours de l'évolution et peuvent être retrouvées tout aussi bien chez l'humain, la souris ou le nématode *C.Elegans* (19, 21). En plus d'avoir différentes fonctions au niveau des cellules de mammifères, les différentes caspases sont bénéfiques à l'apoptose de par leur redondance et leur homologie de structure (22). La redondance des programmes apoptotiques est, entre autres, assurée par le pouvoir de compensation des caspases. Différents rôles de compensation apoptotique ont d'ailleurs été étudiés à l'aide de souris mutantes pour certaines caspases. Par exemple, la caspase-12 peut compenser

l'absence des caspases-2 et 3 au niveau de cellules germinales tandis que la caspase-2 peut compenser l'absence de la caspase-9 au niveau de cellules neuronales (23, 24). Les caspases jouent un rôle bien actif dans la mort cellulaire, mais elles nécessitent un clivage protéolytique pour être activées. Cette activation est souvent dépendante de l'activité protéolytique intrinsèque des molécules zymogènes (pro-caspases) et ce pour des concentrations permettant une auto-activation (25, 26). Les caspases sont donc constituées d'un pro-domaine de longueur variable en N-terminal suivi d'une sous-unité p20 et d'une sous-unité p10, ces deux dernières étant essentielles à la formation d'un hétérotétramère actif de par leurs sous-unités catalytiques (20, 22, 27, 28). Les caspases errent dans la cellule sous forme de zymogènes inactifs et sont activées par protéolyse au site de clivage spécifique Asp-X (25). La spécificité de la caspase est déterminée par les quatre acides aminés placés en N-terminal du site de clivage (29). La cascade protéolytique menant à la mort cellulaire est caractérisée par l'activation des caspases initiatrices extrinsèques et intrinsèques (respectivement la caspase-8 et la caspase-9) menant à l'activation de caspases effectrices (caspase-3,-6,-7). Jusqu'à ce jour, plus d'une douzaine de caspases ont été identifiées chez les mammifères (11 chez l'homme) dont les deux tiers semblent avoir une fonction dans l'apoptose (19, 20, 22), mais les interactions entre celles-ci sont loin d'être complètement définies.

Les caspases effectrices disposent de plusieurs substrats ayant, une fois spécifiquement reconnus et clivés, diverses influences sur le devenir de la cellule apoptotique (3). Entre autres, on retrouve l'endonucléase responsable de la

fragmentation en échelle de l'ADN, le « DNA fragmentation Factor 40 » (DFF40). L'activation de DFF40 est dépendante du clivage de sa sous-unité inhibitrice DFF45 (30) par la caspase-3 permettant ainsi la formation d'un homo-oligomère actif et la dégradation subséquente de l'ADN chromosomique (30, 31). Par ailleurs, le clivage des lamines nucléaires par les caspases entraînent une réduction et un bourgeonnement du noyau (32, 33). Le clivage de fodrine et de gelsoline, deux protéines du cytosquelette, sont impliquées dans l'externalisation des phosphatidylsérines et la condensation nucléaire (34) tandis que le clivage de PAK2, un membre de la famille des p21-kinases, engendre les boursouffures membranaires observées au niveau des cellules apoptotiques (35). Bien que centrale à l'exécution de l'apoptose, l'activation des caspases est hautement régulée que ce soit au niveau des voies intrinsèques ou extrinsèques par les protéines qui composent ces voies : les une favorisant l'apoptose et les autres favorisant la survie de la cellule. Plusieurs de ces protéines sont regroupées sous la famille des Bcl-2.

#### 1.1.2.2 La famille Bcl-2

La famille des gènes « B-cell lymphoma 2 » (Bcl-2) (36) regroupe plus de 20 membres (5) codant pour diverses protéines qui sont regroupées en trois groupes fonctionnels : anti-apoptotique, pro-apoptotique à multidomains et pro-apoptotique BH3-seul (37, 38). Les membres du groupe I de la famille des Bcl-2 comme Bcl-2, Bcl-X1, Mcl1 possèdent une activité anti-apoptotique et sont caractérisés par un enlèvement de quatre domaines conservés ayant des homologies de séquences Bcl-2 (BH), soient BH1 à BH4 (3). On les retrouve ancrés par leur queue C-terminale riche

en acides aminés hydrophobes au niveau de la surface externe de la mitochondrie (5), occasionnellement au niveau du réticulum endoplasmique (3, 39) et de l'enveloppe nucléaire (39). D'autres membres anti-apoptotiques du groupe I comme A1/Bfl-1 ne possèdent pas le domaine transmembranaire et se retrouvent dans le cytosol (5). Pour en revenir à Bcl-Xl plus spécifiquement, elle est une des protéines anti-apoptotiques les plus caractérisées. Des études de délétion génique (« knockout ») réalisées chez la souris ont montré que la protéine Bcl-Xl est essentielle aux processus anti-apoptotique permettant le bon développement des organes lors de l'embryogénèse (40). Le rôle intrinsèque de Bcl-Xl dans les processus apoptotiques s'établit à la mitochondrie où elle contrôle la stabilité de la membrane mitochondriale de façon à bloquer la sortie du cytochrome c et les mécanismes qui en découlent (41, 42). Bcl-Xl a aussi été répertoriée comme étant capable de bloquer l'activité de la caspase-3 et subséquemment la dégradation des lamines nucléaires (43, 44).

Les membres du groupe II de la famille des Bcl-2 comme Bax et Bak possèdent une activité pro-apoptotique, une ou pas de queue hydrophobe permettant l'insertion membranaire en plus de contenir tous les domaines d'homologie Bcl-2 (BH) à l'exception de BH4 (37, 39). Bax, tout comme Bcl-Xl, est un important régulateur des processus apoptotiques dans plusieurs systèmes cellulaires. Les dommages irréparables subis au niveau de l'ADN, ce dont il sera question dans la prochaine section, entraînent couramment l'activation de p53. Lorsque phosphorylée, p53 migre au noyau et engendre une augmentation de la transcription de la protéine pro-apoptotique Bax (45, 46). Celle-ci sera alors en mesure de se diriger à la

mitochondrie pour favoriser la sortie du cytochrome c, la formation de l'apoptosome et l'induction de l'apoptose. Bax, tout comme Bak, agit au niveau des composantes des canaux mitochondriaux anioniques voltage dépendant (VDAC) affectant ainsi la perméabilité de la membrane mitochondriale et la sortie du cytochrome c (47). Certaines études débattues suggèrent que Bax et Bak forment un canal oligomérique au niveau de la mitochondrie et ainsi favorisent la relâche du cytochrome c (48, 49). Il existe aussi d'autres gènes classiquement transcrits suite à l'activation de p53 qui ont un rôle critique au niveau des processus apoptotiques. *Noxa* (50) et *Puma* (45), des membres du groupe III de la famille Bcl-2 qui sera discuté plus bas, en sont de bonnes cibles. Par exemple, les souris *Puma*-déficientes présentent des anomalies apoptotiques similaires à celles observées au niveau de souris *p53*-déficientes suite à un dommage à l'ADN au niveau neuronal (51).

De leur côté, les membres du groupe III de la famille Bcl-2 ou BH3-seul ont comme particularité, en plus de leur activité pro-apoptotique, d'avoir le BH3 comme unique domaine d'homologie à Bcl-2 (37). Bad, Bim et Bid font partie de ce troisième groupe (5). Bim, de son côté, joue un rôle important dans les processus d'embryogénèse, d'anoïkis et de défense contre les réactions auto-immunes, contribuant ainsi à l'homéostasie tissulaire (52, 53). En plus d'être soumise au contrôle transcriptionnel, Bim est aussi régulée au niveau post-traductionnel de par une séquestration de la protéine au niveau du cytosquelette et ce, chez plusieurs types de cellules mammifères (52). En fait, la chaîne légère de la dynéine (LC8) peut interagir avec la région N-terminale de certains isoformes Bim (L et EL) de façon à



inhiber leur propriété pro-apoptotique (54). Sous stress apoptotique, Bim peut être libérée dans la cellule où elle ira inactiver les membres anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2. D'une façon plus générale, l'ensemble des protéines de la famille des Bcl-2 est intimement relié à la régulation de la sortie du cytochrome c à partir de la mitochondrie.

En effet, les membres de la famille Bcl-2, bien que régulés par des interactions protéine-protéine, sont principalement des régulateurs de l'apoptose via la voie mitochondriale. En ce qui concerne les interactions protéine-protéine, il peut y avoir homodimérisation de protéines de la même sous-famille ou hétérodimérisation entre familles pro et anti-apoptotiques annulant l'un et l'autre leur effet intrinsèque respectif (37, 38, 55). Le devenir de la cellule se résume donc aux proportions relatives de protéines pro et anti-apoptotiques retrouvées dans la cellule : un excès de protéines pro-apoptotiques sensibilisera la cellule à l'apoptose tandis qu'un excès de protéines anti-apoptotiques favorisera la survie de la cellule (3).

#### 1.1.2.3. Voie intrinsèque

La voie intrinsèque ou mitochondriale est activée suite à un stress génotoxique qui endommage l'ADN et se caractérise par l'activation de la pro-caspase 9, la caspase initiatrice de cette voie (16, 17). Les bris double brin de l'ADN sont perçus par des enzymes de la famille Phosphatidylinositol 3-OH-kinase (ATM, ATR et DNA-PK) qui, à leur tour, activent d'autres kinases (Chk1 et Chk2) placées en aval dans la cascade de signalisation, le tout ayant la propriété de phosphoryler un résidu sérine à

l'extrémité N-terminale de p53, une importante protéine pro-apoptotique suppresseur de tumeurs (56). Ceci a pour effet d'augmenter la fonction de transactivation de p53 et/ou d'inhiber l'interaction de p53 avec MDM2 prévenant ainsi la dégradation de p53 (45, 46). Il est bien connu que p53 influence la transcription de certains membres de la famille Bcl-2 dont Bcl-2 lui-même de par une diminution de son expression et Bax de par une augmentation de son expression, soit deux phénomènes favorisant la mort cellulaire (45, 46). La carence en sérum ou la déprivation de facteurs de croissance peuvent aussi activer la voie intrinsèque par une stabilisation de p53 (57, 58). Bad, un membre de la famille Bcl-2 de type BH3-seul, est un joueur important dans l'apoptose induite par la carence en sérum de par son habileté à inhiber les fonctions anti-apoptotiques de Bcl-2 et Bcl-Xl à la mitochondrie (59). De nouvelles évidences laissent croire que p53 contribuerait à la transcription et à la translocation de Bad lui permettant d'effectuer ses fonctions pro-apoptotiques (60). Dans un cadre pro-survie, la présence de facteurs de croissance est en mesure de phosphoryler Bad d'une façon PI3K/Akt-dépendante résultant en son inactivation et en une inhibition de l'apoptose (61).

La suite des événements converge vers la mitochondrie où il est possible d'observer une lutte entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 ce qui affectera la perméabilisation membranaire de la mitochondrie (37, 55). Il est à noter que le cytochrome c n'est pas le seul facteur pro-apoptotique libéré par la mitochondrie. Des molécules de type Diablo/Smac sont aussi relâchées dans le cytosol suite à un stimulus apoptotique (62-64). L'extrémité N-terminale de ces

protéines leur permet de lier et d'inhiber les protéines inhibitrices de l'apoptose : les IAPs (« Inhibitor of Apoptosis Proteins ») de par une liaison à leurs domaines BIR (« Baculovirus IAP Repeat) (65) normalement utilisés par les IAPs pour s'associer aux diverses caspases de façon à les inhiber (66). L'apoptose survient donc généralement lorsque les niveaux de Diablo/Smac sont suffisamment élevés de façon à séquestrer les IAPs et permettre subséquemment l'activation des caspases. HtrA2/Omi font aussi partie du groupe de protéines mitochondriales capables de séquestrer les IAPs du côté cytosolique lorsque relâchées (67). Par ailleurs, la mitochondrie, sous stress apoptotique, peut relâcher dans le cytosol une flavoprotéine AIF (« Apoptosis Inducing Factor ») qui possède une activité apoptotique méconnue (68), mais qui semblerait faire partie d'un programme de mort cellulaire programmée caspase indépendant (69). En fait, AIF peut migrer de la mitochondrie au noyau causant par la suite une condensation de la chromatine et une fragmentation à grande échelle de l'ADN nucléaire (64). Par ailleurs, une nucléase connue sous le nom d'Endo G (endonucléase G) (63) et quelques molécules de caspases, dont les pro-caspases 2,3 et 9 (70), peuvent aussi être libérées de l'espace intermembranaire de la mitochondrie soumise à un stress apoptotique. Une fois relâchée dans le cytosol, l'EndoG, qui possède une activité indépendante à l'activation des caspases, est en mesure d'induire une fragmentation de l'ADN caractéristique à l'apoptose (30, 63, 71, 72).

En ce qui concerne l'activation de la caspase-9, elle nécessite l'apport d'un complexe macromoléculaire formé suite au stimulus apoptotique et composé du

cytochrome c, d'Apaf-1, de procaspases-9 et d'ATP/dATP (Adénosine TriPhosphate), ce qui forme l'apoptosome (73-75). Cet heptamère protéique permet ensuite l'activation de la caspase-3 effectrice qui enclenchera une cascade d'activation des caspases-2-6-7 et -10 permettant ainsi les changements morphologiques et biochimiques caractéristiques à l'apoptose comme, par exemple, le clivage des lamines nucléaires qui engendre la condensation et le bourgeonnement nucléaire (22, 32, 33). Apaf-1 est une protéine d'échafaudage homologue à Ced-4 chez *C.Elegans* qui possèdent des domaines CARD (« Caspase Activation Recruitment Domain ») en N-terminal leur permettant d'interagir avec les domaines CARD des caspases pour faciliter leur activation (76). En effet, dans le cas où la concentration en zymogènes n'est pas suffisante pour permettre l'activité auto-catalytique, l'activation des caspases nécessite ce type de protéines d'échafaudage (77, 78). D'autres homologues à Ced-4 ont aussi été retrouvés chez les mammifères comme Nod1 et Nod2 (79, 80) et Ipaf (81).

#### 1.1.2.4. Voie extrinsèque

Des signaux pro-apoptotiques (Fas Ligand) ou pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) extracellulaires peuvent aussi être captés par la cellule initiant ainsi un processus de mort cellulaire programmée récepteur dépendant ou plus communément appelé voie apoptotique extrinsèque (82). Cette liaison permet ensuite l'initiation de la cascade d'activation des caspases via la caspase initiatrice de cette voie, c'est-à-dire la caspase-8 et ce, généralement sans l'apport de la mitochondrie (83). En fait, la

liaison du ligand à son récepteur, qui possède un domaine DD (« Death Domain »), engendre la formation d'un complexe de signalisation de mort cellulaire (3). Celui-ci permet ensuite le recrutement de protéines adaptatrices possédant des domaines DD et DED (« Death Effector Domain ») comme, par exemple, FADD (« Fas Associated Death Domain protein ») (3). Cette dernière est en mesure de recruter des molécules de procaspase-8 via leur domaine DED et d'en favoriser l'accumulation de façon à promouvoir, selon le modèle d'induction des caspases par proximité, leur auto-activation grâce à leur activité de clivage intrinsèque (84). S'en suivra ensuite l'activation de la caspase-3 effectrice, soit un point de convergence entre la voie apoptotique intrinsèque et extrinsèque, qui activera la cascade des caspases et subséquemment le clivage des substrats propres aux différentes caspases. Il y aura ensuite apparition des changements morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose telle que la condensation de la chromatine (85). Il existe aussi un autre point de convergence entre les voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques utilisé par la cellule pour amplifier un signal apoptotique extracellulaire avec l'aide de la mitochondrie (86). En effet, la protéine Bid, un membre pro-apoptotique de la famille des Bcl-2 (82) peut être clivée par la caspase-8 pour générer tBid (Bid tronquée) qui pourra alors migrer du cytosol à la mitochondrie où elle ira s'insérer (64, 87). Il y aura alors compétition à la surface de la mitochondrie avec les autres membres de la famille des Bcl-2 où tBid agira comme facteur pro-apoptotique favorisant la sortie du cytochrome c (88). Un schéma global des voies apoptotiques est présenté à la figure 1.

### 1.1.3. Mort cellulaire programmée non-apoptotique

Certaines cellules ont l'habileté exceptionnelle de survivre malgré l'activation de caspases pro-apoptotiques démontrant ainsi la flexibilité des programmes de mort cellulaire (89-93). Ces évènements, qui font l'objet de plus en plus de projets de recherche, supportent aussi l'idée que la simple activation des caspases n'est pas suffisante à l'induction de la mort cellulaire programmée dite apoptotique (4). À cet effet, la nomenclature issue de ces découvertes n'a pas été bien définie si bien que plusieurs appellations pour des phénomènes de mort cellulaire programmée sont utilisées (22). Nous retrouvons, par exemple, l'apoptose-apparentée et la nécrose-apparentée, qui peuvent posséder quelques caractéristiques de l'apoptose classique. Dans un premier temps, l'apoptose-apparentée se caractérise par une légère condensation de la chromatine et une participation plus ou moins importante des caspases (4, 89, 94). À cet effet, certaines analyses ont révélé des boursoufflures au niveau de la membrane plasmique de cellules mourantes où il n'y avait pas d'activité caspase (89, 95). Dans un deuxième temps, la nécrose-apparentée est caractérisée principalement par l'absence de condensation de la chromatine et l'utilisation de caspases indépendantes aux programmes apoptotiques normaux (ex. :caspases-1-11-12-14) (28). L'activation de la caspase-8 a cependant déjà été observée dans ce type de mort cellulaire programmée (96).

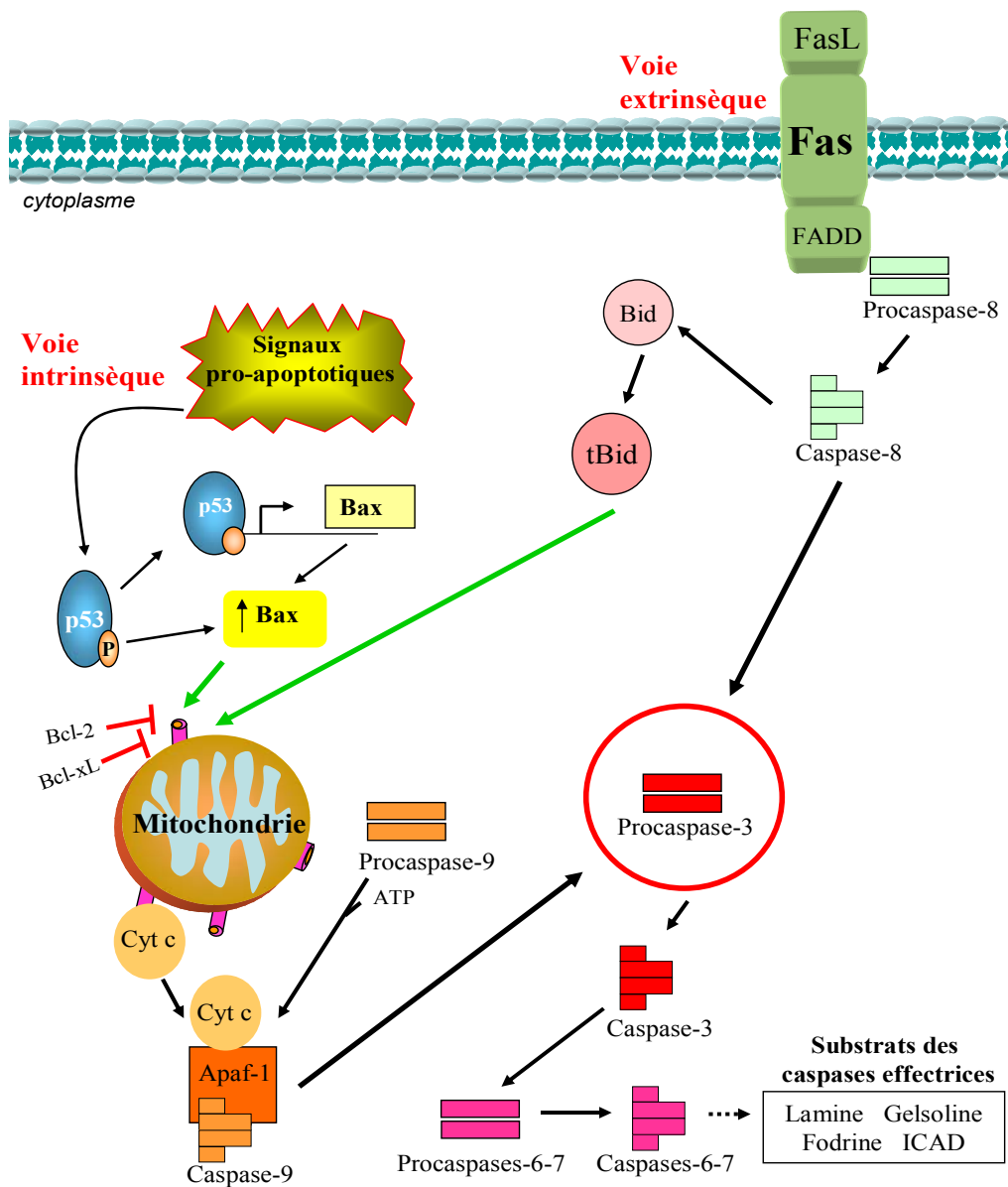


Figure 1. Schématisation simplifiée des voies apoptotiques. **Voie Intrinsèque (ou mitochondriale)** : p53 est stabilisée ce qui augmente la disponibilité de Bax au niveau mitochondrial. Ceci engendre la perméabilisation de la membrane mitochondriale, la relâche de cytochrome c et la formation de l'apoptosome.

L'apoptosome active les caspases effectrices telles que les caspases-3,6 et 7 entraînant du coup le clivage des substrats caractéristiques à l'apoptose. **Voie extrinsèque** : le récepteur de mort cellulaire lie son ligand spécifique (ex. : Fas-Fas ligand), recrute les molécules adaptatrices (FADD) ce qui favorise l'activation de la caspase-8. Cette dernière peut activer directement les caspases effectrices ou indirectement tronquer Bid pour amplifier la réponse apoptotique via la voie mitochondriale.



L'apoptose classique a été récemment défini comme un processus de «mort cellulaire de type I» (22). Une nouvelle ère de pensée nous pousse à croire que les mécanismes non-apoptotiques représentent une forme de compensation rudimentaire à la mort cellulaire programmée nécessaire que dans des rares circonstances où la machinerie apoptotique est génétiquement compromise. Par contre, ces mécanismes non-apoptotiques qui commencent à être caractérisés au niveau moléculaire pourraient aussi être cruciaux à divers processus biologiques tels que l'embryogénèse et la survie cellulaire. De récentes études sur les programmes de mort cellulaire alternatifs ont permis d'associer l'autophagie à un mécanisme de mort cellulaire non-apoptotique, classifiée comme «mort cellulaire de type II» (97-99). Ce type de mort cellulaire se caractérise par la présence de vacuoles autophagiques dans la cellule mourante où l'on retrouve un taux d'autophagie augmenté par rapport au renouvellement normal des protéines/organelles, c'est-à-dire le «turnover» autophagique (100, 101). Initialement caractérisée comme un mécanisme de survie, l'autophagie représente une source d'énergie catabolique pour une cellule placée en condition limitante de nutriments de par sa capacité à dégrader son propre matériel cytoplasmique (102, 103). Il existe principalement deux mécanismes de dégradation des protéines : le système ubiquitine-protéasome qui dégrade les protéines à courte demi-vie et le système autophagique qui implique la livraison de protéines et/ou organelles au lysosome de façon à assurer leur recyclage (104). Plusieurs routes peuvent d'ailleurs être empruntées au niveau de l'autophagie : 1- la macro-autophagie où le contenu cytoplasmique à recycler est préalablement incorporé dans une vésicule à double membrane («autophagosome») avant d'être livré au lysosome, 2- la micro-

autophagie où le contenu cytoplasmique est directement internalisé par le lysosome et

3- l'autophagie assistée par des chaperones où des protéines portant une séquence signal spécifique sont internalisées au lysosome par un processus récepteur dépendant (105-107). D'un point de vue mécanistique, l'autophagie est régulée par une action concertée de protéines issues des gènes *ATG* («ATophagy-related Genes») qui ont été initialement identifiés chez la levure, mais se retrouve hautement conservés au niveau des organismes supérieurs (108). À noter, la clairance des corps morts issus de l'apoptose ou de l'autophagie nécessite, cependant, quatre étapes redondantes: génération de marqueurs à la surface de la cellule apoptotique, sécrétion de signaux attractants par la cellule apoptotique, migration des phagocytes et reconnaissance/digestion de la cellule apoptotique par le phagocyte (109, 110).

La protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est classiquement associée aux voies de signalisation impliquées dans l'autophagie où elle joue un rôle d'intégrateur des niveaux énergétiques et nutritionnels de la cellule (111, 112). En fait, mTOR est un inhibiteur de l'autophagie, lui-même inhibé par le complexe protéique TSC1-TSC2 (*Tuberous sclerosis complexe 1 and 2*), qui se retrouve souvent surexprimé dans de nombreux cas de cancers (111, 113). La délétion d'un des deux membres du complexe d'inhibition TSC1-TSC2 est aussi suffisante et prompte au développement de cancers (111). Akt, un substrat de la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), est en mesure de phosphoryler la protéine TSC2 (aux sites S<sup>939</sup> et T<sup>1462</sup>), ce qui provoque la dissociation du complexe TSC1-TSC2 levant ainsi son inhibition sur mTOR (114).

La nécroptose a aussi été récemment définie comme un mécanisme régulé de mort cellulaire non-apoptotique (22). S'apparentant à une forme de nécrose régulée, le concept de nécroptose s'inscrit dans la lignée des exemples de variabilité mécanistique menant à la mort cellulaire. Brièvement, la nécroptose peut être induite suite à l'activation de récepteurs de mort cellulaire identiques à ceux utilisés pour l'apoptose (ex. : récepteur TNF- $\alpha$ ) dans des situations où les caspases sont inhibées chimiquement ou dans des situations où la caspase-8 ou FADD sont mutés (115-118). À cet effet, l'activation du récepteur TNF- $\alpha$  et l'activation subséquente de la kinase RIP1 (Receptor Interacting protein 1) en comparaison avec l'activation subséquente de NF- $\kappa$ B permettrait de distinguer la nécroptose de l'apoptose (117). Les caractéristiques morphologiques de la nécroptose s'apparentent à la nécrose : absence de fragmentation nucléaire (48), gonflement du noyau, des organelles et du volume cellulaire (30 à 50% d'augmentation) (119), dysfonctionnement mitochondrial rapide et perte de la perméabilité membranaire menant à la lyse de la paroi cellulaire (4, 120). Les grandes lignes mécanistiques de la nécroptose ne sont pas encore décrites et seront, du coup, sources de plusieurs projets de recherche.

Dans un autre ordre d'idée, des protéines ont aussi été identifiées comme étant capable d'induire une mort cellulaire programmée non-apoptotique : les cathepsines et ce, avec ou sans l'apport des caspases (121). Cependant, ces protéases ont aussi été impliquées dans l'induction de l'apoptose (122). Les cathepsines sont

normalement confinées dans les lysosomes où elles ont des fonctions de dégradation, mais sont capables d'induire, suite à une sortie dans le cytosol, des changements proapoptotiques au niveau de la mitochondrie (121). Les cathepsines D (123), B (124, 125) et L (126) ont été répertoriées comme facteurs impliqués dans les processus de mort cellulaire, ayant des impacts sur le clivage de la protéine Bid et sur la perméabilisation de la mitochondrie et donc sur la sortie du cytochrome c. Par ailleurs, tel que mentionné plus haut, AIF et EndoG peuvent aussi être considérées comme des protéines induisant une mort cellulaire programmée non-apoptotique. La cellule possède donc plusieurs options mécanistiques pour parvenir à sa fin, mais cette dernière ne sera pas sans conséquence. Plusieurs processus physiologiques essentiels à l'homéostasie tissulaire tirent profit de cette réponse, mais une mort cellulaire incontrôlée est souvent source de pathologies comme on le retrouve dans le développement de la fibrose.

## *1.2. Fibrose*

### *1.2.1. Aperçu*

Des pathologies telles que la fibrose pulmonaire, la sclérose systémique (SSc), la cirrhose du foie et les rejets chroniques d'allogreffes représentent des sources importantes de morbidité et de mortalité qui affectent l'ensemble des tissus et organes qui composent l'être vivant (127). Ces pathologies fibroprolifératives caractéristiques à la fibrose sont définies comme découlant d'un processus de réparation infructueux activé suite à des dommages constants perçus au niveau endothélial et/ou épithélial qui se traduisent par une augmentation de l'apoptose

(128). La réparation des tissus endommagés est un processus biologique fondamental qui permet le remplacement des cellules mortes et/ou endommagées suite à l'insulte; un mécanisme essentiel à la régénération du tissu et à la survie (127). Initialement bénéfique, le processus de réparation devient pathologique s'il n'est pas régulé où si l'insulte initiale persiste, ce qui résulte en une réorganisation excessive de la matrice extracellulaire (127). En plus d'entraîner une cicatrisation tissulaire hypertrophiée, ce mécanisme fibrotique peut mener à la dysfonction et à la mort de l'organe atteint (127). Globalement, les désordres fibrotiques mentionnés ci-haut ont comme particularités communes les points suivants : une insulte initiale persistante qui soutient une production de facteurs de croissance, d'enzymes protéolytiques, de facteurs angiogéniques et de cytokines fibrotiques qui ensemble, stimuleront la déposition d'éléments du tissu conjonctif menant au remodelage et à la destruction de l'architecture normale du tissu (129, 130).

D'un point de vue mécanistique, le développement de la fibrose suit une séquence d'évènements aujourd'hui bien caractérisés. Malgré les nombreuses recherches actuelles et l'énorme impact de la fibrose sur la santé humaine, il n'y a toujours pas de traitement approuvé qui cible spécifiquement les mécanismes de la fibrose (127). La fibrose s'établit séquentiellement comme suit (127, 131) : 1. suite à l'insulte, il y a apoptose épithéliale et/ ou endothéliale et libération de médiateurs pro-inflammatoires qui initient une cascade de coagulation anti-fibrinolytique, formation d'un caillot de fibrine et d'une matrice extracellulaire provisoire. 2. les cellules épithéliale et/ou endothéliales sécrètent aussi des métalloprotéinases (MMPs) qui

dégradent la membrane basale permettant un meilleur recrutement des cellules inflammatoires au site d'insulte et aussi des facteurs de croissance, cytokines et chémokines qui stimuleront la prolifération et le recrutement des leucocytes à travers la matrice extracellulaire provisoire. 3. les neutrophiles sont les cellules inflammatoires les plus abondantes à cette étape du développement de la fibrose et, lorsqu'ils se dégranulent et meurent, recrutent les macrophages afin d'éliminer les débris tissulaires. 4. les macrophages actifs seront en mesure de sécréter diverses cytokines dont le Platelet derived growth factor (PDGF) et le Transforming growth beta-1 (TGF- $\beta$ 1) qui stimuleront la migration des fibroblastes au site d'insulte et ainsi la différenciation myofibroblastique. 5. les myofibroblastes expriment de l'actine musculaire lisse alpha ( $\alpha$ SMA) formant ainsi des fibres de stress et possèdent donc l'activité contractile nécessaire à la réparation de la lésion. 6. Les fibroblastes et myofibroblastes sont aussi en mesure de sécréter des éléments de la matrice extracellulaire (fibronectine, protéoglycans, collagène) de façon à remplacer la matrice provisoire initialement formée. 7. finalement, les cellules épithéliales et/ou endothéliales se divisent, migrent au dessus la couche basale et régénère le tissu endommagé, ce qui complète le processus de réparation. 8. la fibrose s'établit lorsque l'insulte se répète ou lorsque l'inflammation ou la réparation persiste entraînant du coup, une déposition excessive de matrice extracellulaire et la déformation du tissu.

### 1.2.2. Fibroblaste

Globalement, les fibroblastes sont spécialisés pour sécréter de la matrice extracellulaire collagèneuse et sont grandement responsables de la structure architecturale de notre corps (132). On les retrouve en quantité importante au niveau de la tunique adventice de la paroi vasculaire où ils jouent un rôle de support et de réparation et ce, dans presque tous les tissus et organes (132, 133). De plus, leur adaptabilité à se différencier en un type de fibroblaste contractile, c'est-à-dire en myofibroblaste, leur permet d'être un joueur important dans les mécanismes de réparation induit par une insulte. En temps normal, les fibroblastes sont dispersés dans l'organisme et sécrètent de la matrice extracellulaire riche en collagène de type I et III (132), mais lorsqu'ils sont stimulés, ils migrent au site d'insulte, prolifèrent, se différencient et produisent une grande concentration de matrice collagèneuse de façon à isoler et réparer le tissu endommagé (130).

Le modèle de réparation d'une plaie ouverte au niveau de la peau, proposé par *Tomasek et al.* (130), nous offre une belle opportunité de comprendre les mécanismes et facteurs impliqués dans l'activation fibroblastique. Dans les tissus normaux du derme, les fibroblastes n'exercent pas de tension sur la matrice extracellulaire dû à l'intégrité de celle-ci et de ses composantes si bien que la formation de l'appareil contractile chez les fibroblastes n'est pas sollicitée. Les fibroblastes recrutés au tissu de granulation produisent déjà de la fibronectine ED-A, une protéine issue d'un transcrite plus long que la fibronectine normalement retrouvée au niveau du derme et qui joue un rôle important, voire essentiel, au niveau de la différenciation

myofibroblastique subséquente (134). La migration des fibroblastes crée une force de tension sur la matrice extracellulaire collagèneuse qui est perçue par les fibroblastes. Ils réorganisent alors leur cytosquelette le long de cette tension, c'est-à-dire le long des lignes de stress, les poussant à générer des fibres de stress intracellulaires et à produire du collagène de façon à acquérir le phénotype de proto-myofibroblaste. Les fibroblastes ont besoin de percevoir le stress, c'est-à-dire la tension exercée au niveau du tissu endommagé, avant d'entreprendre des mécanismes de différenciation cellulaire. Par ailleurs, plusieurs études présentes dans la littérature ont démontré l'importance du PDGF dans les phénomènes précoces de différenciation myofibroblastique menant au phénotype du proto-myofibroblaste et ce, lors du développement embryonnaire (135) et de la guérison d'une plaie ouverte chez l'adulte (136). Par contre, des études réalisées *in vitro* et *in vivo* avec des fibroblastes ont démontré que le PDGF n'est pas en mesure d'induire l'expression d' $\alpha$ -SMA, une protéine caractéristique aux myofibroblastes (137, 138). À cet effet, le TGF- $\beta$ 1, dans une réponse autocrine, permettra au proto-myofibroblaste de poursuivre sa voie de différenciation vers le phénotype myofibroblaste  $\alpha$ SMA positif (figure 2).

### 1.2.3. Myofibroblaste

Le myofibroblaste, un fibroblaste spécialisé ayant la propriété de générer des forces contractiles, est considéré comme un joueur important dans l'établissement de



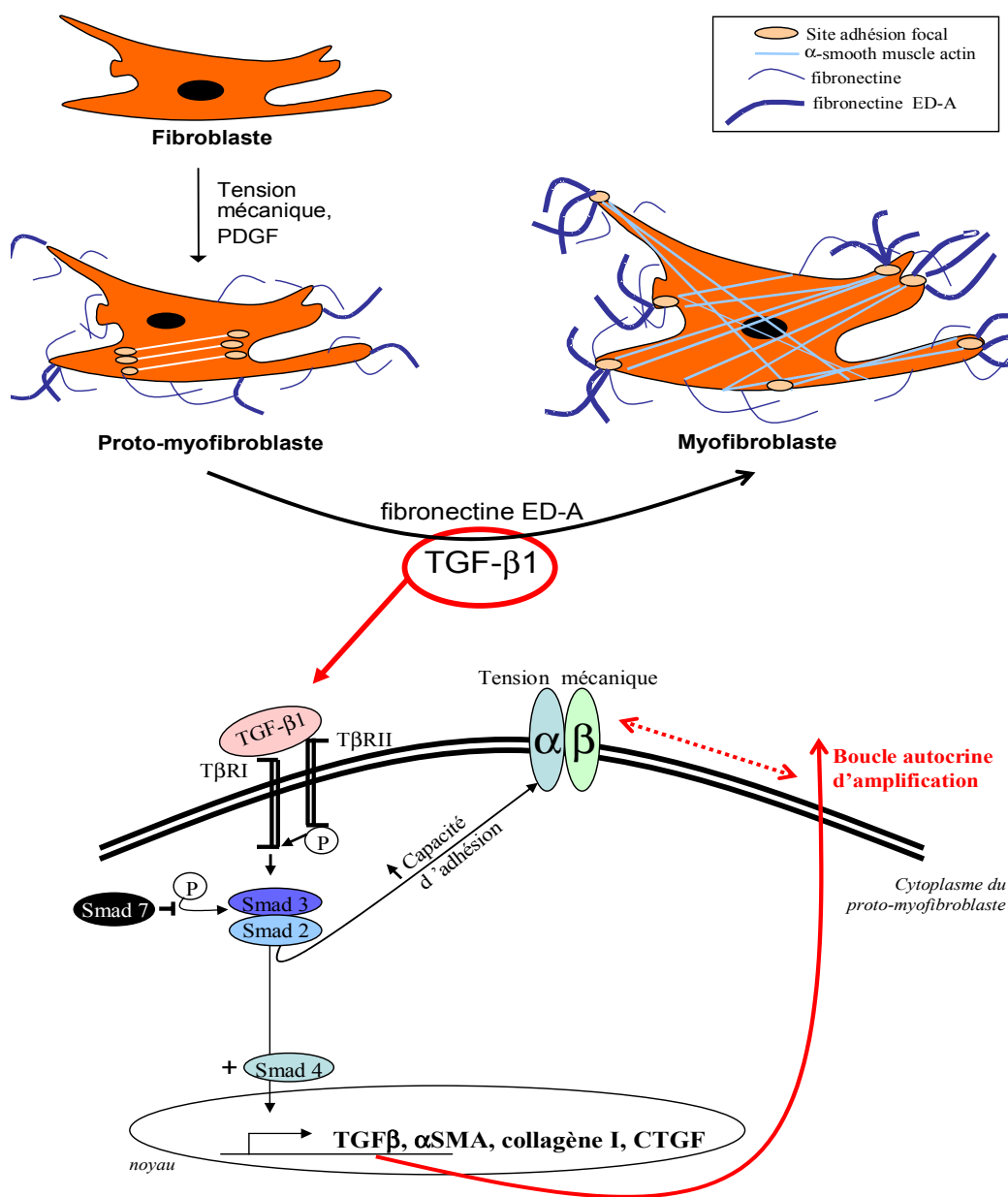


Figure 2. Différenciation myofibroblastique TGF- $\beta$ 1 dépendante. Suite à une insulte créant une tension mécanique sur la matrice extracellulaire, il y a libération de facteurs de croissance (PDGF) et de médiateurs locaux qui stimuleront la migration des fibroblastes au site lésé. S'en suivra l'acquisition d'un phénotype de proto-

myofibroblaste caractérisé par une réorganisation du cytosquelette le long des fibres de stress nouvellement synthétisées et par une production de fibronectine ED-A. D'autres médiateurs, principalement le TGF- $\beta$ 1 produit par les macrophages, assureront la phase finale de différenciation myofibroblastique caractérisée par la synthèse d'actine musculaire lisse ( $\alpha$ -SMA) et par une production de collagène. Le récepteur TGF- $\beta$ 1 active la cascade des Smads qui peut influencer la transcription génique et les propriétés adhésives du fibroblaste, ces propriétés favorisant le phénotype myofibroblastique stable.

la tension durant les processus de réparation et de remodelage vasculaire tant normaux que pathologiques (139, 140). Il est cependant difficile d'en expliquer l'origine et toutes les fonctions biologiques qu'il régule et ce, dû au fait que le myofibroblaste intègre une multitude de signaux extérieurs provenant à la fois des facteurs de croissance et de ses interactions avec la matrice extracellulaire et les cellules avoisinantes. On sait cependant que les relations cellule-matrice extracellulaire sont primordiales à l'activité myofibroblastique et que le stress cytomécanique exercée au niveau de la lésion et certains facteurs de croissance comme le PDGF et le TGF- $\beta$ 1 sont impliqués dans la transition fibroblaste-myofibroblaste (140, 141).

#### 1.2.3.1. Caractéristiques

Morphologiquement, les myofibroblastes sont caractérisés par la présence d'un appareil contractile qui contient des microfilaments d'actine associés à des protéines contractiles de type myosine non-musculaires, un analogue des fibres de stress (140, 142, 143). Ces microfilaments d'actine relient la membrane plasmique du myofibroblaste en un point appelé le fibronexus, un complexe d'adhésion spécialisé qui utilise les intégrines transmembranaires pour lier l'actine intracellulaire aux fibres de fibronectine extracellulaires déjà présentes dans la matrice extracellulaire (142, 144, 145). D'un point de vue fonctionnel, ceci provoque une force de tension à partir des fibres de stress intracellulaires qui peut être transmise à la matrice extracellulaire environnante (142). À l'inverse, ce système d'interactions peut être utilisé pour que

le myofibroblaste perçoit les stimuli de son environnement (146, 147). Une autre caractéristique du myofibroblaste, que le fibroblaste ne possède pas, est l'expression d' $\alpha$ -SMA. On retrouve aussi l'expression de cette protéine, connue pour son activité contractile intrinsèque, chez un autre type cellulaire, soit les cellules musculaires lisses (148, 149). L' $\alpha$ -SMA a la propriété de former des fibres d'actine différentes des fibres de stress, mais tout de même capables d'induire une activité contractile. En fait, les fibres d' $\alpha$ -SMA forment de plus grosses fibres de stress et forment de plus gros complexes d'adhésion fibronexus, dits supermatures (130). D'un point de vue fonctionnel, les myofibroblastes différenciés génèrent une force contractile de plus grande intensité que celle générée par les proto-myofibroblastes et réorganisent davantage les éléments de la matrice extracellulaire, dont la fibronectine et le collagène. Par ailleurs, il existe différents types de myofibroblastes. La plupart expriment l' $\alpha$ -SMA, mais il existe d'autres marqueurs de différenciation myofibroblastique qui font partie d'un phénotype encore plus différencié. Entre autres, certains types de myofibroblastes peuvent exprimer des protéines caractéristiques comme la caldesmone, la desmine et les chaînes lourdes de myosine musculaires lisses (140). De son côté, la vimentine est une protéine retrouvée au niveau du cytosquelette et qui est caractéristique aux fibroblastes et myofibroblastes (150).

### 1.2.3.2. Fonctions

Il a été clairement démontré que les myofibroblastes expriment de l'  $\alpha$  -SMA et du collagène de type I, ces processus étant principalement régulés par le TGF- $\beta$ 1 (148, 149, 151). De plus, il a été démontré que les myofibroblastes sont présents dans les tissus de granulation de plaies en guérison et dans plusieurs pathologies fibro-contractives comme le rejet chronique d'allogreffes, l'athérosclérose et la SSc (130). Ces évidences laissent donc croire que le myofibroblaste a pour principale fonction la production de force contractile et la synthèse de collagène menant à une réorganisation de la matrice extracellulaire, à la contraction du tissu et à sa cicatrisation. On obtient généralement une belle cicatrice lorsque les différents types cellulaires impliqués dans les processus de réparation disparaissent du site lésionnel après avoir accompli leur travail respectif. Cependant, il existe plusieurs situations pathologiques associées aux mécanismes du remodelage au niveau vasculaire, pulmonaire ou dermique. On retrouve dans tous ces cas une différenciation persistante de fibroblastes en myofibroblastes et un manque d'apoptose de ces cellules durant la phase finale de réparation, soient deux phénomènes impliqués dans le développement d'une réponse pro-fibrotique (130). Ceci, selon les cas, a le potentiel d'entraîner une réponse pathologique pouvant aller jusqu'au développement de la fibrose cutanée et viscérale retrouvées en SSc. Les myofibroblastes reçoivent-ils des signaux pro-différenciation d'une façon chronique suite à l'insulte ou deviennent-ils résistants aux signaux pro-apoptotiques? Sûrement un peu des deux... Beaucoup de questions sont encore sans réponse, mais chose certaine, le

myofibroblaste est essentiel à l'homéostasie de l'organisme et c'est sa dérégulation qui est responsable de la dysfonction de certains tissus (130).

#### 1.2.3.3. Mécanismes de différenciation

Des études réalisées avec le TGF- $\beta$ 1 ont démontré son rôle dans l'induction de la différenciation myofibroblastique et dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique chez le myofibroblaste (152, 153). Le TGF- $\beta$ 1 est aussi une cytokine fibrogénique très importante impliquée dans la fibrose de plusieurs tissus et qui peut être sécrétée par plusieurs types de cellules impliquées dans les processus inflammatoires (154). En plus de l'expression d' $\alpha$ SMA, le TGF- $\beta$ 1 est responsable de la production de PAI-1 (« Plasminogen Activator Inhibitor-1 »), de CTGF (« Connective tissue growth factor »), de collagène de type I et de fibronectine, particulièrement une variante de type ED-A (152, 155-159). Le CTGF est un facteur de croissance qui prend aujourd'hui de plus en plus d'importance quant à ses propriétés pro-fibrotiques si bien qu'il est maintenant perçu comme un médiateur et biomarqueur de rejet fibrotique d'allogreffe rénale (160). Certaines études ont par ailleurs démontré que le CTGF, d'une façon autocrine et rétroactive, est en mesure d'augmenter l'affinité du TGF- $\beta$ 1 pour son propre récepteur augmentant du coup le potentiel fibrogénique de cette voie de signalisation (161). Le TGF- $\beta$ 1 est donc un facteur clé dans l'apparition de l'ensemble des caractéristiques du myofibroblaste, autant *in vitro* qu'*in vivo*. La production autocrine de TGF- $\beta$ 1 par les fibroblastes, tout comme la production issue des cellules endommagées, sont deux facteurs importants dans la préservation de

l'activité fibrogénique du myofibroblaste même après le retrait du stimulus inflammatoire (162, 163). Il a aussi été démontré que l'administration d'interleukine-4 *in vitro* ou de GM-CSF (« Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor ») *in vivo*, deux cytokines pouvant être libérées par les cellules endommagées et les macrophages, sont en mesure d'induire la différenciation myofibroblastique chez les fibroblastes (138, 164).

Les voies de signalisation activées chez le proto-myofibroblaste par la liaison du TGF- $\beta$ 1 à son récepteur membranaire spécifique représentent une avenue de recherche intéressante quant à une meilleure compréhension des mécanismes de différenciation myofibroblastique. Les récepteurs spécifiques au TGF- $\beta$ 1 de type I et II sont transmembranaires et s'hétérodimérisent suite à la liaison du ligand ce qui permet l'activité intrinsèque sérine/thréonine kinase du complexe protéique ainsi formé (165, 166). S'en suivra une cascade d'activation des Smads, via la phosphorylation de deux résidus sérine en C-terminal, qui peuvent agir à titre de facteurs transcriptionnels. Leur activation permet une migration du complexe protéique Smad du cytosol au noyau qui est essentielle à l'activation de gènes cibles impliqués dans la différenciation myofibroblastique (Figure 2) (166). Toujours en ce qui concerne cette voie TGF- $\beta$ 1 dépendante, on sait que l'inhibition de l'interaction entre la fibronectine ED-A et la surface de la cellule bloque la différenciation myofibroblastique induite par le TGF- $\beta$ 1 (167). De plus, la fibronectine ED-A seule, sans TGF- $\beta$ 1, n'induit pas la différenciation myofibroblastique. On suspecte donc

des récepteurs de type «intégrine», connus pour leur capacité exceptionnelle à lier la matrice extracellulaire avoisinante, de jouer un rôle important au niveau des interactions cellule-matrice extracellulaire favorisant l'activation des mécanismes de différenciation. Particulièrement, les intégrines  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_9\beta_1$  qui possèdent des sites de liaison aux domaines ED-A de la fibronectine (130). De récentes données montrent d'ailleurs que la différenciation myofibroblastique induite par le TGF- $\beta$ 1 est dépendante de l'adhésion cellulaire et de la signalisation des intégrines via l'activation de FAK (« Focal Adhesion Kinase ») (168). À cet effet, le rôle des intégrines et de FAK a aussi été répertorié dans le développement d'un phénotype anti-apoptotique chez les fibroblastes et myofibroblastes (169, 170).

Il est à noter que le TGF- $\beta$ 1 n'accomplit pas que des fonctions de différenciation cellulaire. Ce polypeptide de 25 kDa est un facteur de croissance qui agit dans un contexte cellulaire particulier et d'une manière contextuelle tout aussi spécifique de façon à réguler plusieurs activités cellulaires tels que la croissance, la migration et l'apoptose (171, 172). Typiquement, le TGF- $\beta$ 1 est une cytokine suppresseur de tumeurs engendrant des effets cytostatiques et pro-apoptotiques sur la plupart des types cellulaires (169), mais qui peut aussi avoir des effets fort divergents. Par exemple chez les cellules épithéliales, le TGF- $\beta$ 1 favorise cette fonction suppresseur de tumeurs par l'entremise d'un arrêt du cycle cellulaire et de la croissance en plus d'induire l'apoptose tandis que chez les cellules mésenchymateuses, la prolifération et la survie cellulaire est favorisée (130, 173-177). Ces actions opposées sur les



cellules épithéliales et mésenchymateuses favorisent une perte de l'épithélium et une accumulation des myofibroblastes au site d'insulte, soit des caractéristiques propres aux pathologies fibrotiques humaines (178).

#### 1.2.4. Pathologies classiques

Les dysfonctions de l'endothélium sont responsables de nombreuses maladies, mais plusieurs d'entre-elles se caractérisent par le développement d'une réponse fibrotique comme on le retrouve au niveau de la sclérose systémique, du rejet chronique d'allogreffes ou du syndrome Greffe vs Hôte (« Graft vs Host Disease » ou GvHD); pathologies bien décrites dans la littérature et définies ici-bas (131, 179, 180). Le fibroblaste y joue un rôle central si bien que la fibrose survient en association avec l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique chez les fibroblastes et avec une différenciation myofibroblastique persistante (130).

Dans une même suite d'idées, mais avec un rôle moins prépondérant pour le fibroblaste, la microangiopathie thrombotique, initialement introduite par *Symmers* en 1952, définit aussi un phénomène de réponse à l'insulte. La microangiopathie thrombotique se caractérise par une lésion endothéliale et l'épaississement de la paroi vasculaire, principalement au niveau des artérioles et des capillaires (181). L'apoptose des cellules endothéliales est ici reconnue comme un facteur central causant la microangiopathie thrombotique (182-187). Brièvement, l'insulte endothéliale initiale entraîne une mort et un détachement des cellules endothéliales de la membrane basale qui, dans le cas d'un processus chronique, mènera à une

accumulation de cellules musculaires lisses, de fibroblastes et de myofibroblastes favorisant ainsi une réparation pathologique à caractère fibrotique (188-191). La microangiopathie thrombotique est très bien caractérisée au niveau de la microvascularisation rénale où il est aussi possible d'observer initialement une augmentation de l'agrégation plaquettaire favorisant la formation de microthrombi (190, 192, 193). Des phénomènes de microangiopathie anémique, de thrombocytopénie et de dysfonctions rénales progressives pourront alors être observés chez les individus atteints. Encore ici pour la microangiopathie thrombotique, c'est la chronicité de l'insulte (ou l'exagération de la réponse à l'insulte) qui rend l'apoptose des cellules endothéliales potentiellement pathologique au sens où des mécanismes de réparation infructueux peuvent être activés.

#### 1.2.4.1. Sclérose systémique

La sclérose systémique (SSc) est un désordre auto-immun évoluant en plusieurs étapes et caractérisé initialement par des changements pathologiques d'ordre fibrotique au niveau de la peau et plus tardivement au niveau du système vasculaire et des organes solides tels que les poumons, le cœur et les reins (194-196). En SSc, on retrouve premièrement des anomalies du système vasculaire au niveau des cellules endothéliales qui mènent au développement d'un phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste (195, 197). À cet effet, les perturbations vasculaires perçues au niveau des CE (surtout en ce qui a trait au tonus vasculaire) précèdent les autres changements caractéristiques à la SSc (198). Des médiateurs comme l'endothéline, l'oxyde nitrique (NO), les LDL oxydés, les anticorps anti-CE, l'hypoxie et les stress

physiques sont en mesure d'induire une dérégulation de l'homéostasie vasculaire au niveau des cellules endothéliales. Tous ces facteurs ont, par ailleurs, été répertoriés comme éléments déclencheurs potentiels dans la pathogénèse de la SSc (198-201). Donc, suite aux dommages à l'endothélium, il y a infiltration périvasculaire de cellules inflammatoires mononucléaires et migration des fibroblastes avoisinants. Finalement, il y a accumulation excessive de collagène et autres éléments de la matrice extracellulaire, favorisant ainsi le développement de la fibrose au niveau du tissu atteint (179). À cet effet, il est connu que les fibroblastes de patients atteints de SSc produisent, en culture, davantage de collagène (type I et III) que des fibroblastes contrôles normaux (202). Plusieurs hypothèses présentes dans la littérature suggèrent aussi que les mécanismes pathogéniques présents en SSc favorisent la croissance et la survie de deux sous-populations cellulaires pro-fibrotiques : les fibroblastes et les myofibroblastes (203-205). Ces derniers, sont d'ailleurs présents dans les tissus de patients atteints de SSc et sont impliqués dans la production excessive de matrice extracellulaire (206, 207). En fait, même si les mécanismes exacts impliqués dans la pathogénèse de la SSc sont encore méconnus, on sait qu'ils incluent des processus d'inflammation, des attaques auto-immunes et des dommages vasculaires menant à l'activation des fibroblastes (208, 209). Plusieurs évidences suggèrent que des défauts dans la voie de signalisation du TGF- $\beta$ 1 contribueraient aux altérations phénotypiques du fibroblaste chez les gens atteints de SSc (210).

Bien que le rôle important des fibroblastes soit reconnu en SSc, les mécanismes permettant à ce type de cellule de résister aux stimuli apoptotiques ne commencent qu'à être élucidés (208, 209). Récemment, *Jun et al.* ont découvert une augmentation de l'activité PI3K/Akt chez des fibroblastes issus de patients atteints de SSc en comparaison avec des fibroblastes issus de patients normaux (194). En ce qui a trait à la production excessive de collagène retrouvée chez les gens atteints de SSc, *Asano et al.* ont récemment démontré que la voie de signalisation PI3K/Akt est aussi impliquée dans l'expression de collagène  $\alpha 2(I)$  chez les fibroblastes sclérodermiques (211). Toutes ces informations font donc de la voie PI3K/Akt un suspect potentiel quant à l'établissement de la fibrose suite à une insulte endothéliale chez les gens atteints de SSc.

Les anomalies du système vasculaire perçues initialement au niveau des CE qui sont responsables du déclenchement de la réponse fibrotique en SSc sont plutôt d'ordre apoptotique. Plusieurs évidences suggèrent que l'apoptose des cellules endothéliales représente le premier événement perçu en SSc (194, 196). L'augmentation de l'apoptose endothéliale a été la première anomalie microvasculaire repérée avant l'initiation des changements fibrotiques chez un modèle animal atteint de SSc (196). Par ailleurs, les anticorps anti-CE, reconnus pour induire l'apoptose des CE (212, 213), sont présents chez une grande majorité de gens atteints de SSc. On peut donc supposer que l'apoptose des cellules endothéliales induit une réponse paracrine pro-fibrotique sur son environnement par des

mécanismes encore aujourd'hui à l'étude. On sait cependant que les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire permettant une production et une relâche de diverses cytokines sont responsables de l'acquisition du phénotype anormal chez le fibroblaste sclérodermique qui se caractérise par des activités pro-prolifératives et anti-apoptotiques. Quelques cytokines potentiellement pathogéniques dans le développement de la fibrose en SSc sont connues (TGF- $\beta$ 1, PDGF et bFGF) et certaines d'entre elles peuvent à la fois être générées par les CE et les fibroblastes en plus d'être mobilisées par ces mêmes cellules à partir de la matrice extracellulaire (214). Ceci met d'autant plus l'accent sur les interactions existantes entre les fibroblastes et la matrice extracellulaire et sur les protéines membranaires (comme les intégrines et les protéoglycans de surface) qui sont responsables de la liaison de la cellule à son environnement. Les relations mécanistiques reliant l'apoptose des cellules endothéliales à la fibrogénèse sont cependant toujours méconnues. Chose certaine, l'apoptose des CE n'est pas silencieuse et affecte définitivement son environnement.

#### 1.2.4.1.1. Modèles murins

Malgré l'évolution constante de nos découvertes, les modèles animaux permettant d'étudier le développement de la fibrose dans un contexte de sclérose systémique sont existants, mais loin d'être parfaits. En effet, il est difficile de développer un modèle *in vivo* où toutes les phases du développement de la fibrose seront représentées, soient la vasculopathie initiale, l'inflammation et l'autoimmunité

subséquente et l'apparition de fibrose interstitielle et vasculaire au niveau de la peau, des poumons et des autres organes (215). La délétion hétérozygote du gène *Tsk1*, un gène codant pour la protéine du tissu conjonctif fibrilline-1 (216), entraîne le durcissement et l'épaississement de la peau chez la souris (217). Par contre, les souris *Tsk1/+* développement davantage d'emphysème au niveau des poumons que de la fibrose et la vasculopathie initiale de l'endothélium ne survient pas (218). D'autres études ont cependant confirmé l'importance de la fibrilline-1 dans le développement de la fibrose de par sa capacité à séquestrer le TGF- $\beta$ 1, régulant ainsi sa biodisponibilité (219). Le modèle murin de GvHD, discuté plus loin en introduction, est aussi utilisé pour étudier le développement de la fibrose *in vivo* (218). En troisième lieu, la fibrose peut aussi être induite chez la souris par des injections sous-cutanées de bléomycine, un antibiotique anti-cancéreux ayant de forts effets secondaires (220). Brièvement, le modèle de peau fibrotique induite à la bléomycine s'apparente beaucoup à la fibrose retrouvée au niveau des gens atteints de SSc : accumulation précoce de cellules mononuclées, augmentation de l'expression de TGF- $\beta$ 1, accumulation de myofibroblastes positifs pour l' $\alpha$ SMA et développement de fibrose cutanée (221, 222). Par ailleurs, ces souris manifestent aussi des évidences de fibrose pulmonaire et rénale. Bien qu'il présente certaines particularités selon la souche de souris injectées, le modèle murin de fibrose induite à la bléomycine est reproductible et relativement facile à établir si bien qu'il est de plus en plus utilisé pour étudier les gènes et mécanismes impliqués dans la fibrogénèse (221, 223). Ce modèle a d'ailleurs été utilisé au laboratoire à titre de contrôle positif

au développement de la fibrose et a conduit à plusieurs résultats présentés dans la dite section de cette thèse.

#### 1.2.4.2. Rejet chronique d'allogreffe

Les vasculopathies chroniques associées à la transplantation représentent des causes importantes de la dysfonction du greffon à long terme autant au niveau du cœur que du rein (224, 225). Grossièrement, le rejet se caractérise par une réaction fibroproliférative progressive perçue au niveau des vaisseaux de l'organe transplanté conduisant au développement de la fibrose (131). Cette dysfonction vasculaire est, entre autre, due à l'infiltration de cellules mononuclées, à l'accumulation de cellules musculaires lisses, de myofibroblastes et conséquemment de tissu conjonctif ayant pour effet de dupliquer la couche vasculaire élastique, de favoriser la formation néointimale et d'augmenter l'épaisseur du vaisseau tout en restreignant sa lumière (131). Plusieurs évidences suggèrent aujourd'hui un rôle central pour les cellules endothéliales dans l'initiation et la perpétuation de cette réponse fibroproliférative (226-233). La dysfonction des CE se caractérise, entre autres, par l'activation de l'apoptose et d'une réaction auto-immune anormale (234). Plus précisément, le comportement des CE s'en trouve affecté et a pour conséquences d'augmenter leur propriété adhésive et leur perméabilité membranaire, d'induire la production de facteurs procoagulants, de molécules vasoactives, de cytokines et de facteurs de croissance, le tout ayant influence sur l'environnement local (235). En situation normale, les cellules endothéliales peuvent, selon les conditions de l'environnement, générer des molécules effectrices qui inhibent la thrombose, l'inflammation, la

tonification vasculaire et le remodelage vasculaire (236). En situation pathologique, ces paramètres sont modifiés et conduisent au développement de la fibrose et à la dysfonction de l'organe transplanté.

Il existe divers facteurs de risque à la transplantation qui doivent être considérés dans l'évolution du rejet chronique d'allogreffe. En fait, lors de greffes d'organes, les cellules endothéliales de la paroi vasculaire représentent la première cible de la réponse humorale et cellulaire en raison de leur position stratégique à l'interface entre le tissu greffé et le sang du receveur (237). En plus de l'ischémie froide et de l'âge qui représentent des facteurs contribuant à l'apoptose des cellules endothéliales lors de transplantations, les anticorps circulants et les effets cytotoxiques des cellules immunitaires du receveur sont causes de perturbations vasculaires au niveau de l'endothélium du greffon (237). Dans certains cas de rejet (principalement chronique), la cellule endothéliale est détruite, en présence du système du complément, par des anticorps anti-cellules endothéliales causant ainsi une dysfonction de l'endothélium et de la paroi vasculaire (238). Les dysfonctions endothéliales sont ensuite entretenues et progressivement aggravées par l'accumulation locale de macrophages et de lymphocytes T cytotoxiques (238). Ces phénomènes auront pour effet d'entretenir la réponse fibroproliférative néfaste à l'existence prolongée du greffon.



#### 1.2.4.3. Graft versus Host Disease

Le «Graft *versus* host disease» est la complication majeure retrouvée suite aux transplantations de moelle osseuse où les cellules souches hématopoïétiques semblent jouer un rôle important (239). C'est une maladie immunopathologique causée par les lymphocytes allogéniques matures présents dans le greffon du donneur (180, 240-242). Ces lymphocytes immunocompétents du donneur attaquent particulièrement l'épithélium et les tissus à prolifération rapide tels que le foie ou le conduit gastro-intestinal ainsi que la peau (243). Des évidences laissent aussi sous-entendre que du TNF $\alpha$  relâché par les lymphocytes ou l'activation du système de mort cellulaire perforine/granzyme par ces mêmes lymphocytes seraient cause de la pathogénèse du GvHD (180, 244-247). Au niveau de la phase tardive du GvHD où les attaques dermiques sont prédominantes, on observe une augmentation de l'apoptose au niveau des kératinocytes et une augmentation des infiltrats inflammatoires engendrant du coup la formation de cicatrices hypertrophiées (243, 248). Diverses études réalisées chez l'homme et dans des modèles animaux ont répertorié l'apoptose endothéliale comme évènement caractéristique au développement du GvHD (245, 249). Ces taux d'apoptose augmentés au niveau des CE ont été observés tant au niveau de la microvascularisation (250) qu'au niveau de la peau (251) faisant encore une fois des cellules endothéliales apoptotiques, des agitateurs pathologiques fort importants.

### 1.2.5. Endothélium et membrane basale

L'endothélium vasculaire est un épithélium pavimenteux simple, c'est-à-dire une monocouche de cellules endothéliales qui revêt l'ensemble du système circulatoire (252). Grâce à la jonction serrée des CE, l'endothélium est depuis longtemps considéré comme une barrière sélective et perméable permettant les échanges entre le sang et le tissu irrigué (236). Il est aussi en mesure de répondre aux stimuli de son environnement en générant des molécules effectrices pour réguler les processus de thrombose, d'inflammation, de tonus vasculaire et de remodelage vasculaire (236). En fait, l'endothélium intervient dans la coagulation du sang, métabolise certaines hormones circulantes, constitue une barrière sélective aux protéines plasmatiques, synthétise des facteurs de croissance qui agissent sur les cellules musculaires lisses et fibroblastes sous-jacents, métabolise des lipoprotéines et transporte des substances vasoactives dans la paroi vasculaire (238). En temps normal, ces activités régulées par les cellules endothéliales assurent le bon fonctionnement de la fluidité sanguine, du tonus vasculaire et des réponses immunologiques. Cependant, un stimulus pro-inflammatoire entraîne quelques changements au niveau du comportement des CE, entre autres, l'activation de l'apoptose endothéliale. Elles expriment alors des molécules d'adhésion qui viendront favoriser un phénotype procoagulant et pro-thrombotique où l'agrégation de plaquettes et de monocytes sera favorisée comme on le retrouve en microangiopathie thrombotique et en rejet chronique d'allogreffe (131, 253, 254). À titre d'exemple, il a été démontré que l'apoptose des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC), via une boucle paracrine, favorise l'expression des molécules d'adhésion cellulaire vasculaire (VCAM-1) et les

molécules d'adhésion intercellulaire (ICAM-1) chez les cellules endothéliales environnantes (255). Dans la possibilité où le stimulus pro-apoptotique perçu au niveau de l'endothélium est prolongé ou très intense, il pourrait y avoir développement d'une réponse à l'insulte exagérée et pro-fibrotique caractéristique de plusieurs maladies vasculaires.

La première fonction de la membrane basale (ou sous-endothélium) est d'assurer l'intégrité structurale et l'élasticité des vaisseaux sanguins (253). En plus de ce rôle, elle participe à la filtration sanguine, influence le métabolisme cellulaire, organise les protéines au niveau des membranes plasmiques adjacentes, induit la différenciation cellulaire et sert d'autoroutes spécifiques à la migration cellulaire (132). La membrane basale est structurée en forme de feuillet et forme une partie hautement spécialisée de la matrice extracellulaire pouvant être à la fois en contact avec les cellules endothéliales et le tissu conjonctif interstitiel permettant ainsi des interactions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire (256). Quant à sa composition, on y retrouve différents types de protéines comme les collagènes (principalement de type IV), les laminines, les nidogènes et les protéoglycans (256, 257). Chacune de ces composantes se retrouve d'ailleurs avec des fonctions spécifiques. Par exemple, les fibres de collagène de type I sécrétées par les cellules endothéliales sont capables d'influencer la prolifération des CE tandis que la laminine facilite leur adhésion et leur multiplication (238). D'autres molécules telles que la thrombospondine, la fibronectine et la vitronectine permettent respectivement un détachement, un support de prolifération et une fixation des cellules endothéliales (238). Les nidogènes, quant

à eux, seraient impliquées dans les interactions entre les réseaux de collagène et de laminine (258).

Les protéoglycans, dans leur cas, sont le pivot des interactions existant entre les éléments cellulaires de la paroi vasculaire et les éléments environnants de la matrice extracellulaire (259). Les protéoglycans, retrouvés en bonne quantité au niveau de la membrane basale, représentent l'un des groupes de molécules les plus complexes et multivalents retrouvés au niveau de tissus mammifères (260). Par exemple, le perlécan produit par les CE représente un immense protéoglycan d'environ 480 kD, initialement impliqué dans l'embryogénèse et tardivement abondamment retrouvé au niveau de la membrane basale où il compose la structure des parois vasculaires et autres structures extracellulaires (261).

#### 1.2.5.1. Perlécan

Le perlécan (Figure 3) consiste en un long corps protéique ayant une structure complètement modulaire et substituée de plusieurs chaînes latérales de sulfate d'héparane (HS) et sulfate de chondroïtine (CS) (261). Pour ce qui est du corps protéique du perlécan, il est divisé en 5 domaines (I à V) (256, 259, 262), chacun ayant été cloné pour en étudier les relations, structures et fonctions. Brièvement, le domaine I a plusieurs sites d'ancrage pour les glycosaminoglycans HS et CS, tous deux ayant été associés à des interactions avec la laminine-1 et le collagène IV (263, 264). Par ailleurs, ces chaînes latérales glycosylées ont été impliquées dans la liaison et l'activation du FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) (265, 266) tandis que la liaison

du PDGF (Platelet Derived Growth factor) aux glycosaminoglycans du domaine III a aussi été répertoriée au niveau des interactions impliquant le perlécan et la matrice extracellulaire (267). Le domaine II, quant à lui, comprend quatre régions homologues à la portion du domaine de liaison au ligand du récepteur aux LDL (256). Le domaine IV est riche en modules immunoglobuline (IgG) en plus d'être reconnu pour entretenir plusieurs interaction avec son environnement : nidogènes, complexes laminine-nidogène, fibronectine et fibuline-2 (268). Le domaine V du perlécan se retrouve en C-terminal de la protéine et entretient aussi, tout comme le domaine IV, beaucoup d'interactions avec son environnement, mais on y retrouve aussi d'autres domaines importants à la fonction de la protéine (269). Le domaine V consiste en une structure de 3 domaines LG (« Laminin-type G domain ») séparés par quatre modules EGF (« Epidermal Growth Factor-like module ») et portant aussi un site d'ancrage pour la CS (261).

La structure imposante et l'abondance du perlécan au niveau de la membrane basale et de la matrice extracellulaire corrélerent bien avec les rôles qui lui sont associés quant à l'organisation supramoléculaire de la membrane basale et des interactions cellule-matrice extracellulaire, à la relâche de diverses cytokines, au contrôle de la protéolyse extracellulaire et à la filtration macromoléculaire (270, 271). Le perlécan s'avère donc être un joueur potentiellement important dans les mécanismes de réparation induit suite à une insulte endothéliale au sens où ses capacités d'interactions avec son environnement permettront une meilleure communication intercellulaire au niveau de la paroi vasculaire. À titre d'exemple,

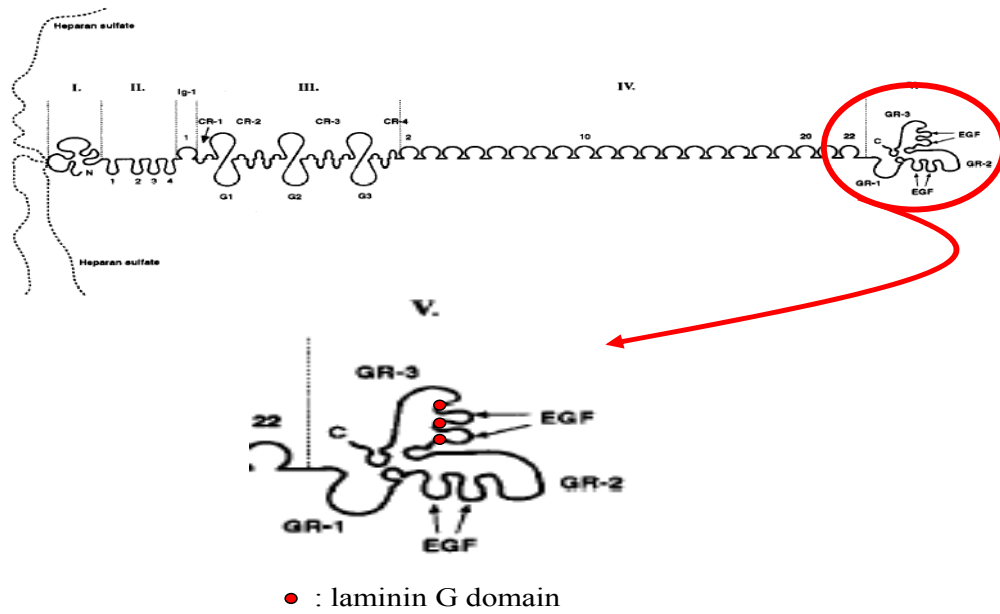


Figure 3. Représentation schématique de la structure du protéoglycan perlécan adapté de Kallunki *et al.* (256). Long corps protéique à multidomaines (I à V) globulaires substitué de chaînes latérales de sulfate d'héparane (HS) et de sulfate de chondroïtine (CS). Plus précisément, le domaine I en N-terminal comprend des sites d'ancrage pour l'HS, le domaine II comprend quatre régions homologues à la portion du

domaine de liaison au ligand du récepteur aux LDL (#1 à 4), le domaine III possède trois domaines globulaires (G1 à G3) connectés par des régions riches en cystéine (CR-1 à CR-4), le domaine IV est constitué d'une répétition de 21 séquences homologues aux immunoglobulines (IgG) tandis que le domaine V en C-terminal possède trois régions homologues au domaine G de la laminine-1 (GR-1 à GR-3) séparées par quatre modules de type EGF.

l'équipe du *Dr. Iozzo* a récemment démontré qu'un fragment C-terminal du perlécan portant le troisième motif LG3 de la protéine est en mesure d'interagir avec la paroi vasculaire de cellules endothéliales via une liaison aux intégrines de type  $\alpha 2\beta 1$  (272). L'existence de cette relation sera d'ailleurs traitée dans le projet de recherche ici présenté.

#### 1.2.5.2. Connective tissue growth factor

Tout comme le perlécan, le CTGF est aussi produit par les CE. Identifié en 1991 à partir du milieu de culture issu de HUVEC, le CTGF est une protéine sécrétée de 37 kD qui appartient à la famille CCN (Cystein rich 61 (cyr61), Connective tissue growth factor (CTGF), Nephroblastoma overexpressed (nov)) initialement caractérisé pour sa capacité à stimuler la synthèse d'ADN et le chémotaxisme chez les fibroblastes (273-275). Ces protéines matricellulaires sécrétées ayant des structures apparentes sont impliquées dans plusieurs processus physiologiques tels que l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation et la synthèse de matrice extracellulaire (276, 277). Bien qu'étant minimalement exprimé au niveau des tissus adultes quiescents, le gène codant pour le CTGF est fortement surexprimés dans plusieurs pathologies associées au stress mécanique telles que l'hypertension, la surcharge hémodynamique et l'obstruction artérielle (278). Plusieurs évidences dans la littérature indiquent que le gène CTGF, tout comme le gène Cyr61, est rapidement induit au niveau des cellules en culture en réponse aux stimuli physiques et chimiques si bien que cette rapide expression pourrait être précurseur des changements



phénotypiques cellulaires perçus à long terme (275-277). En ce sens, Cyr61 et CTGF se retrouvent souvent co-exprimés lorsque les cellules sont exposés à différentes hormones, facteurs de croissance, molécules inflammatoires ou agents apoptotiques (278). Entre autres, le TGF- $\beta$ 1, le VEGF («Vascular endothelial growth factor»), le FGF, l'angiotensine II, les prostaglandines, la thrombine, l'estrogène et des facteurs pro-apoptotiques tels que le TNF- $\alpha$  et l'hypoxie sont en mesure d'induire l'expression de CTGF et de Cyr61 (279-284). Le CTGF est de plus en plus associé au développement de pathologies fibrotiques autant en néphrologie qu'en dermatologie. En effet, le CTGF est maintenant considéré comme un biomarqueur dans le développement de la fibrose post-greffe rénale (160), dans les cas de néphropathies associés au diabète de type I (160) et dans l'établissement de la sclérose systémique (285). Du côté expérimental *in vivo*, le CTGF a aussi été associé au développement de la fibrose. Des injections sous-cutanées de CTGF chez la souris entraînent la formation de nodules contenant des fibroblastes et de la matrice extracellulaire (286) tandis que la surexpression de CTGF par un système adénoviral facilite le développement de la fibrose suite à une exposition à la bléomycine (287).

Structurellement, le CTGF (Figure 4) comprend 4 domaines conservés placés en aval d'un peptide signal en N-terminal de 37 acides aminés (288). Suivant le peptide signal, le CTGF est composé du domaine IGFB («Insulin-like growth factor-binding domain») suivi du domaine VWF («von Willebrand factor (VWF) type C repeat»), puis du domaine TSP-1 («Thrombospondin type I repeat») et finalement du domaine

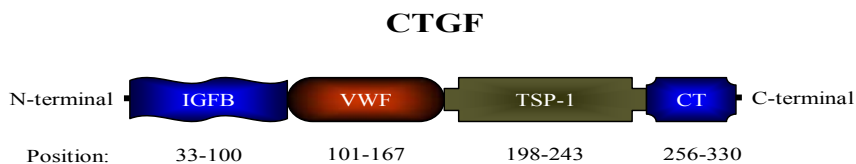


Figure 4. Représentation schématique de la structure du Connective tissue growth factor (CTGF). La structure est composée de 4 domaines principaux suivants un peptide signal de 37 a.a situé en N-terminal. On retrouve les domaines IGFB («Insulin-like growth factor-binding domain»), VWF («von Willebrand factor (VWF) type C repeat»), TSP-1 («Thrombospondin type I repeat») et finalement, CT («Cystine knot») en C-terminal.

C-terminal CT («Cystine knot») (289). Cette architecture est aussi partagée par les autres membres de la famille CCN (161). Le domaine le plus important contenu au niveau du CTGF quant à la réalisation du projet de recherche ici présenté est le domaine VWF. Une étude réalisée par l'équipe du *Dr. De Robertis* a montré que le CTGF via son domaine VWF est en mesure de lier le TGF- $\beta$ 1 favorisant ainsi la liaison du TGF- $\beta$ 1 à son propre récepteur (161). Il est aussi important de noter que le promoteur au niveau du gène CTGF possède un élément de réponse au TGF- $\beta$ 1 suggérant ainsi la possibilité d'une boucle d'amplification pro-fibrotique. Conséquent à ces observations, l'induction du phénotype myofibroblastique et la déposition de collagène médiées par le TGF- $\beta$ 1 chez les fibroblastes peuvent être inhibés à l'aide d'anticorps neutralisant contre le CTGF (290, 291) montrant ainsi l'existence d'une relation synergique entre ces deux facteurs de croissance impliqués dans la fibrogénèse. La fonction des autres domaines présents sur le CTGF est peu définie. Le domaine IGFB est en mesure de lier faiblement l'IGF («Insulin Growth factor») (292), le domaine TSP-1 est impliqué dans des liaisons avec la matrice extracellulaire et le VEGF (293, 294) tandis que le domaine CT a un rôle de dimérisation plutôt nébuleux (295).

D'un point de vue fonctionnel, le CTGF (ou CCN2; nommé ainsi selon l'ordre d'apparition des membres de la famille) est intéressant de par son activité pro-fibrotique. Des quantités élevées de CTGF ont été retrouvées au niveau de lésions fibrotiques au niveau de la peau, des poumons et des reins (274). En accord avec ces

découvertes, de récentes études ont permis d'identifier deux effets biologiques distincts médiés par le CTGF : 1. la partie N-terminale du CTGF est associée aux processus de différenciation myofibroblastique et de synthèse de collagène tandis que 2. la partie C-terminale est associée à la prolifération de fibroblastes (296). Par contre, les voies de signalisation par lesquelles le CTGF médie ces effets sont inconnues de même que le récepteur par lequel il interagit (161). Des hypothèses ont été avancées quant à des liaisons possibles du CTGF avec le «Low-density lipoprotein receptor-related protein» ou quelques intégrines (entre autres  $\alpha3\beta1$ ,  $\alpha5\beta1$  et  $\alpha6\beta1$ ), mais les conséquences intracellulaires de ces interactions sont peu définies (281, 297-299). Retenons cependant que le CTGF, tout comme le perlécan, est un élément présent dans l'environnement de plusieurs tissus qui a la capacité d'interagir et d'influencer le destin des cellules qui les composent. Par contre, ces cellules sont aussi soumises aux multiples interactions avec la matrice extracellulaire amplifiant ainsi la complexité de la réponse pro-fibrotique activée chez le fibroblaste.

### *1.3. Interactions cellule-matrice extracellulaire*

#### *1.3.1. Aperçu*

La plasticité cellulaire, au sens où la cellule adapte son comportement d'une façon dépendante à la nature de son microenvironnement, est une qualité exceptionnelle qui favorise l'homéostasie (168). Ainsi, des changements rapides et dynamiques se produisent chez certaines cellules lors d'une altération de leur environnement respectif; ce que l'on retrouve souvent dans des exemples d'insulte tissulaire,

d'inflammation et de réparation. Les fibroblastes sont reconnus comme étant des participants actifs dans ces processus de remodelage de par leur habileté exceptionnelle à se différencier et à se dédifférencier en réponse aux stimuli extracellulaires (134, 300). Il devient alors important, dans les mécanismes de remodelage, que les cellules effectrices entretiennent une bonne communication avec la matrice extracellulaire de façon à favoriser une réponse régulée et sécuritaire. Les récepteurs de type intégrine sont classiquement associés à cette bonne communication. Tel que discuté un peu plus haut, les complexes fibronexus du proto-myofibroblaste (ou fibronexus supermatures chez les myofibroblastes), composés principalement de fibronectine et d'actine, sont un exemple d'interaction cellule-matrice extracellulaire impliquée dans les processus de réparation, mais il en existe bien d'autres. Les différents types de collagène contenus dans la matrice extracellulaire peuvent aussi influencer sur la prolifération, l'adhésion, la migration et la différenciation cellulaire en se liant à certains protéoglycans transmembranaires retrouvés à la surface cellulaire (301, 302). Ces derniers peuvent aussi se lier à d'autres éléments de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et la thrombospondine (303).

### 1.3.2. Matrice extracellulaire

Bien qu'en apparence passive, la matrice extracellulaire est une structure active et très dynamique de par sa capacité à se renouveler continuellement (304). La matrice extracellulaire est d'ailleurs une composante importante dans l'architecture de l'organisme et ce, tout au cours du développement de l'organisme et durant les

processus de réparation tissulaire. La matrice extracellulaire est dynamique aussi au sens où elle entretient plusieurs interactions avec son environnement lui permettant de répondre aux changements du milieu tout en modulant l'activité fonctionnelle des cellules avoisinantes. N'oublions pas que la matrice extracellulaire joue un rôle central dans les mécanismes de réparation, mais où une déposition excessive de ses éléments peut contribuer à une réponse inflammatoire chronique causant la dégénération du tissu ou la dysfonction d'un organe. La matrice extracellulaire n'est donc plus considérée comme une charpente inerte ne servant qu'à stabiliser les structures physiques d'un tissu (305), mais bien une entité active régulée par son environnement.

Une part substantielle du volume tissulaire est l'espace extracellulaire principalement composé d'un réseau de macromolécules qui constituent la matrice extracellulaire. Cette matrice est composée d'une variété de protéines et polysaccharides sécrétés localement et organisés en réseaux permettant une association avec la surface des cellules qui les ont sécrétés (132). La composante principale de la matrice extracellulaire est le collagène, incluant tous les membres de sa famille : plus de 20 répertoriés à ce jour (306-309). On y retrouve aussi des fibres élastiques, des glycosaminoglycans (GAG), des protéoglycans et des glycoprotéines adhésives (303). Les différentes combinaisons, orientations et organisations spatiales possibles de ces substances sécrétées donnent lieu à la formation d'une variété de réseaux structuraux caractéristiques aux différents tissus et organes qui composent notre corps (303).

Les tissus devant résister aux différentes forces de tension, de pression et de stress comme les tendons, les vaisseaux et la peau ont leur collagène organisé en fibrilles, une caractéristique essentielle leur permettant de développer une force de tension (305). Seulement les collagènes de type I, II, III, V et XI peuvent s'assembler en fibrilles. Le collagène de type I se retrouve partout dans notre corps, à l'exception des cartilages, mais est majoritairement retrouvé au niveau des tendons, de la peau et des cicatrices hypertrophiées (305). Le collagène de type III est principalement concentré au niveau des parois vasculaires et des organes où il peut s'associer avec le collagène de type I (305). Le collagène de type II est surtout retrouvé au niveau de l'œil tandis que les collagènes de type V et XI ont plus un rôle de coopération avec le collagène I (305). Ces types de collagène sont, en grande partie, synthétisés par les cellules présentes au niveau de la matrice extracellulaire comme les fibroblastes, les myofibroblastes, les ostéoblastes et les chondrocytes. D'autres cellules, comme les cellules épithéliales et endothéliales sont aussi capables de synthétiser du collagène, principalement de type IV (305).

Tel que décrit un peu plus haut, les laminines, nidogènes et protéoglycans comme le perlécan font aussi partie de la matrice extracellulaire, mais sont surtout concentrés au niveau de la membrane basale (305). Une autre composante importante de la matrice extracellulaire est les métalloprotéinases (MMPs), une classe d'enzyme protéolytique reconnue pour leur participation dans les mécanismes de dégradation de la matrice extracellulaire (305). La famille des MMPs compte environ une vingtaine

de membres (310) qui ont besoin, pour la plupart, d'être sécrétés pour se retrouver au niveau de la matrice extracellulaire. Plusieurs types de cellules sont d'ailleurs capables de produire certaines MMPs comme les cellules épithéliales et endothéliales, les fibroblastes et myofibroblastes et les leucocytes (305). Plusieurs types de cellules tumorales ont aussi la capacité de sécréter ces enzymes, ce qui facilite leur invasion (311). Les MMPs, de par leur capacité à dégrader la matrice extracellulaire, jouent un rôle physiologique important au cours du développement, du remodelage vasculaire et de la réparation tissulaire. Par contre, elles jouent aussi un rôle pathologique dans des conditions d'inflammation et d'invasion tumorale (312-315). Plusieurs pistes intéressantes ont été avancées quant à la compréhension des mécanismes pathologiques induits par les MMPs. Par exemple, plusieurs facteurs de croissance comme le FGF et TGF- $\beta$ 1 peuvent être libérés à partir d'éléments de la matrice extracellulaire suite au clivage par certaines MMPs. Entre autres, le clivage du perlécan par les MMPs 1 et 3 relâche le domaine FGF tandis que le clivage de la décorine par les MMPs 2-3 et 7 engendre la libération de TGF- $\beta$  (316, 317). De plus, les MMPs 2 et 9 peuvent aussi directement cliver et activer le TGF- $\beta$  en un ligand actif (318). Les MMPs représentent donc un facteur potentiellement dangereux au cours du remodelage vasculaire au sens où un excès de leur activité pourrait suractiver les mécanismes de différenciation myofibroblastique TGF- $\beta$  dépendant et donc favoriser une réponse pro-fibrotique.



### 1.3.2.1. Transforming growth factor beta-1

La régulation de la biodisponibilité du TGF- $\beta$  est un bon exemple d'interaction cellule-matrice extracellulaire. Plusieurs évidences suggèrent que la signalisation dépendante au TGF- $\beta$  est consécutive de l'interrelation existante entre cette cytokine et la matrice extracellulaire environnante (319). En fait, la biodisponibilité du TGF- $\beta$  actif est régulée à plusieurs niveaux incluant la sécrétion et l'interaction avec la matrice extracellulaire (319). Le TGF- $\beta$  est synthétisé sous forme de protéines précurseurs qui sont protéolytiquement activés (319). Le peptide signal est initialement retiré du précurseur lors de son passage à travers le réticulum endoplasmique et ensuite, suite à une dimérisation, une autre protéolyse survient par l'action d'une endoprotéase de la famille des convertases (320). Cette dernière, la furine, clive le précurseur en deux peptides : le peptide mature C-terminal et le précurseur restant en N-terminal (aussi appelé LAP pour «Latency associated peptide») et ce, à l'intérieur des vésicules de sécrétion ou tout simplement dans l'espace extra-cellulaire (321). Le contrôle et la localisation de l'endoprotéase responsable du clivage sont reconnus comme étant des importants régulateurs des niveaux de TGF- $\beta$  produits (319). Ensuite, le TGF- $\beta$  mature et le peptide LAP s'associent de façon non-covalente pour former le petit complexe latent (ou SLC pour «Small latent complex»). La fonction du LAP est de protéger les épitopes actifs du TGF- $\beta$  de façon à inhiber son interaction potentielle avec son récepteur spécifique (322). Le SLC s'attache ensuite d'une façon covalente au LTBP («Large latent TGF $\beta$ -binding protein») pour former le complexe latent large (ou LLC pour «Large

latent complex») (323, 324). Suite à sa sécrétion, le LLC s'associe à la matrice extracellulaire via le domaine N-terminal de LTBP et cette interaction est supportée par une liaison covalente croisée à la transglutaminase (325). Le domaine LTBP a plusieurs fonctions : il localise le complexe TGF $\beta$  à des endroits spécifiques, il stabilise les complexes latents du TGF $\beta$  et il régule son activité à la surface cellulaire (319, 326). En ce qui concerne la localisation du TGF $\beta$ , le LTBP, de par ses interactions en N-terminal avec la fibronectine extra-cellulaire, permet d'entreposer la cytokine pro-fibrotique par excellence à travers la matrice extracellulaire de façon à la rendre facilement accessible au besoin (319). Afin d'activer le TGF $\beta$  latent pour le rendre disponible aux cellules avoisinantes, le LLC doit être libéré de la matrice extracellulaire. À cet effet, plusieurs protéases ont été identifiées comme étant capable d'effectuer cette action dont la plasmine, la thrombine et l'élastase (322). Par la suite, le clivage du domaine LTBP s'effectue classiquement par l'activation de BMP1 («Bone morphogenetic protein-1») et ce à deux endroits spécifiques permettant le clivage subséquent du LAP par les MMPs (en particulier MMP2) et la libération du TGF- $\beta$  mature actif (319). Ce dernier sera ensuite en mesure d'interagir avec son récepteur spécifique à la surface de la cellule. L'activation parallèle des récepteurs de type intégrines peut venir favoriser une signalisation TGF- $\beta$  dépendante efficace; une situation retrouvée dans divers processus fibrotiques (168, 178).

### 1.3.3. Intégrines

Il devient difficile de donner des exemples d'interactions cellule-matrice extracellulaire dans un contexte pro-fibrotique sans parler des récepteurs intégrines. Les intégrines représentent un large groupe d'une famille de glycoprotéines qui ont des structures hétérodimériques formées par l'association non-covalente de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (303). Le groupe a ainsi été sous-divisé en fonction de l'identité de la sous-unité  $\beta$ , ce qui a donné lieu à l'identification de 24 complexes intégrines  $\alpha\beta$  différents chez les mammifères (327). Globalement, la spécificité de la liaison à la matrice extracellulaire dépend du domaine extracellulaire de la sous-unité  $\alpha$ , mais n'exclut pas la participation de la sous-unité  $\beta$ . En effet, en plus de participer activement à la signalisation intracellulaire qui découle de l'activation des intégrines, la sous-unité  $\beta$  participe à la formation du site d'ancrage des intégrines avec leurs ligands respectifs (303). Une fois les molécules de la matrice extracellulaire liées à leur récepteur intégrine spécifique, il y a changement de l'activité au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur lui permettant de s'associer au cytosquelette de la cellule. En fait, la liaison de la matrice extracellulaire au récepteur intégrine entraîne le regroupement et l'activation des sous-unité  $\alpha\beta$ , l'activation de protéines kinases intracellulaires, la phosphorylation d'éléments du cytosquelette et ensuite la transmission de l'information au noyau et à la machinerie transcriptionnelle (328). Ceci aura pour effet d'engendrer le réarrangement du cytosquelette pouvant affecter la forme de la cellule et ainsi, son habileté à proliférer ou à se différencier (329). On considère cette signalisation comme étant de type « outside-in », mais l'utilisation des

intégrines peut aussi mener à une signalisation « inside-out » où une signalisation intracellulaire permettrait un changement conformationnel des sous-unités  $\alpha\beta$  du récepteur intégrine le rendant ainsi plus ou moins susceptible d'interagir avec son ligand spécifique de la matrice extracellulaire (327, 330). La plupart des composantes de la matrice extracellulaire peuvent être reconnues par un ou plusieurs récepteurs intégrine (331), mais la réponse à ces interactions n'est pas connue dans tous les cas.

D'un point de vue fonctionnel, les intégrines représentent une composante importante dans le contrôle de l'intégrité chez les organismes multicellulaires de par leur capacité à contrôler la motilité et la forme des cellules (332). Le cytosquelette d'actine est donc la cible de prédilection des intégrines favorisant ainsi une connexion mécanique efficace entre la cellule et sa matrice extracellulaire environnante (332). Cette connexion des intégrines est aussi impliquée dans la déposition et la dégradation d'éléments de la matrice extracellulaire (332). Suite à leur activation, les intégrines peuvent activer du côté intracellulaire plusieurs protéines de type tyrosine kinase incluant la kinase FAK, les SFK et la kinase ILK («Integrin-linked kinase») (333-336). Le rôle de ces kinases suite à l'activation des intégrines n'est pas tout à fait déterminé, mais plusieurs voies de signalisation portant sur FAK et les SFK ont été caractérisées incluant des voies portant sur les processus de prolifération, d'apoptose et de différenciation cellulaire (337-339). C'est donc dire que la signalisation médiée par les intégrines en réponse aux interactions cellule-

matrice extracellulaire, en concert avec la signalisation médiée par les divers facteurs de croissance environnant, crée un microenvironnement tissulaire spécifique à la cellule modulant ainsi son destin. Malheureusement dans certains cas, les intégrines et la signalisation qui découle de leur activation peuvent être impliquées dans le développement de la fibrose.

#### 1.3.3.1. Focal adhesion kinase et Proline rich tyrosine kinase 2

Focal adhesion kinase (FAK) est une protéine particulièrement importante dans la transmission du signal relayé par les intégrines et dans la réponse fibrotique. Elle est localisée préférentiellement près des intégrines au niveau des complexes d'adhérence et a été impliquée dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires comme la migration et la survie (340). FAK, tout comme Pyk2, fait partie d'une famille récemment décrite, la famille des kinases de l'adhérence focale correspondant à des protéines tyrosine kinase cytoplasmiques riches en proline et dépourvues de récepteur membranaire (340). FAK est une protéine d'un poids moléculaire de 125 kD de structure très conservé au sein des espèces qui ne possède ni de région transmembranaire ni domaines SH2 ou SH3 (340). Elle est divisée en trois domaines : un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal délimitant un domaine central portant l'activité catalytique (341). La région FAT («Focal adhesion targeting») située en C-terminal est nécessaire pour la localisation dans le complexe d'adhérence par l'intermédiaire de liaisons avec la taline et la paxilline, soient deux protéines abondamment retrouvées au niveau du cytosquelette (340). La taline permet l'interaction avec le réseau de filaments d'actine nécessaire pour l'activation

de FAK et la transmission des signaux (342). La région FERM («FAK N-terminal band 4.1, ezrin, radixin, moesin homology domain») située en N-terminal est impliquée dans les interactions avec les domaines cytoplasmiques des récepteurs transmembranaires (343). La fonction exacte de cette région semble peu définie, mais pourrait, entre autres, être impliquée dans la liaison de FAK à la sous-unité  $\beta$  des intégrines (344). Les intégrines, les facteurs de croissance comme l'IGF et les hormones peuvent activer FAK (345-348). Suivant l'activation, FAK subit une phosphorylation en cascade de résidus tyrosine. En premier lieu, il y a autophosphorylation du résidu tyrosine 397 qui est le témoin de son activation (347). Cette phosphorylation libère un site de liaison de forte affinité pour des protéines contenant des domaines SH2. Les kinases de la famille Src (SFK, discuté plus bas) sont principalement recrutées à ce site où elles iront phosphoryler d'autres résidus tyrosine dans le domaine catalytique (Y407, Y576 et Y577) ainsi que dans la région C-terminale (Y861 et Y925) de FAK. Particulièrement, la phosphorylation des tyrosines 576 et 577 par Src augmente l'activité enzymatique de FAK tout en permettant la création de nouveaux sites de liaison pour d'autres effecteurs (349, 350). Dans un second temps, différentes protéines vont subir à leur tour une activation entraînant la mise en route de voies régulatrices importantes comme celles des MAPK (Mitogen activated protein kinase»). Pour sa part, la PI3K (aussi discutée plus bas) a la propriété de se lier à FAK activé directement via le site tyrosine 397 qui libère, lorsque phosphorylé, un site de liaison pour la sous-unité régulatrice p85 de

PI3K (351). La fixation de p85 va permettre l'activation de PI3K par le complexe FAK-Src entraînant ainsi l'activation d'Akt.

La «Proline rich tyrosine kinase» (Pyk2) est aussi une protéine tyrosine kinase cytoplasmique associée à la FAK qui peut être activé par une multitude de stimuli associés à une élévation de calcium (352). Cependant, l'élévation de calcium intracellulaire n'est pas suffisante à l'activation de Pyk2, mais semble aussi dépendre de l'activation des intégrines  $\alpha 5\beta 3$  dans certains systèmes cellulaires (353, 354). Pyk2 et FAK sont approximativement identiques à 60% dans leur domaine catalytique et 40% dans leur région N et C-terminal (355-357). Les deux kinases partagent une grande homologie de structure dans la mesure où sa région catalytique est aussi flanquée de régions non-catalytiques en N et C-terminal, respectivement représentées par les domaines FERM et FAT (358). Leurs domaines C-terminal respectifs confèrent une régulation différentielle de par une localisation cellulaire différente des kinases et de par des associations avec des protéines du cytosquelette (352). À l'inverse de FAK qui est exprimée de façon ubiquiste, Pyk2 est exprimée de façon spécifique à certaines cellules ou à certains tissus (359). Les fibroblastes, les CE et les cellules musculaires lisses font, entre autres, partie des cellules qui expriment Pyk2 (360-362). On retrouve généralement cette protéine dans la cellule au niveau des régions cytoplasmiques et périnucléaires, mais elle peut aussi se retrouver au niveau de foyers d'intégrines suivant leur activation (363). Tout comme le site Y397 de FAK, l'autophosphorylation de Pyk2 au site tyrosine 402 (Y402)

permet son interaction avec des partenaires de type kinase tels que Src et PI3K, via leur domaine SH2 («Src Homology 2») respectif, permettant ainsi la transmission des signaux en aval des intégrines (359). La phosphorylation subséquente des sites tyrosines 579 et 580 au niveau du domaine catalytique de Pyk2, souvent attribuée aux SFK, permet une activation maximale de la protéine (358).

#### 1.3.3.2. Src family kinase

Les kinases de la famille Src sont impliquées dans presque tous les champs des processus cellulaires ce qui inclut, entre autres, la réponse aux intégrines, aux cytokines, aux facteurs de croissance et aux régulateurs de l'apoptose faisant de ce groupe de protéines un joueur potentiel dans les processus fibrotiques (364). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou de constructions dominantes négatives a permis de mieux définir le rôle exact des différentes kinases contenues dans la famille SFK. Par ailleurs, l'utilisation de modèle «knock-out» chez la souris a davantage éclairé notre compréhension sur les voies de signalisation qui impliquent les SFK ainsi que sur les pathologies qui en découlent. (364). Globalement, les membres de la famille SFK sont : Src, Fyn, Yes, Lck, Hck, Fgr, Lyn, Blk et Yrk qui ont approximativement tous un poids moléculaire de 60 kD (365). Leur structure aussi est similaire et elle consiste en un domaine N-terminal unique, suivi d'un domaine SH3 et d'un domaine SH2 et finalement d'un domaine tyrosine kinase (364). Certains des membres de la famille s'expriment sous deux protéines distinctes de par des mécanismes d'épissage alternatif comme, par exemple, Src, au niveau des neurones, possède un exon supplémentaire au niveau du domaine SH3 qui code pour



6 acides aminés (366). Le domaine tyrosine kinase est responsable de l'activité catalytique de la protéine et possède deux résidus critiques à sa régulation : un site d'autophosphorylation requis pour l'activation de la kinase et un résidu tyrosine en C-terminal qui régule négativement la kinase de par une liaison à son propre domaine SH2 engendrant, du coup, une conformation inactive (repliée) de la protéine (364). La kinase Csk est responsable de la régulation négative des SFK puisqu'elle phosphoryle le résidu tyrosine en C-terminal permettant la liaison au domaine SH2 et la formation d'une conformation inactive de la protéine. Des protéines tyrosine phosphatases telle que PTP- $\alpha$  s'occupent de la déphosphorylation de ce résidu rétablissant ainsi la conformation et l'activité des SFK (364, 367). Cette activation des SFK initie généralement des voies de signalisation PI3K et/ou MAPK dépendantes selon le contexte et le type cellulaire (368). La littérature montre d'ailleurs un rôle important des SFK dans l'inhibition de l'anoïkis et dans la stimulation de la prolifération au niveau des cellules épithéliales et ce, par des voies PI3K dépendantes (368, 369).

#### 1.3.3.3. Phosphatidylinositol-3 kinase

Le transfert des signaux intégrines dépendants (Figure 3) de la membrane plasmique jusqu'au compartiment nucléaire implique un processus complexe et séquentiel qui dépend grandement des molécules lipidiques de type inositol (370, 371). Il existe plusieurs formes de phosphoinositide 3-kinases (PI3K) chez les eucaryotes, mais c'est surtout la classe enzymatique Ia qui est principalement utilisée

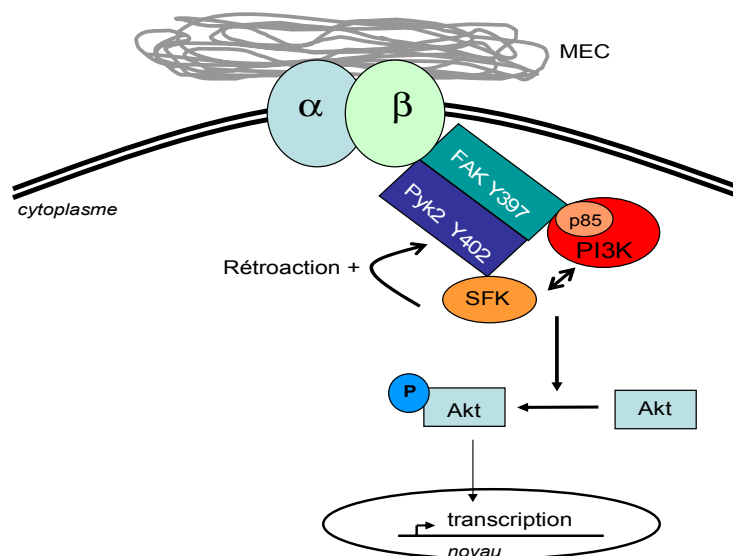


Figure 5. Signalisation intégrine dépendante. La région N-terminale de FAK et Pyk2 est impliquée dans la liaison à la sous-unité  $\beta$  des intégrines. S'en suit une autophosphorylation de résidus tyrosine (Y397 et Y402) créant des sites de liaison de type SH2 que sont capables de reconnaître les SFK et PI3K. La phosphorylation subséquente de Akt pourra moduler la transcription génique. Notons que ce complexe protéique est en mesure d'interagir avec des protéines du cytosquelette telles que la taline et l'actine (voir texte).

pour la production des phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) en réponse aux facteurs de croissance et/ou à l'activation des intégrines (370). Les enzymes de la classe PI3K-Ia sont des hétérodimères formés d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice (372). La sous-unité régulatrice (p85) maintient la sous-unité catalytique (p110) dans un état réprimé au niveau des cellules quiescentes, mais favorise aussi son activation suite à des interactions avec des résidus phosphotyrosines suivant la stimulation cellulaire (372). La PI3K activée convertit les lipides phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) de la membrane plasmique en PIP3 (372). Les protéines ayant un domaine d'homologie pour la pleckstrine (domaine PH) s'accumulent ensuite aux sites d'activation de PI3K en se liant aux PIP3. À cet effet, l'association de PIP3 à la membrane permet le recrutement de Akt (ou protéine kinase B (PKB)) à la membrane et, par un phénomène de proximité, facilite sa phosphorylation par PDK1 («Phosphoinositide-dependent kinase-1») (373). Cette phosphorylation stimule l'activité catalytique de Akt résultant en une cascade de phosphorylation impliquée dans divers processus biologiques incluant le développement de la fibrose (194, 372). Akt est, en fait, le substrat privilégié de la PI3K et est un important régulateur de la prolifération, du métabolisme et de la survie de plusieurs types cellulaires (374). Cette protéine, lorsque phosphorylée et activée, a une capacité d'action pouvant, entre autres, agir dans le noyau au niveau de la transcription de certains gènes apoptotiques (194). De plus, certaines hypothèses, dont les nôtres, tendent à croire que la voie de signalisation PI3K/Akt pourrait aussi être responsable de la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste et subséquent du développement de la fibrose (375, 376). À titre de régulateur

négatif, la phosphatase PTEN («Phosphatase and TENsin homolog») est en mesure de déphosphoryler PIP3 et régénérer le PIP2 (372). La perte de PTEN a été répertoriée dans plusieurs cas de cancer et de désordre fibroprolifératifs (377). Il existe d'ailleurs plusieurs autres exemples où un dérèglement de la signalisation intracellulaire mène au développement de pathologies fibrotiques surtout lorsque ceux-ci affectent l'apoptose et la différenciation des fibroblastes.

#### 1.3.4. Signalisation versus apoptose

Un régulateur important de l'apoptose est l'adhésion intégrine dépendante. Le détachement de cellules à partir de la matrice extracellulaire par une perte d'ancrage est la cause de la mort cellulaire apoptotique de plusieurs types cellulaires. Ce type d'apoptose est d'ailleurs nommé anoïkis (378, 379). Les intégrines ont la propriété d'inhiber l'anoïkis en assurant l'ancrage des cellules à la matrice extracellulaire tout en activant des voies de signalisation pro-survie et en inhibant les voies de signalisation pro-apoptotiques. Une récente étude publiée par *Reginato et al.* a démontré que la protéine pro-apoptotique Bim est réprimée d'une façon dépendante de l'activation des ERK1/2 («Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2») chez les cellules épithéliales adhérentes à la matrice extracellulaire. Ils ont montré, à l'aide de leur système expérimental, que la liaison de l'intégrine  $\beta 1$  à la matrice environnante est à la fois nécessaire à l'activation du récepteur EGF et de la voie de signalisation ERK1/2 prévenant ainsi du même coup l'expression protéique de Bim et l'anoïkis (53). Par ailleurs, plusieurs autres voies intégrines dépendantes utilisent l'activité de

FAK intracellulaire pour parvenir à induire un phénotype anti-apoptotique. L'équipe du *Dr. Thannickal* a montré que le TGF- $\beta$ 1 protège les myofibroblastes contre l'apoptose induite par la carence en sérum et ce, d'une façon autocrine et par l'activation d'une voie PI3K/Akt dépendante (174). Dans une étude plus récente, cette même équipe a montré l'importance de l'activation de FAK dans l'établissement de cet effet anti-apoptotique (169). En fait, l'inhibition de FAK est souvent associée à l'activation de l'anoïkis (380, 381). L'activation séquentielle des intégrine, de FAK et de la voie PI3K/Akt favorise la survie de plusieurs types cellulaires dont les fibroblastes qui utilisent la sous-unité  $\beta$ 1 intégrine à cette fin (170, 382-384). En fait, Akt est reconnue pour sa capacité à inactiver les protéines pro-apoptotiques Bad, Bim et caspase-9 en plus d'avoir plusieurs répercussions au niveau de la transcription de gènes anti-apoptotiques (53, 385, 386). L'activation de la voie apoptotique intrinsèque par une cellule en désir de mourir peut être fortement influencée par les membres pro et anti-apoptotique de la famille des Bcl-2 qui peuvent, quant à eux, être régulés par la voie PI3K/Akt (387). À cet effet, *Raina et al.* ont récemment montré que l'expression de Bcl-Xl, sous contrôle de la voie PI3K/Akt, est en mesure d'induire un phénotype anti-apoptotique chez des fibroblastes (388). Aussi, bien qu'étant exprimée dans plusieurs types de cellule, on retrouve une bonne concentration de protéines Bcl-Xl au niveau de l'épiderme où elle semble y jouer un rôle dans la protection de la peau contre l'apoptose induite par les rayons UV (Ultraviolet) (389). Les relations cellule-matrice extracellulaire, via les intégrines, représentent donc une source importante de régulation de l'apoptose. Les

différentes voies de signalisation ainsi induites suite à l'activation des intégrines sont donc importantes et potentiellement pathologiques à l'établissement des différents phénotypes apoptotiques.

### 1.3.5. Signalisation versus différenciation myofibroblastique

Les intégrines  $\alpha 2\beta 1$  ont de leur côté été répertoriées chez des fibroblastes en culture pour avoir un rôle dans la contraction de la matrice collagèneuse (170). Ces forces de tension exercées sur la matrice extracellulaire sont normalement caractéristiques au développement de la différenciation myofibroblastique, ce qui suggère un rôle important pour les intégrines dans ce processus. À cet effet, *Thannickal et al.* ont récemment démontré que la différenciation myofibroblastique induite par la liaison de TGF- $\beta 1$  aux fibroblastes est dépendante de l'activation de la FAK; cette activation étant pour sa part dépendante de l'adhésion de la cellule à la matrice via ses intégrines transmembranaires (possiblement  $\alpha 4\beta 1$  ou  $\alpha 5\beta 1$ ) (168). L'activation des FAK par phosphorylation crée un site d'ancrage pour la PI3K qui s'en trouve du coup activée (390). On se doit donc de considérer la voie de signalisation PI3K/Akt dans les processus de différenciation myofibroblastique et ce, d'un point de vue normal et pathologique. Le rôle exact de la FAK sur la différenciation myofibroblastique et la transcription de gènes qui lui sont caractéristiques reste cependant à confirmer, mais plusieurs évidences laissent croire à un rôle important, voire essentiel (168). En effet, l'activité de la FAK pourrait à la fois être dépendante de l'adhésion de la cellule à son environnement et/ou de la

signalisation intracellulaire activée par des facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ 1, soient deux sources distinctes de signalisation pouvant être impliquées dans la différenciation myofibroblastique. L'intégrine  $\beta$ 1 est connue pour induire la survie des fibroblastes via un mécanisme PI3K/Akt dépendant en réponse aux stimuli de la matrice extracellulaire environnante. Parallèlement, une voie similaire FAK-PI3K/Akt dépendante des interactions du fibroblaste avec la matrice extracellulaire régule les mécanismes de différenciation myofibroblastique (169, 198). En ce qui a trait à la voie de signalisation PI3K/Akt, nous savons qu'elle joue un rôle central dans l'ensemble des activités cellulaires ayant à la fois des impacts sur l'apoptose, la différenciation myofibroblastique et possiblement le développement de la sclérose systémique. C'est donc une voie de signalisation à surveiller.

## **2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIF**



## 2.1. *Prémisses*

L'atteinte endothéliale est un évènement initial impliqué dans le remodelage tissulaire pathologique et est caractérisée par une augmentation de l'apoptose des CE au site d'insulte.

L'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique au niveau des fibroblastes et myofibroblastes suite à l'apoptose des CE représente un facteur clé dans le développement de plusieurs pathologies à connotation fibrotique telles que la sclérose systémique et le rejet chronique d'allogreffe.

Le déséquilibre entre les taux d'apoptose des différents constituants cellulaires impliqués dans les processus de réparation joue donc un rôle important dans les pathophysiologies du remodelage tissulaire.

Cependant, les relations existantes entre l'apoptose des CE et le développement de la fibrose sont aujourd'hui encore mal définies.

## 2.2. Hypothèse

Des données obtenues au laboratoire du Dre Hébert ont déjà démontré que l'apoptose endothéliale entraîne la libération de nouveaux médiateurs paracrins qui ont la propriété d'inhiber l'apoptose des CE et des cellules musculaires lisses. Par ailleurs, ces mêmes médiateurs sont en mesure de favoriser un phénotype anti-apoptotique et myofibroblastique au niveau des fibroblastes sous contrôle de voies de signalisation PI3K-dépendantes. Un fragment C-terminal du perlécan a été identifié à cet effet comme médiateur potentiel.

Ces répercussions caractéristiques aux divers programmes apoptotiques pourraient être mises en marche de façon à stimuler le remodelage vasculaire et donc la réparation du tissu/vaisseau tout en empêchant une dénudation de la paroi.

Nous posons donc l'hypothèse suivante :

L'apoptose des CE permet la libération d'un fragment tronqué de perlécan qui, suite à une interaction avec les intégrines présentes à la surface du fibroblaste, favorisera dans un premier temps un état de résistance à l'apoptose et plus tardivement un phénomène de différenciation myofibroblastique.

### 2.3. Objectifs

Mon projet de doctorat consistait à

1- Définir la réponse anti-apoptotique induite chez les fibroblastes par le fragment C-terminal du perlécan et ce, en amont de l'activation de PI3K.

En bref :

1.1.- Identifier le(s) récepteur(s) impliqué(s) dans la transmission du signal anti-apoptotique au niveau du fibroblaste exposé au perlécan

1.2.- Caractériser la signalisation intracellulaire reliant le récepteur impliqué dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique à l'activation de PI3K.

2- Définir la réponse myofibroblastique induite chez les fibroblastes par les médiateurs issus de l'apoptose endothéliale, et ce en amont de l'activation de PI3K.

En bref :

2.1.- Identifier le(s) médiateur(s) produit(s) par les CE apoptotiques responsable(s) de la différenciation myofibroblastique

2.2.- Caractériser la signalisation intracellulaire impliquée dans la différenciation myofibroblastique jusqu'à l'activation de PI3K.

3- Évaluer les conséquences de ces découvertes dans un modèle de fibrose *in vivo*.

### **3. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX**

3.1 Article #1

**Perlecan proteolysis induces an  $\alpha2\beta1$  integrin and Src-family kinases dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation**

par

Patrick Laplante, Marc-André Raymond, Andrée Labelle, Jun-Ichi Abe, Renato V. Iozzo, Marie-Josée Hébert

publié le 13 octobre 2006 dans *The Journal of Biological Chemistry*

Rôle des coauteurs dans cet article :

-Patrick Laplante a planifié et réalisé les expériences présentées dans l'article qui suit. En fait, il a caractérisé à lui seul le phénotype anti-apoptotique induit chez le fibroblaste par les médiateurs issus de CE apoptotiques. Par ailleurs, il a su analyser et interpréter les résultats générés ce qui lui a permis d'écrire l'article en question avec l'aide du D<sup>re</sup> Hébert, son directeur de recherche.

-Marc-André Raymond a continuellement généré le milieu conditionné par des CE apoptotiques (SSC) en plus de participer à sa caractérisation biochimique.

-Andrée Labelle a généré au laboratoire le peptide recombinant représentant le motif LG3 du perlécan.

-Jun-Ichi Abe est un collaborateur qui a fourni les fibroblastes déficients pour les kinases Src et Fyn.

-Renato V. Iozzo a fourni un second peptide recombinant représentant le motif LG3 du perlécan en plus de participer activement aux discussions portant sur la rédaction de l'article.

-Marie-Josée Hébert a joué un rôle déterminant au niveau de la planification des expériences et de la rédaction de l'article.

**ABSTRACT**

Dysregulation of apoptosis in endothelial cells (EC) and fibroblasts contributes to fibrosis. We showed previously that apoptosis of EC triggers the proteolysis of extracellular matrix (ECM) components and the release of a C-terminal fragment of perlecan which in turn inhibits apoptosis of fibroblasts. Here we define the receptors and pathways implicated in this anti-apoptotic response in fibroblasts. Neutralizing  $\alpha 2\beta 1$  integrin activity in fibroblasts exposed to either medium conditioned by apoptotic EC (SSC) or a recombinant perlecan C-terminal fragment (LG3) prevented resistance to apoptosis and was associated with decreased levels of Akt phosphorylation. Co-incubation of fibroblasts for 24 hours with SSC or LG3 in presence of PP2 (AG1879), a biochemical inhibitor of Src family kinases (SFK) and focal adhesion kinase (FAK), showed a significantly decreased anti-apoptotic response. However, FAK gene silencing with RNA interference did not inhibit the anti-apoptotic response in fibroblasts. Src phosphorylation was increased in fibroblasts exposed to SSC and transfection of fibroblasts with constitutively active Src mutants induced an anti-apoptotic response which was not further increased by SSC. Also, Src<sup>-/-</sup> Fyn<sup>-/-</sup> fibroblasts failed to mount an anti-apoptotic response in presence of SSC for 24 hours but developed a complete anti-apoptotic response when exposed to SSC for 7 days. These results suggest that ECM fragments produced by apoptotic EC initiate a state of resistance to apoptosis in fibroblasts via an  $\alpha 2\beta 1$  integrin/SFK (Src and Fyn)/PI3K dependent pathway. On the long-term, additional SFK members are recruited for sustaining the anti-apoptotic response which could play crucial roles in abnormal fibrogenic healing.

## INTRODUCTION

Fibrotic diseases are characterized by increased deposition of extracellular matrix (ECM) components associated with persistent accumulation of fibroblasts and myofibroblasts, a specialized type of fibroblasts implicated in repair processes at sites of tissue injury (1-4). The mechanisms leading to fibrosis include a chronic state of resistance to apoptosis in fibroblasts and myofibroblasts during the resolution phase of the repair response, thus preventing clearance of unneeded cells (2,5,6). The persistent deposition of ECM components favors the deformation of the injured tissue leading to progressive loss of function (2,7). Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway and up-regulation of the anti-apoptotic gene Bcl-x<sub>L</sub> have been documented within fibroblasts or myofibroblasts in various fibrogenic models and conditions, including systemic sclerosis, chronic transplant vasculopathy and bleomycin-induced lung fibrosis (8-10). Inhibition of PI3K activation or use of Bcl-x<sub>L</sub> antisense oligonucleotides in animal models of fibrosis were shown to prevent resistance to apoptosis in fibroblasts and myofibroblasts and attenuated fibrogenic changes (9-11). Hence, fibroblasts play an important role in tissue repair but their survival has to be tightly regulated to avoid maladaptive and pathogenic healing processes.

In various fibrotic diseases, increased apoptosis of endothelial cells (EC) has been shown to precede recruitment of fibroblasts (12-16). Our group showed that apoptosis of EC induces ECM proteolysis leading to the production of novel cryptic fibrogenic factors (17,18). In turn, these ECM fragments inhibit apoptosis of fibroblasts, enhance production of collagen I by fibroblasts and favor



myofibroblast differentiation (18). These anti-apoptotic and potentially fibrogenic mediators are released specifically by apoptotic cells since inhibition of apoptosis in EC with either pan-caspase inhibition or overexpression of Bcl-x<sub>L</sub> prevented the release of anti-apoptotic factors (17,18). Hence, we proposed that sustained EC apoptosis represents a novel mechanism for initiating and/or perpetuating fibrogenic changes (13,18).

We identified a C-terminal fragment of perlecan as one of the ECM-derived fibrogenic mediators produced by apoptotic EC (17,18). Perlecan is a large modular proteoglycan present in the basement membrane and produced by cellular constituents of the vessel wall, including EC (19,20). This C-terminal fragment inhibits apoptosis of fibroblasts through PI3K-dependent pathways leading to down-regulation of the pro-apoptotic protein Bim-EL and up-regulation of the anti-apoptotic protein Bcl-x<sub>L</sub> (18). Yet, the cell surface receptors and signaling pathways that initiate this anti-apoptotic response upstream of PI3K activation remain to be defined.

We showed previously that the laminin G motif (LG3) present on the C-terminal fragment of perlecan interacts with  $\alpha 2\beta 1$  integrin receptors on EC and thus induces a potent angiostatic response (21). Integrins are heterodimeric transmembrane receptors which exert a stringent control on cell survival, proliferation, migration and adhesion. Integrin-dependent PI3K activation has been classically attributed to the binding of activated Src to the p85 subunit of PI3K or from the autophosphorylation of FAK (Focal Adhesion Kinase) on Tyr<sup>397</sup> (22-24). Recent results suggest that activation of PI3K upon integrin ligation can also occur through other Src-dependent and FAK-independent pathways (25) or

via the membrane proximal part of the  $\beta 1$  integrin subunit in a FAK and Src-independent manner (26). Here we tested the hypothesis that ECM fragments produced by apoptotic EC, and more specifically the LG3 motif of perlecan, interact with integrin receptors on fibroblasts thus initiating integrin-dependent signaling events leading to the activation of a PI3K-dependent anti-apoptotic and potentially fibrogenic phenotype in fibroblasts.

## **METHODS**

### ***Cell lines***

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were obtained from Clonetics (San Diego, CA), grown in Endothelial Cell Basal Medium (EBM, Clonetics, San Diego, CA) and used at passages 2 to 4. WI-38 human fibroblasts from normal embryonic lung tissue were obtained from ATCC (Rockville, MD), grown in Fibroblast Basal Medium (FBM, Cambrex, Walkersville, MD) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS, Medicorp, Montreal, QC, Canada) and used at passages 2 to 17.

Fibroblasts genetically deficient for Src (Src<sup>-/-</sup>) and/or Fyn (Fyn<sup>-/-</sup>) were isolated from mouse embryo fibroblasts homozygous for disruption of the Src and/or Fyn genes and immortalized with large T antigen (27). Cells were kindly provided by Sheila M. Thomas (Cancer Biology Program, Beth Israel Deaconess Medical Center and Harvard Medical School, Boston, MA). Mouse fibroblasts were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% inactivated FBS.

### ***Production of recombinant C-terminal fragment of perlecan***

Production of a recombinant perlecan fragment containing the C-terminal laminin G-like motif (LG3) was performed as described previously (28). In brief, we cloned and purified the LG3 C-terminal fragment of the domain V of perlecan, corresponding to amino acids 4197 to 4391. RNA was extracted from HUVEC as described previously (17) and was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using the following primers for the LG3 motif : sense

5'-GCGGCCGCGATGCCCT-3', reverse 5'-GCGGCCGCCTACGAGGG-3'. The amplified cDNA sequence was cloned at the NotI restriction site in the pCEP4 plasmid vector modified by addition of a KOSAK sequence and a triple repeat HA sequence (kind gift from Dr. Richard Bertrand, University of Montreal, QC, Canada). Stable transformants were obtained in Namalwa cells (ATCC, Rockville, MD). Expression of the transgene was confirmed by immunoblotting using an anti-HA antibody (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). For production of recombinant protein, stable transformants were harvested, proteins were extracted as described above and purified on an anti-HA affinity matrix (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) according to the protocol provided by the manufacturer. A second recombinant human LG3 was also produced in 293-EBNA cells as described previously (29).

### ***Screening for apoptosis with fluorescence microscopy***

Fluorescence microscopy of unfixed/unpermeabilised adherent cells stained with Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1H-benzimidazole) (HT) and propidium iodide (PI) was used as described in our previous work (17,18,30). In brief, cells were grown to confluence in 24-well polystyrene culture plates (Corning Incorporated, Corning, NY). HT (1 µg/ml) was added for 10 min at 37°C and cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS). PI was added to a final concentration of 5 µg/ml immediately before fluorescence microscopy analysis (excitation filter  $\lambda = 360-425$  nm). The percentages of normal, apoptotic and necrotic cells adherent to the dish were estimated by an investigator blinded to the experimental conditions.

Viable cells display normal nuclear and cytoplasmic morphology and stain blue. Early apoptotic cells are characterized by cell shrinkage, nuclear condensation and preservation of plasma membrane integrity. Chromatin condensation is associated with enhanced fluorescence for HT (bright blue) whereas preservation of cell membrane integrity precludes PI staining. Late apoptotic cells (also called secondary necrosis) are characterized by presence of characteristic apoptotic nuclear changes and loss of cell membrane integrity associated with PI staining. Primary necrotic cells are characterized by increased cell size, absence of chromatin condensation and disruption of cell membrane integrity.

### ***Immunoblotting***

Proteins were extracted, separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed as we described previously (17,18,30). A polyclonal antibody directed against the C-terminal end of perlecan was synthesized in New Zealand white rabbits by Sigma Genosys (The Woodlands, TX), using a synthetic human C-terminal perlecan peptide as immunogen (amino acids 4351 to 4391 : GITGCVKNLVLHSARPGAPPPQPLDLQHRAQAGANTRPCPS). In brief, 2 rabbits were injected with a Keyhole Limpet haemocyanin conjugate of the synthetic peptide. The first injection (day 1) was done with 200 ug of conjugate per rabbit and was followed with 5 booster shots of 100 ug of conjugate at two weeks interval. One week following the last injection, rabbits were killed and exsanguinated. Preimmune serum was also prepared from blood and used as an

internal control. An ELISA was performed to confirm the affinity of test bleeds against the C-terminal perlecan peptide. The other antibodies used for western blotting were: anti-Bcl-x<sub>L</sub> (PharMingen, San Diego, CA), anti-Bim-EL (Calbiochem, San Diego, CA), anti-Phospho-FAK (Tyr<sup>397</sup>) (Calbiochem, San Diego, CA), anti-FAK (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-Phospho-Src (Tyr<sup>418</sup>) (Biosource, Camarillo, CA), anti-Src (Upstate Cell Signaling Solutions, Lake Placid, NY), anti-Phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) and anti-Akt (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA).

After initial probing, all membranes were stripped (2 % SDS, 100 mM β-mercaptoethanol and 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7) at 50°C for 30 min. with gentle shaking and reprobod with an anti-α-tubulin monoclonal antibody (Oncogene, Boston, MA) as a control for protein loading. Densitometric analyses were performed using AlphaImager 3.2 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

### ***Mammalian expression vectors and transfections***

The plasmid expressing a constitutively active Src mutant (*Src cDNA activated in pUSEamp-Y529F mutation*) was from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) and the expression plasmid encoding constitutively active Src tagged with GFP was a kind gift from M.Bouvier, University of Montreal. A control GFP plasmid (*pEGFP-C1*) was purchased from Clontech (Mountain View, CA). WI-38 fibroblasts were transfected with Lipofectine (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the protocol provided by the manufacturer. Briefly, WI-38 cells were plated onto 24-well plates at 20,000 cells per well and transfected for 8

hours with 1 $\mu$ g of plasmids using 5 $\mu$ L of Lipofectine. After 60 hours, cells were placed in experimental conditions for 24 hours followed by evaluation of apoptosis with fluorescence microscopy

### ***Immunoprecipitation of Focal Adhesion Kinase***

Five hundred  $\mu$ g of cell lysate were incubated with 2 $\mu$ g of FAK antibody at 4°C for 2 hours in 250 $\mu$ L of immunoprecipitation (IP) Buffer (1% Triton X-100, 250nM NaCl, 20mM Tris, 2mM EDTA, 2mM EGTA, 40 $\mu$ M leupeptin, 40 $\mu$ M pepstatin, 0.4mM PMSF, 4mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 50mM NaF; pH=7.4). Twenty-five  $\mu$ L of protein A/G-agarose were added and incubated for 2 hours at 4°C. Tubes were centrifuged, supernatants were harvested and pellets were washed four times in 200 $\mu$ L of IP Buffer. A fifth wash was done with a Tris Buffer pH7.0 (50mM Tris, 0.01% SDS). Pellets were dissolved in Laemmli reducing buffer to proceed to Western blot.

### ***RNA interference***

WI-38 fibroblasts were plated onto 6 well-plates and 24-well plates at 100,000 and 20,000 cells per well respectively. After 20 hours, cells were transfected with double-stranded RNA-DNA hybrids at a final concentration of 200nM annealed oligo using Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). After 45h of transfection, cells were placed in experimental conditions for 24 hours, followed by evaluation of apoptosis with fluorescence microscopy or evaluation of FAK protein levels by western blotting. Oligonucleotides were obtained from Dharmacon Research (Lafayette, CO). FAK sense was 5'-(AACCACCUGGGCCAGUAUUAU)d(TT)-

3', FAK antisense was 5'(AAAUAAUACUGGCCCCAGGUGG)d(TT)-3', control sense was 5'-(GACGUGGGACUGAAGGGGU)d(TT)-3', control anti-sense was 5'-(ACCCCUUCAGUCCCACGUC)d(TT)-3' as previously reported (31).

### ***Reagents***

4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine (PP2) and 4-Amino-7-phenylpyrazol[3,4-d]pyrimidine (PP3) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Anti- $\alpha 2\beta 1$  blocking antibodies were purchased from Chemicon International (Temecula, CA) and mouse IgG<sub>1</sub> were from R&D systems (Minneapolis, MN). All other reagents were from Sigma Chemicals (Oakville, ON, Canada).

***Statistical analysis.*** Results were expressed as mean  $\pm$  SEM. Data were analyzed using Student's T-test or ANOVA, as appropriate. A  $P < 0.05$  was considered significant for all tests.



## RESULTS

### *Anti-apoptotic activity of ECM fragments produced by apoptotic endothelial cells*

Serum-free medium conditioned by apoptotic EC (SSC) was generated as we described previously (17,18,30). In brief, apoptosis of HUVEC was induced with serum starvation for 4 hours to generate serum-free medium conditioned by apoptotic EC (SSC). We showed previously that fibroblasts exposed to SSC develop an anti-apoptotic response whereas exposure to serum-free medium conditioned by NON-apoptotic HUVEC does not induce an anti-apoptotic phenotype in fibroblasts (18). Fibroblasts exposed to SSC for 24 hours in presence of PP2, a Src family kinase (SFK) and FAK inhibitor, showed a complete blockade of the anti-apoptotic response (Fig 1A). PP3, the inactive control did not modulate the anti-apoptotic response of fibroblasts exposed to SSC (Fig 1A). PP2 alone did not induce or increase development of apoptosis in fibroblasts exposed to serum-free medium (SS) (apoptosis of fibroblasts exposed to serum-free medium in presence of PP2 or PP3 for 24 hours (% of apoptotic cells): SS + PP2 =  $2.32 \pm 0.59\%$ , SS + PP3 =  $1.33 \pm 0.81\%$ ,  $p > 0.34$ ,  $n=8$ ). PP2 also significantly reduced the anti-apoptotic response mounted by fibroblasts exposed to SSC for 7 days, albeit incompletely (Fig 1A).

We showed in previous work that a C-terminal fragment of perlecan is found in the biologically active fraction of SSC (18). To further prove that this C-terminal fragment of perlecan is released by apoptotic EC, we evaluated, by western blotting, the proteins levels of this perlecan fragment in SSC and in medium conditioned by NON-apoptotic EC (SSC-ZVAD). We generated serum-free medium conditioned by NON-apoptotic EC as described previously (18). In

brief, HUVEC were exposed to ZVAD-FMK (100  $\mu$ M) or vehicle (dimethylsulfoxide: DMSO) for 2 hours. ZVAD-FMK and vehicle were then removed, HUVEC were washed and serum starved for 4 hours. We showed previously that pre-incubation with ZVAD-FMK significantly decreased the percentage of apoptotic EC after 4 hours of serum starvation whereas pre-incubation with DMSO did not (17). We found, using an antibody directed against the C-terminal end of perlecan, that the level of this perlecan fragment is increased in SSC as compared to SSC-ZVAD or fresh serum-free medium (SS) (Fig 1B). No band of high molecular weight were found in SSC (Fig 1B), suggesting that uncleaved perlecan is not released in conditioned media and further supporting the contention that EC apoptosis activates ECM proteolysis. Fibroblasts exposed for 24 hours to serum-free medium (SS) supplemented with a recombinant peptide homologous to the C-terminal laminin G motif of perlecan (LG3) showed increased resistance to apoptosis as compared to SS alone (Fig 1C). A second recombinant LG3, tagged with a hemagglutinin motif also induced resistance to apoptosis in fibroblasts in a dose-dependant manner (data not shown). PP2 blocked the anti-apoptotic response induced by the LG3 recombinant peptide in fibroblasts whereas PP3 did not (Fig 1C), thus suggesting that LG3 and SSC initiate similar anti-apoptotic pathways in fibroblasts.

Fibroblasts exposed to the mediators released by apoptotic EC develop a state of resistance to apoptosis dependent on Bim-EL down-regulation and Bcl-x<sub>L</sub> up-regulation, both occurring downstream of PI3K activation (18). We found that phosphorylation of Akt is reduced in fibroblasts exposed to SSC in presence of PP2 as compared with SSC alone and PP3 (Fig 2A). This result suggests that a

member of SFK and/or FAK is/are activated upstream of PI3K. In support of this contention, modulations of Bim-E<sub>L</sub> (Fig 2B) and Bcl-X<sub>L</sub> (Fig 2C) protein levels were attenuated in fibroblasts exposed to SSC with PP2 for 24 hours and 7 days, but were conserved in presence of PP3. These results suggest that mediators produced by apoptotic EC inhibit apoptosis of fibroblasts through activation of SFK and/or FAK-dependent pathways.

*Activation of SFK is required for transduction of PI3K-dependent anti-apoptotic signals in fibroblasts*

We went on to determine which SFK in fibroblasts are implicated in the transduction of anti-apoptotic signals initiated by mediators produced by apoptotic EC. Fibroblasts exposed to SSC showed increased levels of Src phosphorylation (Fig 3A). Concomitant exposure to PP2 decreased Src phosphorylation as compared with SSC alone or SSC+PP3 (Fig 3A). To evaluate the functional importance of Src in our system, fibroblasts were transfected with a constitutively active Src-mutant, GFP-tagged constitutively active Src or GFP control. Fibroblasts untransfected or transfected with the GFP plasmid developed an apoptotic response when exposed to serum-free medium for 24 hours and this apoptotic response was blocked in presence of SSC (Fig 3B). However, fibroblasts transfected with active Src showed resistance to apoptosis in presence of serum-free medium (SS) for 24 hours and no further reduction of apoptosis was found after exposure to SSC (Fig 3B). These results demonstrate that Src inhibits apoptosis of serum-deprived fibroblasts. The absence of an additive effect in Src-

transfected fibroblasts exposed to SSC suggests that SSC induces resistance to apoptosis in fibroblasts through Src-dependent pathways.

To address further the functional importance of SFK in transduction of anti-apoptotic signals initiated by mediators released by apoptotic EC, fibroblasts from Src<sup>-/-</sup>, Fyn<sup>-/-</sup> and Src<sup>-/-</sup>Fyn<sup>-/-</sup> double knock-out mice were exposed to SSC followed by evaluation of apoptosis. All cell lines displayed increased apoptosis after exposure to serum-free medium for 24 hours as compared to normal medium (data not shown). Wild-type mouse fibroblasts showed a similar pattern of resistance to apoptosis than WI-38 fibroblasts when exposed to SSC (Fig 3C). We then evaluated whether mediators produced by apoptotic EC block apoptosis of Src<sup>-/-</sup> and/or Fyn<sup>-/-</sup> fibroblasts induced by serum starvation. Src<sup>-/-</sup> and Fyn<sup>-/-</sup> fibroblasts incubated for 24 hours in presence of SSC showed significantly less apoptosis as compared to SS (Fig 3C). However, Src<sup>-/-</sup>Fyn<sup>-/-</sup> fibroblasts failed to develop an anti-apoptotic response in presence of SSC (Fig 3C). These results suggest that the coordinate activation of Src and Fyn in fibroblasts exposed to SSC is needed for the transduction of anti-apoptotic signals initiated by SSC.

We also evaluated the importance of SFK on long-term development of resistance to apoptosis. In keeping with a partial blockade of the anti-apoptotic response in WI-38 fibroblasts by PP2 at 7 days (Fig 1A), Src<sup>-/-</sup>Fyn<sup>-/-</sup> fibroblasts developed an anti-apoptotic response in presence of SSC for 7 days (Fig 3C). These results suggest that, on the long term, additional mechanisms kick in to perpetuate the anti-apoptotic phenotype.

*FAK activity is dispensable for PI3K activation and development of an anti-apoptotic response*

We then evaluated whether FAK activation is necessary for transduction of the anti-apoptotic signals in fibroblasts exposed to mediators produced by apoptotic EC. Phosphorylation of FAK at Tyr<sup>397</sup> was not modulated in fibroblasts exposed to SSC, SSC+PP2 or SSC+PP3 for 2, 15 or 30 minutes (data not shown) whereas increased Src phosphorylation was already evident after exposure to SSC for 30 minutes (Fig. 3A). These results suggest that FAK is dispensable for the anti-apoptotic activity of SSC on fibroblasts. To further prove this contention, we evaluated the consequences of FAK gene silencing on the development of an anti-apoptotic response in fibroblasts exposed to SSC. Small interfering RNA for FAK effectively decreased FAK protein levels (Fig. 4A). However, FAK silencing did not alter the anti-apoptotic response normally induced by SSC in fibroblasts (Fig 4B). These results suggest that mediators released by apoptotic EC inhibit apoptosis of fibroblasts through a SFK and PI3K-dependent pathway, independently of FAK activation.

*$\alpha 2\beta 1$  integrins are activated upstream of Src and PI3K*

We then sought to define the cell surface receptor activated upstream of SFK in fibroblasts exposed to ECM-derived mediators produced by apoptotic EC and more specifically, the LG3 motif of the C-terminal fragment of perlecan (17,18). As  $\alpha 2\beta 1$  integrins have been implicated in the angiostatic activity of LG3 (21), we went on to test whether  $\alpha 2\beta 1$  integrins are required for transduction of anti-apoptotic signals in fibroblasts. Fibroblasts were pretreated for 30 minutes in

serum-free medium with a function-blocking antibody directed against  $\alpha 2\beta 1$  integrins (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or an isotype-matched control antibody followed by co-incubation with SSC for 24 hours. Neutralizing antibodies against  $\alpha 2\beta 1$  integrins abolished the anti-apoptotic activity normally induced by SSC in fibroblasts whereas the control isotype-matched antibody did not (Fig 5A). The neutralizing anti- $\alpha 2\beta 1$  integrins antibody also significantly decreased the anti-apoptotic response of fibroblasts exposed to recombinant LG3 (Fig 5B). Fibroblasts exposed to SSC in presence of the  $\alpha 2\beta 1$  antibody showed decreased Akt phosphorylation as compared with fibroblasts exposed to SSC alone or SSC + isotype-matched control antibody (Fig 5C). These results suggest that mediators produced by apoptotic EC, and more specifically the LG3 motif of cleaved perlecan, interact with  $\alpha 2\beta 1$  integrins leading to a SFK / PI3K dependent anti-apoptotic phenotype in fibroblasts.

## DISCUSSION

Dysregulation of the molecular control of apoptosis is an important contributor to fibrogenesis (2,7,18). In various fibrotic diseases, apoptosis of EC is an early event and precedes recruitment of fibroblasts, myofibroblast differentiation and sustained production of ECM components (8,12-16). Chronic accumulation of fibroblasts and myofibroblasts is a hallmark of fibrosis and appears to be due, at least in part, to development of a state of long-term resistance to apoptosis in fibroblasts (2,32,33). We showed previously that apoptosis of EC triggers the proteolysis of ECM components and the release of cryptic bioactive factors, which include a C-terminal fragment of perlecan (17,18). In turn, these ECM fragments inhibit apoptosis of fibroblasts and favor myofibroblast differentiation (18). Resistance to apoptosis in fibroblasts initiated by mediators produced by apoptotic EC was found to occur through PI3K-dependent downregulation of Bim-EL and long-term upregulation of Bcl-x<sub>L</sub> (18). Intriguingly, sustained activity of PI3K in fibroblasts has been reported in various fibrogenic conditions, including systemic sclerosis and bleomycin-induced lung fibrosis (8,10).

The goal of the present work was to define the receptors and pathways implicated in the activation of PI3K in fibroblasts exposed to mediators produced by apoptotic EC. Integrins are heterodimeric transmembrane receptors that play pivotal roles in regulation of cell survival (24). We showed that interactions between LG3 and  $\alpha 2\beta 1$  integrins are implicated in the angiostatic activity of the C-terminal fragment of perlecan (also called endorepellin) (21), which we characterized as one of the bioactive factors released by apoptotic EC (17,18). In the present work, we demonstrated that blockade of  $\alpha 2\beta 1$  integrins in fibroblasts

inhibits the anti-apoptotic response normally initiated by mediators produced by apoptotic EC and by recombinant LG3. In keeping with a pivotal role for the PI3K/Akt signaling pathway in our system, we found that neutralizing  $\alpha 2\beta 1$  integrins repressed Akt phosphorylation in fibroblasts exposed to SSC. Hence, ECM fragments released in association with EC apoptosis interact with  $\alpha 2\beta 1$  integrins on fibroblasts in order to induce a PI3K dependent anti-apoptotic phenotype.

Most integrins signal predominantly through the recruitment and activation of Src-family kinases (SFK) and FAK (24,26). PI3K is a downstream target of integrin-FAK/SFK pathways and can be activated through various and non-mutually exclusive pathways (34-36). Upon integrin ligation, activation of PI3K can result from the binding of the Src Homology 3 (SH3) domain of Src with a proline-rich region within the p85 subunit of PI3K or through interactions between p85 with tyrosine-phosphorylated docking proteins such as Cbl (22,23,37). Integrin-dependent FAK autophosphorylation on Tyr<sup>397</sup> may lead to the recruitment of Src Homology 2 domain (SH2) containing signaling proteins such as PI3K (22). Recent results suggest that the membrane proximal part of the  $\beta 1$  integrin subunit may also induce AKT phosphorylation independently of FAK and Src (26,38). Thus, the interplay between FAK, SFK and PI3K was expected to be of potential interest in our experimental system.

Fibroblasts exposed to SSC in presence of PP2 (or AG1879), a biochemical inhibitor of FAK and SFK, for 24 hours and up to 7 days showed respectively complete and partial inhibition of the anti-apoptotic response and decreased Akt phosphorylation. Two recombinant peptides containing the C-terminal laminin G



motif (LG3) of the domain V of perlecan induced resistance to apoptosis in fibroblasts and again, resistance to apoptosis was inhibited in presence of PP2.

Since PP2 may potentially block both FAK and SFK, we set out to characterize which pathway is indispensable for transduction of anti-apoptotic signals initiated by ECM fragments released by apoptotic EC. No changes in FAK phosphorylation on Tyr<sup>397</sup> were found in fibroblasts exposed to SSC. Also, FAK gene silencing with RNA interference, which resulted in a profound downregulation of FAK protein levels in fibroblasts, did not block the anti-apoptotic activity of mediators produced by apoptotic EC. These results demonstrated that FAK is dispensable for transduction of anti-apoptotic signals in this system and suggested that SFK may play a pivotal role. In support of this contention, we found that Src is phosphorylated in fibroblasts exposed to SSC and that concomitant exposure of fibroblasts to SSC and PP2 blocked Src phosphorylation. Also, fibroblasts transfected with constitutively active Src mutants developed an anti-apoptotic phenotype. Exposure to SSC did not increase further this anti-apoptotic response, suggesting that SSC and constitutively active Src activate similar downstream anti-apoptotic pathways. Finally, we found that Src<sup>-/-</sup> Fyn<sup>-/-</sup> double knock-out fibroblasts do not mount an anti-apoptotic response when exposed to SSC for 24 hours, whereas fibroblasts from wild-type controls and Src<sup>-/-</sup> or Fyn<sup>-/-</sup> single knock-out do. Src<sup>-/-</sup> Fyn<sup>-/-</sup> double knock-out fibroblasts did not show increased AKT phosphorylation after exposure to SSC (data not shown). These results demonstrate that the early development of resistance to apoptosis in fibroblasts exposed to mediators produced by apoptotic

EC relies on the coordinate activation of Src and Fyn, leading to PI3K activation and downstream activation of an anti-apoptotic response.

Long-term exposure of fibroblasts to SSC however was associated with development of a chronic state of resistance to apoptosis largely independent of Src or Fyn. Double knock-out fibroblasts developed an anti-apoptotic response of magnitude similar to wild-type controls or Src<sup>-/-</sup> or Fyn<sup>-/-</sup> single knock-out fibroblasts when exposed to SSC for 7 days. In keeping with these results, we found that WI-38 fibroblasts exposed to SSC for 7 days in presence of PP2 showed a decreased but still present anti-apoptotic response. PP2 may inhibit members of the SFK other than Src and Fyn (39), which may explain the apparent discrepancy between the decreased anti-apoptotic response in WI-38 fibroblasts exposed to PP2 and the complete anti-apoptotic response developed by Src<sup>-/-</sup> Fyn<sup>-/-</sup> double knock-out fibroblasts. These results suggest that, on the long-term, additional SFK members and pathways are recruited for sustaining the anti-apoptotic response which could play crucial roles in fibrogenesis.

Taken together, these results suggest that ECM fragments released during EC apoptosis, which include a C-terminal fragment of the domain V of perlecan, induce resistance to apoptosis in fibroblasts via an  $\alpha 2\beta 1$  integrin/SFK (Src and Fyn)/PI3K dependent pathway (Fig 6). The precise mechanisms responsible for activation of Src and Fyn by  $\alpha 2\beta 1$  integrins will be further delineated in future experiments. Direct interactions between the cytoplasmic tail of  $\beta 1$  integrins and Src and between Fyn and the  $\alpha$  subunit of various integrins have been characterized (24,40) and could be operational in our system. Also, the precise characterisation of the SFK members implicated in the development of a chronic

state of resistance to apoptosis in fibroblasts, and thus possibly in maladaptive healing, will also be the scope of future studies.

Competition of cell/matrix interactions by soluble peptide fragments derived from the proteolysis of ECM components (such as fibronectin, tenascin-L and SPARC) have been shown to interfere with integrin-dependent signaling and stimulate focal adhesion disassembly and cell death (41-44). Our results demonstrate that ECM fragments produced by apoptotic EC may also interact with integrin receptors to initiate potent anti-apoptotic pathways rather than pro-death signals. Fibroblasts play a beneficial role in the reconstruction of tissue architecture after injury. Increased resistance to apoptosis in fibroblasts at sites of EC injury could facilitate repair and likely represents a normal component of the healing response (2). Yet, a chronic state of resistance to apoptosis in fibroblasts has been implicated in inappropriate accumulation of fibroblasts at sites of injury and forms the basis of fibrotic diseases (2,7,13,18,32). The present results suggest that various members of the SFK cooperate to initiate and perpetuate an anti-apoptotic response in fibroblasts and suggest new targets to modulate regulation of fibroblast apoptosis at sites of pathological repair.

**Acknowledgements**

We thank the Fondation J. L. Lévesque for its support. We thank Dr. Michel Bouvier for its generous gift of plasmids.

**References**

1. Zhang, K., Rekhter, M. D., Gordon, D., and Phan, S. H. (1994) *Am J Pathol* 145, 114-125
2. Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R. A. (2002) *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 349-363
3. Kuhn, C., and McDonald, J. A. (1991) *Am J Pathol* 138, 1257-1265
4. Haber, P. S., Keogh, G. W., Apte, M. V., Moran, C. S., Stewart, N. L., Crawford, D. H., Pirola, R. C., McCaughan, G. W., Ramm, G. A., and Wilson, J. S. (1999) *Am J Pathol* 155, 1087-1095
5. Arora, P. D., and McCulloch, C. A. (1999) *Am J Pathol* 155, 2087-2099
6. Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. (1995) *Am J Pathol* 146, 56-66
7. Desmouliere, A., Darby, I. A., and Gabbiani, G. (2003) *Lab Invest* 83, 1689-1707
8. Jun, J. B., Kuechle, M., Harlan, J. M., and Elkon, K. B. (2003) *Curr Opin Rheumatol* 15, 756-760
9. Suzuki, J., Isobe, M., Morishita, R., Nishikawa, T., Amano, J., and Kaneda, Y. (2000) *Cardiovasc Res* 45, 783-787
10. Vittal, R., Horowitz, J. C., Moore, B. B., Zhang, H., Martinez, F. J., Toews, G. B., Standiford, T. J., and Thannickal, V. J. (2005) *Am J Pathol* 166, 367-375
11. Pollman, M. J., Hall, J. L., Mann, M. J., Zhang, L., and Gibbons, G. H. (1998) *Nat Med* 4, 222-227
12. Choy, J. C., Kerjner, A., Wong, B. W., McManus, B. M., and Granville, D. J. (2004) *Am J Pathol* 165, 127-133

13. Cailhier, J. F., Laplante, P., and Hebert, M. J. (2006) *Am J Transplant* 6, 247-253
14. Sgonc, R., Gruschwitz, M. S., Dietrich, H., Recheis, H., Gershwin, M. E., and Wick, G. (1996) *J Clin Invest* 98, 785-792
15. Shimizu, A., Yamada, K., Sachs, D. H., and Colvin, R. B. (2002) *Lab Invest* 82, 673-686
16. Shimizu, A., Yamada, K., Sachs, D. H., and Colvin, R. B. (2002) *Kidney Int* 61, 1867-1879
17. Raymond, M. A., Desormeaux, A., Laplante, P., Vigneault, N., Filep, J. G., Landry, K., Pshezhetsky, A. V., and Hebert, M. J. (2004) *Faseb J* 18, 705-707
18. Laplante, P., Raymond, M. A., Gagnon, G., Vigneault, N., Sasseville, A. M., Langelier, Y., Bernard, M., Raymond, Y., and Hebert, M. J. (2005) *J Immunol* 174, 5740-5749
19. Iozzo, R. V. (2001) *J Clin Invest* 108, 165-167
20. Iozzo, R. V. (1998) *Annu Rev Biochem* 67, 609-652
21. Bix, G., Fu, J., Gonzalez, E. M., Macro, L., Barker, A., Campbell, S., Zutter, M. M., Santoro, S. A., Kim, J. K., Hook, M., Reed, C. C., and Iozzo, R. V. (2004) *J Cell Biol* 166, 97-109
22. Chen, H. C., Appeddu, P. A., Isoda, H., and Guan, J. L. (1996) *J Biol Chem* 271, 26329-26334
23. Pleiman, C. M., Hertz, W. M., and Cambier, J. C. (1994) *Science* 263, 1609-1612
24. Guo, W., and Giancotti, F. G. (2004) *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 816-826

25. Moissoglu, K., Sachdev, S., and Gelman, I. H. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 330, 673-684
26. Velling, T., Nilsson, S., Stefansson, A., and Johansson, S. (2004) *EMBO Rep* 5, 901-905
27. Thomas, S. M., Soriano, P., and Imamoto, A. (1995) *Nature* 376, 267-271
28. Raymond, M. A., Desormeaux, A., Labelle, A., Soulez, M., Soulez, G., Langelier, Y., Pshezhetsky, A. V., and Hebert, M. J. (2005) *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1374-1382
29. Mongiat, M., Sweeney, S. M., San Antonio, J. D., Fu, J., and Iozzo, R. V. (2003) *J Biol Chem* 278, 4238-4249
30. Raymond, M. A., Vigneault, N., Luyckx, V., and Hebert, M. J. (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 291, 261-269
31. Duxbury, M. S., Ito, H., Benoit, E., Zinner, M. J., Ashley, S. W., and Whang, E. E. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 311, 786-792
32. Gabbiani, G. (2003) *J Pathol* 200, 500-503
33. Thannickal, V. J., Toews, G. B., White, E. S., Lynch, J. P., 3rd, and Martinez, F. J. (2004) *Annu Rev Med* 55, 395-417
34. Nho, R. S., Xia, H., Kahm, J., Kleidon, J., Diebold, D., and Henke, C. A. (2005) *J Biol Chem* 280, 26630-26639
35. Tian, B., Lessan, K., Kahm, J., Kleidon, J., and Henke, C. (2002) *J Biol Chem* 277, 24667-24675
36. Xia, H., Nho, R. S., Kahm, J., Kleidon, J., and Henke, C. A. (2004) *J Biol Chem* 279, 33024-33034
37. Dombrosky-Ferlan, P. M., and Corey, S. J. (1997) *Oncogene* 14, 2019-2024

38. Armulik, A., Velling, T., and Johansson, S. (2004) *Mol Biol Cell* 15, 2558-2567
39. Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M., and Cohen, P. (2003) *Biochem J* 371, 199-204
40. Arias-Salgado, E. G., Lizano, S., Sarkar, S., Brugge, J. S., Ginsberg, M. H., and Shattil, S. J. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13298-13302
41. Hadden, H. L., and Henke, C. A. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* 162, 1553-1560
42. Fukai, F., Mashimo, M., Akiyama, K., Goto, T., Tanuma, S., and Katayama, T. (1998) *Exp Cell Res* 242, 92-99
43. Maquart, F. X., Bellon, G., Pasco, S., and Monboisse, J. C. (2005) *Biochimie* 87, 353-360
44. Michel, J. B. (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 2146-2154



**Footnotes**

Financial support: This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (grant # MT-15447) and the Kidney Foundation of Canada to MJH. MJH is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec.

**Abbreviations**

HUVEC: Human umbilical vein endothelial cells, EC: Endothelial cells, ECM: Extra-cellular matrix, N: Normal medium, SS: Serum-free medium, SSC: Serum-free medium conditioned by apoptotic endothelial cells, SSC-ZVAD: Serum-free medium conditioned by NON-apoptotic endothelial cells, LG3: C-terminal laminin G motif of perlecan, SFK: Src family kinases, FAK: Focal adhesion kinase

### Figure Legends

**Figure 1.** Anti-apoptotic response induced by the third laminin G motif (LG3) of the C-terminal fragment of perlecan **A.** Left panel. Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to normal medium (N), serum-free medium (SS) and serum-free medium conditioned by apoptotic HUVEC (SSC) either alone, with PP2 (10uM) or control (PP3), \* $p < 0.05$  vs SS, & $p < 0.04$  vs SSC and PP3,  $n=4$ . Right panel. Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to N, SS and SSC either alone, with PP2 or control (PP3), \* $p < 0.0008$  vs SS, & $p < 0.00004$  vs SSC and PP3,  $n=18$ . Lower panel. Representative micrographs of WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to N, SS and SSC either alone, with PP2 or control (PP3), followed by staining with Hoechst 33342 (HT) and propidium iodide (PI). (Magnification 200X). **B.** SS, SSC and serum-free medium conditioned by HUVEC in which apoptosis was inhibited (SSC-ZVAD) were concentrated 25X by lyophilization and separated on SDS-PAGE. Immunoblotting was performed using an antibody directed against the C-terminal end of perlecan (anti-perlecan 1 ug/mL). **C.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to N, SS and SS supplemented with the LG3 recombinant peptide (1ug/mL) either alone, with PP2 or inactive control (PP3), \* $p < 0.05$  vs SS, & $p < 0.0003$  vs LG3 and LG3+PP3,  $n=7$ .

**Figure 2.** Molecular regulation of resistance to apoptosis in fibroblasts exposed to mediators produced by apoptotic EC. **A.** Immunoblotting analysis. Decreased phosphorylation of AKT in WI-38 fibroblasts exposed to SSC in presence of PP2 for 4 hours, as compared with control (PP3) and SSC alone. These results are

representative of 5 independent experiments. Autoradiographs were quantified by densitometric scanning for AKT phosphorylation relative to the amount of total AKT, SSC+PP2 was different from SSC and SSC+PP3,  $*p<0.02$ . **B.** Immunoblotting analysis. Increased protein levels of Bim-E<sub>L</sub> in WI-38 fibroblasts exposed to SS and SSC in presence of PP2 for 24 hours, as compared with control (PP3) and SSC alone. These results are representative of 3 independent experiments. Autoradiographs were quantified by densitometric scanning for Bim-E<sub>L</sub> relative to the amount of alpha tubulin. Percentage of Bim-E<sub>L</sub> expression is statistically higher with SSC+PP2 as compared to SSC and SSC+PP3,  $*p<0.02$ . **C.** Immunoblotting analysis. Decreased protein levels of Bcl-x<sub>L</sub> in WI-38 fibroblasts exposed to SSC in presence of PP2 for 7 days, as compared with control (PP3) and SSC alone. These results are representative of 4 independent experiments. Autoradiographs were quantified by densitometric scanning for Bcl-x<sub>L</sub> relative to the amount of alpha tubulin. Percentage of Bcl-x<sub>L</sub> expression is statistically lower with SSC+PP2 as compared to SSC and SSC+PP3,  $*p<0.05$ .

**Figure 3.** Mediators produced by apoptotic EC activate a SFK-dependent anti-apoptotic phenotype in fibroblasts. **A.** Immunoblotting analysis. Decreased Src phosphorylation in WI-38 fibroblasts exposed to SSC in presence of PP2 for 30 minutes, as compared with control (PP3) and SSC alone. These results are representative of 4 independent experiments. Autoradiographs were quantified by densitometric scanning for phosphorylated Src relative to total Src, SSC+PP2 was different from SSC and SSC+PP3,  $*p<0.03$ . **B.** WI-38 fibroblasts transiently transfected with : 1- no plasmid (control), 2- control *pEGFP-C1* plasmid (GFP),

3- plasmid encoding GFP-tagged Src (GFP-Src), 4- co-transfection of a constitutively active Src mutant (cDNA activated in *pUSEamp-Y529F* mutation) and *pEGFP-C1* (GFP+Src). Fibroblasts transfected with active Src developed an anti-apoptotic response even in presence of serum-free medium (SS) for 24 hours whereas untransfected fibroblasts or fibroblasts transfected with control GFP alone did not, \* $p < 0.01$  vs SS,  $n = 7$ . **C.** Left panel. Apoptosis (expressed as % relative to SS) was inhibited in WI-38, wild type (WT), Src<sup>-/-</sup> and Fyn<sup>-/-</sup> but not Src<sup>-/-</sup>Fyn<sup>-/-</sup> mouse fibroblasts exposed for 24 hours to SSC as compared to SS, \* $p < 0.0009$  vs SS,  $n = 6$ . Right panel. Apoptosis (expressed as % relative to SS) was inhibited in WI-38, wild type (WT), Src<sup>-/-</sup>, Fyn<sup>-/-</sup> and Src<sup>-/-</sup>Fyn<sup>-/-</sup> mouse fibroblasts exposed for 7 days to SSC as compared to SS, \* $p < 0.0002$  vs SS,  $n = 4$ .

**Figure 4.** FAK activation is dispensable in the development of an anti-apoptotic phenotype. **A.** Immunoblotting analysis. Decreased protein levels of FAK in WI-38 fibroblasts exposed to N, SS and SSC with FAK siRNA as compared with control siRNA. These results are representative of 6 independent experiments. Autoradiographs were quantified by densitometric scanning for FAK relative to the amount of alpha tubulin, \* $p < 0.05$  vs controls. **B.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts transfected with FAK siRNA or control siRNA before exposure to N, SS and SSC for 24 hours, \* $p < 0.0005$  vs SS,  $n = 10$ .

**Figure 5.**  $\alpha 2\beta 1$  integrin activation leads to a PI3K-dependent anti-apoptotic phenotype in fibroblasts. **A.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to N, SS or SSC, either alone, with a function-blocking

antibody against  $\alpha 2\beta 1$  integrin (10 ug/mL) or control mouse IgG<sub>1</sub>. \*p<0.05 vs SS, &p<0.05 vs SSC and IgG, n=13. **B.** Percentage of apoptotic cells in WI-38 fibroblasts exposed for 24 hours to N, SS or SS + recombinant LG3 (1ug/mL), either alone, with a function-blocking antibody against  $\alpha 2\beta 1$  integrin (10 ug/mL) or control mouse IgG<sub>1</sub>. \*p<0.05 vs SS, &p<0.03 vs SSC and IgG, n=14. **C.** Immunoblotting analysis. Decreased protein levels of AKT-PO<sub>4</sub> in WI-38 fibroblasts exposed to SSC concomitantly with  $\alpha 2\beta 1$  integrin blocking antibody for 4 hours, as compared with control (mouse IgG<sub>1</sub>) and SSC alone. These results are representative of 4 independent experiments. Autoradiographs were quantified by densitometric scanning for phosphorylated-AKT relative to the amount of total AKT, SSC+ $\alpha 2\beta 1$  was different from SSC and SSC+IgG, \*p<0.05.

**Figure 6.** Schematic diagram. EC apoptosis triggers the proteolysis of ECM components and the release of cryptic ECM derived bioactive factors, which include a C-terminal fragment of perlecan. The LG3 domain of the C-terminal fragment of perlecan interacts with  $\alpha 2\beta 1$  integrin receptors initially activating Src and Fyn-dependent pathways leading to activation of PI3K and repression of apoptosis. On the long-term additional members of the SFK are recruited to modulate Bcl-Xl protein levels through PI3K-dependent and possibly independent pathways implicated in the perpetuation of this anti-apoptotic phenotype. Sustained production of these cryptic factors would prevent apoptosis mediated clearance of fibroblasts at sites of injury, thus potentially fostering a fibrogenic response.

Figure 1

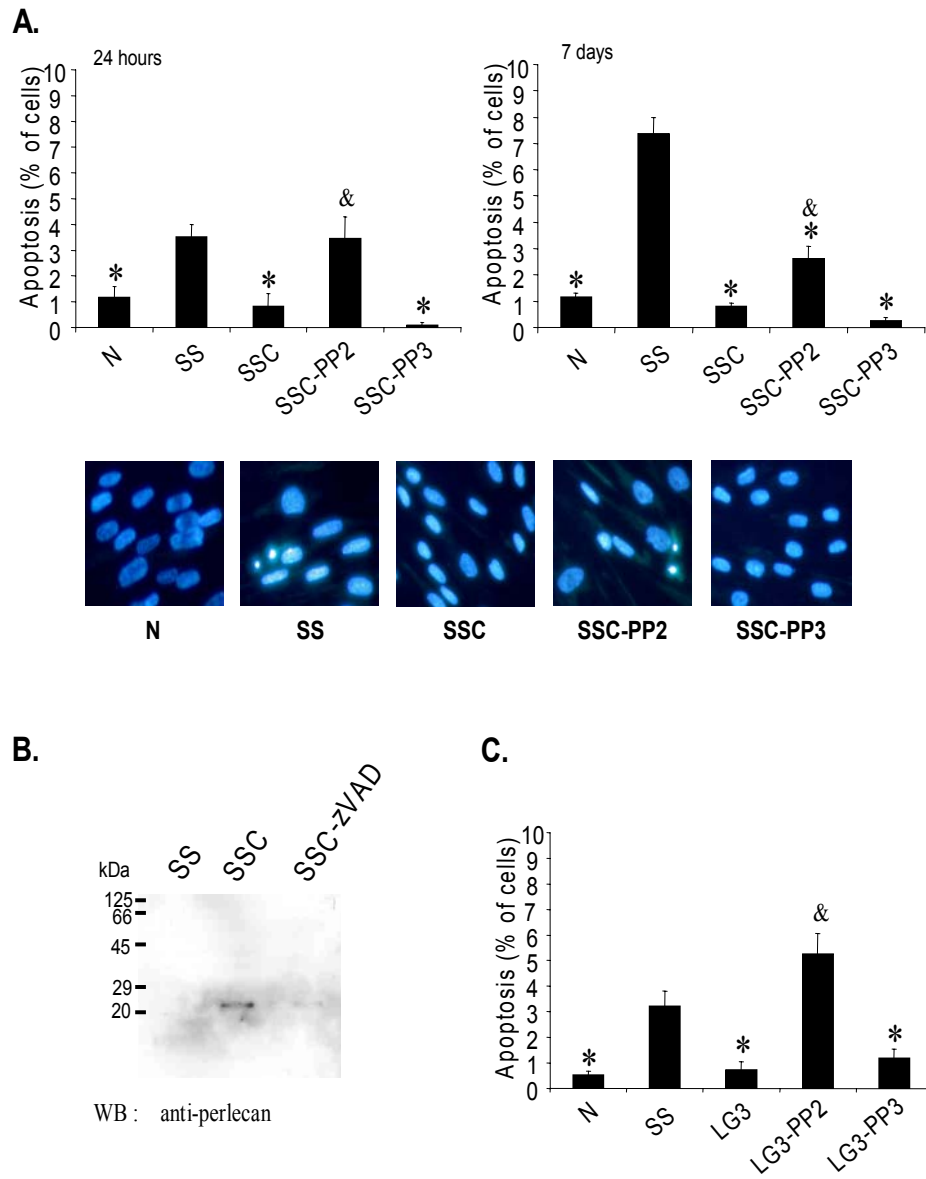


Figure 2

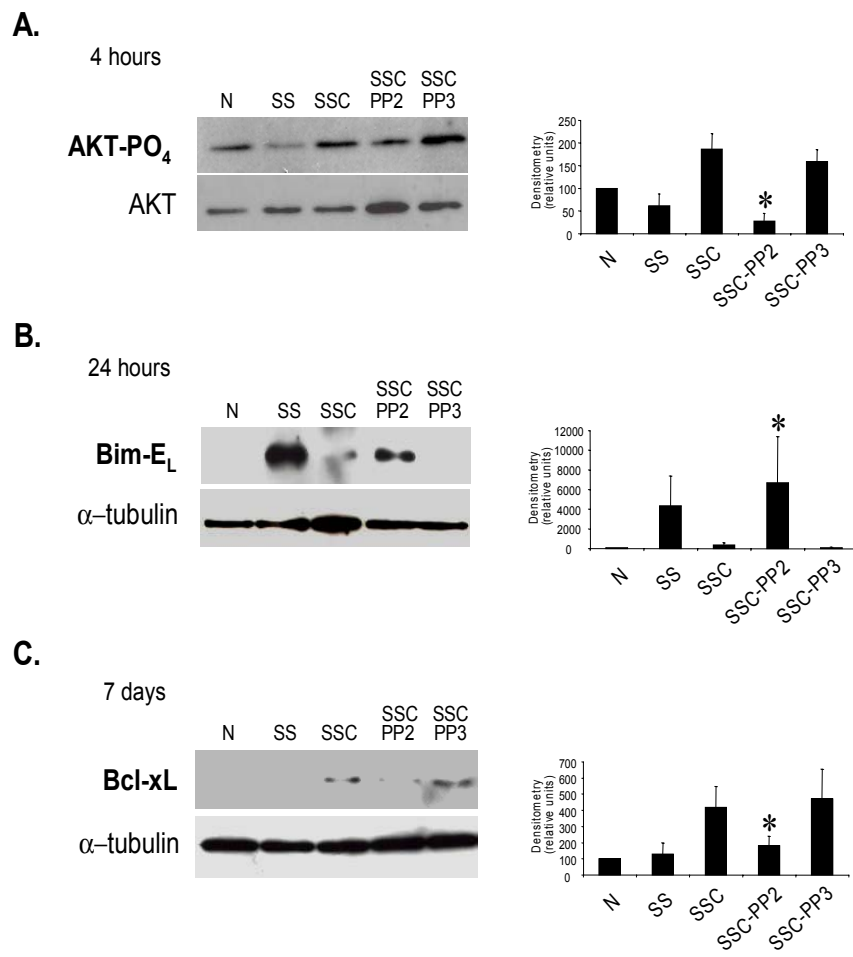
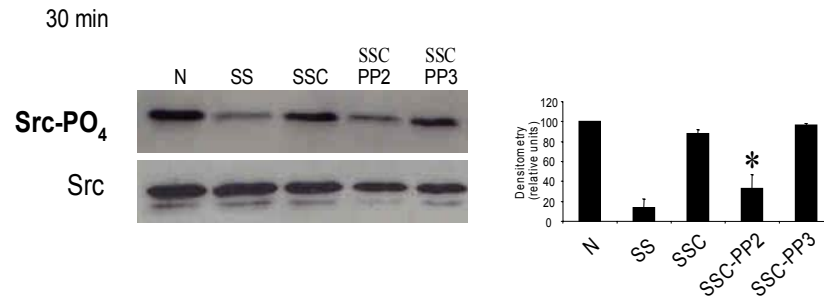
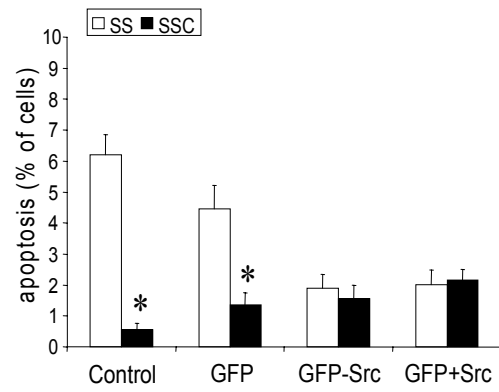


Figure 3

A.



B.



C.

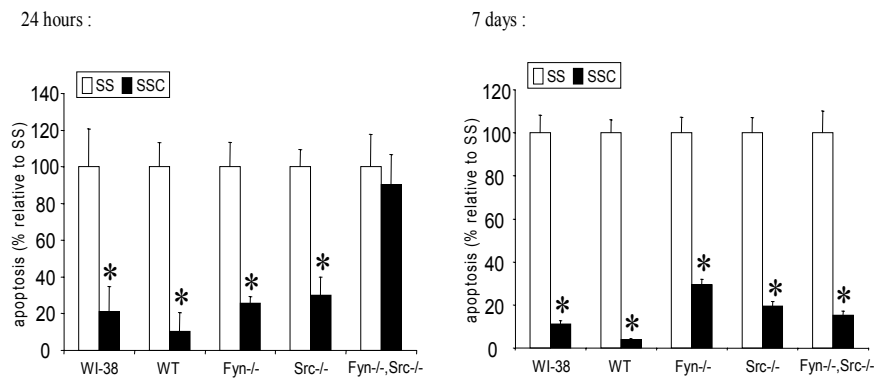




Figure 4

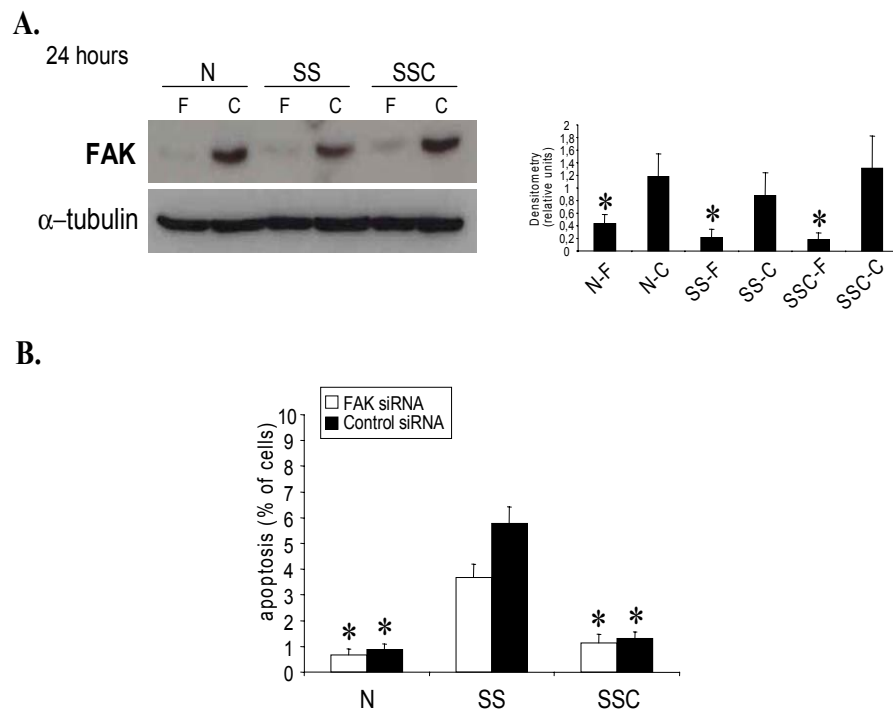


Figure 5

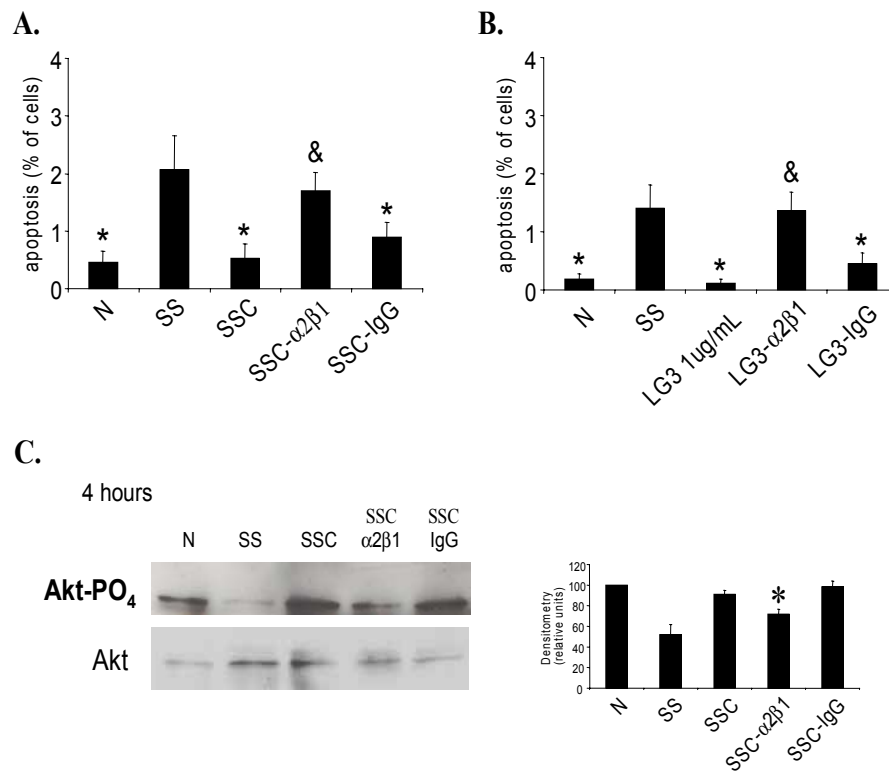
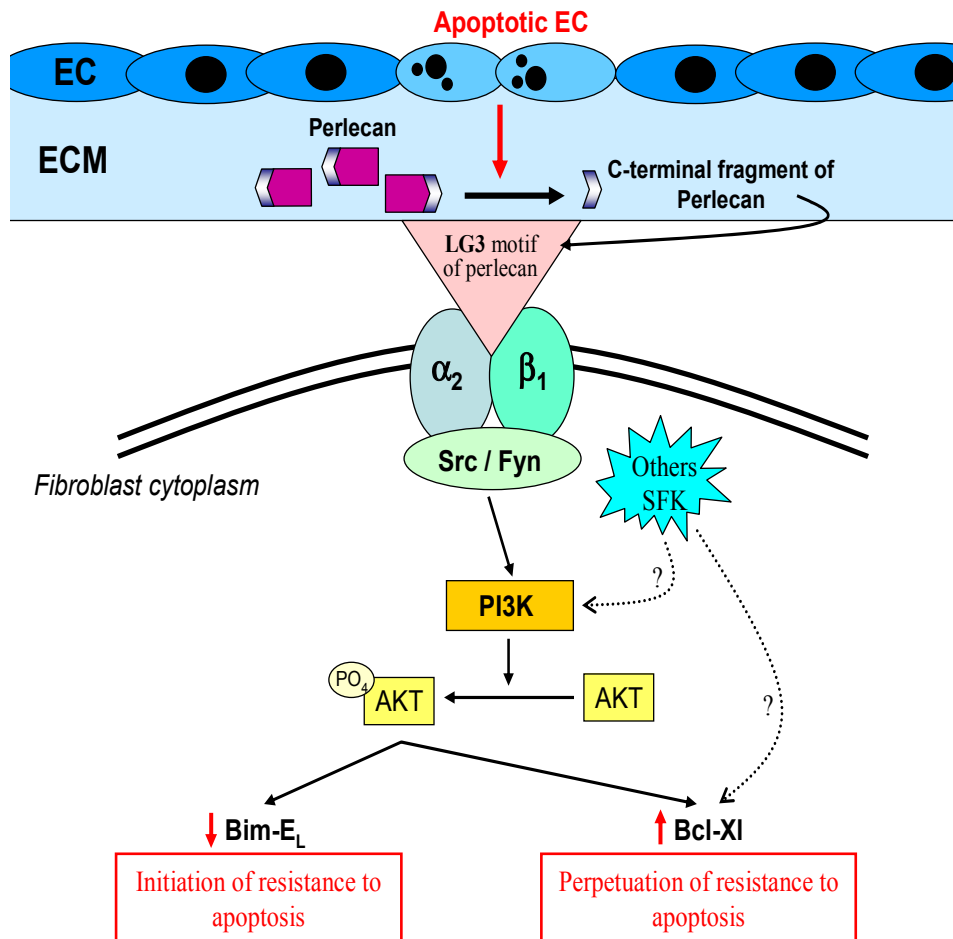


Figure 6



3.2 *Article #2*

**Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis**

par

Patrick Laplante, Isabelle Sirois, Marc-André Raymond, Victor Kokta, Alain Béliveau, Alexandre Prat, Alexei V. Pshzhetsky et Marie-Josée Hébert

en correction depuis le 9 février 2009 pour *Cell Death and Differentiation*

Rôle des coauteurs dans cet article :

-Patrick Laplante a planifié et réalisé les expériences présentées dans l'article qui suit. En fait, il a caractérisé à lui seul le phénotype myofibroblastique (*in vitro*) et pro-fibrotique (*in vivo*) induit par les médiateurs issus de CE apoptotiques. Par ailleurs, il a su analyser et interpréter les résultats générés ce qui lui a permis d'écrire l'article en question avec l'aide du D<sup>re</sup> Hébert, son directeur de recherche.

-Isabelle Sirois a caractérisé biochimiquement le milieu conditionné par les CE apoptotiques (SSC) ce qui a permis d'identifier le CTGF.

-Marc-André Raymond a généré le milieu conditionné par des CE apoptotiques (SSC).

-Alain Béliveau a participé à la rédaction de l'article

-Alexandre Prat a participé aux expériences de microscopie confocale.

- Alexei V. Pshezhetsky est aussi un collaborateur qui co-dirige Isabelle Sirois et qui est responsable du laboratoire de spectrométrie de masse où nous avons caractérisé le milieu SSC.

-Marie-Josée Hébert a joué un rôle déterminant au niveau de la planification des expériences et de la rédaction de l'article.

**Abstract**

Apoptosis of EC is an early pathogenic event in various fibrotic diseases. Here we evaluated whether paracrine mediators produced by apoptotic EC play direct roles in fibrogenesis. C3H mice injected sub-cutaneously with serum-free medium conditioned by apoptotic EC (SSC) showed increased skin thickness and heightened protein levels of  $\alpha$ SMA, vimentin and collagen I compared to mice injected with medium conditioned by non-apoptotic EC. Fibroblasts exposed to SSC *in vitro* showed cardinal features of myofibroblast differentiation with increased stress fiber formation and expression of  $\alpha$ SMA. Caspase-3 silencing in EC prevented the release of mediators favoring myofibroblast differentiation. To identify the fibrogenic factor(s) released by EC, the protein contents of media conditioned by either apoptotic or non-apoptotic EC were compared with SDS-PAGE-liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (MS/MS) and two-dimensional LC-MS/MS. Connective tissue growth factor (CTGF) was the only fibrogenic protein increased in SSC. Pan-caspase inhibition with ZVAD-FMK or caspase-3 silencing in EC confirmed that CTGF was released downstream of caspase-3 activation. The fibrogenic signaling signatures of SSC and CTGF on fibroblasts *in vitro* were similarly Pyk2-, Src-family kinases- and PI3K-dependent but TGF- $\beta$ -independent. CTGF-immunodepleted SSC failed to induce myofibroblast differentiation *in vitro* and skin fibrosis *in vivo*. These results identify caspase-3 activation in EC as a novel inducer of CTGF release and fibrogenesis.

## Introduction

The development of fibrosis follows a common pattern of injury and sustained repair in most tissues (1, 2). In the initial phases of wound-healing and chronically during fibrosis, fibroblasts accumulate at the injury site and differentiate into myofibroblasts, a contractile fibroblast type characterized by the presence of stress fibers and alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) (2). Once repair is complete, the myofibroblasts undergo apoptosis and are cleared from the injury site. In fibrosis, however, the myofibroblasts develop resistance to apoptosis, preventing their clearance and leading to tissue contraction, deformation and loss of function (1, 3).

Endothelial cell (EC) apoptosis is increasingly recognized as an early pathogenic event in fibrosis. A wide array of fibrogenic conditions, such as systemic sclerosis (4, 5), graft-vs-host disease (6, 7) and chronic rejection of solid allografts (8, 9) have been associated with increased EC apoptosis. Pathophysiological pathways linking endothelial apoptosis to fibrogenesis are still poorly defined. Some models indicate that EC apoptosis favors the recruitment of professional phagocytes such as macrophages (8, 10). Upon engulfment of apoptotic cells, the macrophages produce increased amounts of transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) (11). In turn, TGF- $\beta$ 1, would favor myofibroblast differentiation and resistance to apoptosis in fibroblasts/myofibroblasts (2). However, emerging evidence suggests that TGF- $\beta$ 1-independent pathways also contribute to fibrogenesis. For instance, dermal fibroblasts derived from patients with diffuse scleroderma constitutively express connective tissue growth factor (CTGF), another key fibrogenic protein, in a TGF- $\beta$ 1-independent manner (12, 13). Also, subcutaneous injection of CTGF into neonatal NIH Swiss mice

stimulates the formation of granulation tissue and fibrosis in the absence of TGF- $\beta$ 1 overproduction (14). Therefore, further characterization of TGF- $\beta$ 1-independent pathways is pivotal to defining new targets of intervention in fibrotic conditions.

Apart from cell-cell interactions between apoptotic cells and professional phagocytes, recent results from our group have suggested that, paracrine mediators produced by apoptotic EC, could play direct roles in fibrogenesis by regulating resistance to apoptosis and differentiation of fibroblasts (15, 16). In the present work, we aimed to establish the fibrogenic role of this paracrine loop in vivo and to identify the paracrine mediators mediating this fibrogenic activity in vivo. We demonstrate that caspase-3 activation in apoptotic EC triggers CTGF secretion which in turn induces myofibroblast differentiation and fibrogenesis through TGF- $\beta$ 1-independent pathways.



## Results

### *Mediators released by apoptotic EC induce fibrosis in vivo*

In previous studies, we established that fibroblasts treated with serum-free medium conditioned by apoptotic human EC (SSC) undergo myofibroblast differentiation *in vitro* (15). To verify the ability of SSC to promote fibrogenesis *in vivo*, mouse EC (mEC) were isolated and cultured to generate mouse SSC (mSSC), as described previously for human EC (8, 15, 16). SSC from apoptotic mEC was collected and injected subcutaneously in C3H mice daily for 3 weeks. Subcutaneous injections of bleomycin and non-conditioned serum-free medium (SS) served as positive and negative controls respectively (17).

Increased skin thickness was observed in mice injected daily with SSC compared to mice injected with SS (Fig. 1A and B). The increment of skin thickness was similar to or greater than that occurring with bleomycin injections, a classical skin fibrosis model (Fig. 1B). Histological changes associated with SSC injection were characterized by dense accumulation of extracellular matrix (ECM) components and the presence of mononuclear cells in the deepest dermis layer (Fig. 1A-zoom1). Prominent disruption of the fat layer with connective tissue interposition was seen in mice treated with SSC (Fig. 1A-zoom2). These changes were comparable to those observed in bleomycin-treated mice. Western blotting of total skin protein extracts revealed heightened levels of  $\alpha$ SMA and vimentin in SSC- compared to SS-injected mice (Fig. 1C). Collagen type I accumulation also was increased in SSC- compared to SS-treated mice (Fig. 1D). Collagen I was found to be an important component of newly-fibrotic lesions in both the submuscular and fat layers (Fig. 1D-zoom1 and 2).

### ***Caspase-3 activation fosters the secretion of fibrogenic mediators by EC***

To determine the importance of caspase activation in the release of fibrogenic mediators by apoptotic mEC, we compared SSC activity generated from mEC pretreated or not with a pan-caspase inhibitor, ZVAD-FMK. mSSC-ZVAD and mSSC-DMSO were generated by pre-incubating mEC with ZVAD or DMSO for 2 hours. The cells were then washed and serum-starved for 4 hours. As expected from our previous studies, serum starvation induced apoptosis in DMSO-treated mEC but not in ZVAD-treated mEC (supplemental data). mSSC-ZVAD-injected mice showed a significant reduction of skin fibrosis and thickness compared to mSSC-DMSO-injected mice (Fig. 2A and B). There were no significant differences in skin thickness between mice injected with mSSC or mSSC-DMSO, both harboring hallmarks of skin fibrosis (Fig. 2B). Reduced  $\alpha$ SMA and vimentin protein levels were found in mSSC-ZVAD- compared to mSSC-DMSO-injected mice (Fig. 2C). Collagen I accumulation was also lower in mSSC-ZVAD- than in mSSC-DMSO-treated mice (Fig. 2A). Collectively, these results establish that caspase activation in EC is required for the release of active fibrogenic mediators *in vivo*.

We then evaluated the importance of caspase activation in the production of mediators responsible for inducing myofibroblast differentiation in a cell culture model. SSC-DMSO and SSC-ZVAD from serum-starved human umbilical vein EC (HUVEC) were generated, as described for mEC and outlined elsewhere (8, 15, 16). Fibroblasts exposed for 7 days to SSC-DMSO showed heightened  $\alpha$ SMA levels and increased stress fiber formation, unlike fibroblasts exposed to SSC-

ZVAD, which did not (Fig. 3A and C). SSC were also generated from caspase-3-silenced HUVEC (SSC-siCasp3) or controls (SSC-siCTL). Caspase-3 silencing (Fig. 3B) but not control siRNA blocked the development of apoptosis in serum-starved HUVEC (8). Unlike SSC-siCTL, SSC-siCasp3 failed to induce myofibroblast differentiation (Fig. 3B). These data demonstrate a central role for activated caspase-3 in the production of fibrogenic mediators by apoptotic EC.

We showed previously that caspase-3 activation in EC triggers LG3 release (8, 16). Yet, fibroblasts exposed to LG3 in vitro failed to differentiate into myofibroblasts (supplemental data).

#### ***Characterization of the fibrogenic signaling signature induced by SSC***

To identify the key mediator(s) present in SSC and responsible for its fibrogenic activity, we adopted 2 parallel strategies. First, we set out to characterize the «fibrogenic signaling signature» in fibroblasts induced by SSC. Second, we used a comparative proteomics approach to identify proteins with known fibrogenic activity. The fibrogenic signature of SSC would then serve to validate that the mediator(s) identified by comparative proteomics reproduces the fibrogenic signaling pattern induced by SSC.

SSC induces myofibroblast differentiation through PI3K-dependent pathways (15), but upstream PI3K activators have not yet been characterized. Src family kinases (SFK) and focal adhesion kinase (FAK) are prime candidates as they are known PI3K activators and have been associated with fibrosis (18, 19). Decreased  $\alpha$ SMA protein levels and reduced stress fiber formation were found in human and mouse fibroblasts exposed to SSC in the presence of PP2, a broad inhibitor of

SFK, compared to fibroblasts exposed to SSC alone or to the inactive control PP3 (Fig. 4A-C). Fibroblasts isolated from *Src*<sup>-/-</sup>, *Fyn*<sup>-/-</sup> (supplemental data) and *Src*<sup>-/-</sup> *Fyn*<sup>-/-</sup> double knockout mice were tested to specifically address the role of SFK in fibrogenesis induced by SSC. *Src*<sup>-/-</sup>*Fyn*<sup>-/-</sup> fibroblasts exposed to SSC for 7 days showed elevated  $\alpha$ SMA protein levels compared to SSC alone (Fig. 4C). PP2 blocked the upregulation of  $\alpha$ SMA protein levels in *Src*<sup>-/-</sup>, *Fyn*<sup>-/-</sup> and *Src*<sup>-/-</sup>*Fyn*<sup>-/-</sup> compared to SSC alone or PP3 (Fig. 4C and supplemental data). However, SYF fibroblasts (deficient in *Src*, *Fyn* and *Yes*) failed to upregulate  $\alpha$ SMA protein levels after exposure to SSC for 7 days, indicating that the coordinated activity of *Src*, *Fyn* and *Yes* is required to transduce the fibrogenic signals triggered by SSC (Fig. 4C).

FAK is known to interact with SFK and to play an important role in transducing fibrogenic signals (20). FAK silencing with small interfering RNAs (siRNAs) decreased FAK protein levels in fibroblasts for up to 7 days (Fig. 4D). However, FAK-silenced fibroblasts showed clear evidence of  $\alpha$ SMA induction and stress fiber formation upon exposure to SSC (Fig. 4D and F), suggesting that FAK is dispensable for SSC-induced myofibroblast differentiation. Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) is another member of the FAK subfamily known to interact with SFK (21, 22). siRNAs for Pyk2 effectively decreased Pyk2 protein levels (Fig. 4E), prevented the upregulation of  $\alpha$ SMA protein levels, and blocked stress fiber formation in fibroblasts exposed to SSC (Fig. 4E and F). Collectively, these results indicate that SFK-Pyk2-PI3K are part of the fibrogenic signaling signature mediated by SSC and could be used to validate a potential fibrogenic mediator.

### ***CTGF is released by apoptotic EC***

Two complementary proteomics approaches were adopted to characterize the fibrogenic proteins secreted by apoptotic HUVEC downstream of caspase activation: SDS-PAGE-liquid chromatography (LC)-tandem mass spectrometry (MS/MS) and two-dimensional (2D)-LC-MS/MS (23, 24). To be considered of potential significance in this fibrogenic loop, the identified proteins had to meet two screening criteria: 1- human proteins identified at a relative abundance ratio of 2.5 and up in SSC-DMSO as compared to SSC-ZVAD (intensity of peptides identified in SSC-DMSO / intensity of peptides identified in SSC-ZVAD), 2- human proteins with a known fibrogenic activity. CTGF was the only protein which met these criteria (Fig. 5A). To confirm that caspase-activation regulates CTGF release, equal volumes of SSC-DMSO and SSC-ZVAD (human and mouse) conditioned by an equal number of EC were loaded onto a gel, and CTGF levels were compared by Western blotting (Fig. 5B and C). Increased CTGF levels were observed in SSC-DMSO and mSSC-DMSO compared to their respective controls. Caspase-3 silencing in serum-starved HUVEC inhibited CTGF secretion, again indicating a key role for the effector caspase-3 in the release of fibrogenic mediators and CTGF per se (Fig. 5D).

Considering the relationship between CTGF and heightened TGF- $\beta$ 1-dependent signaling and the involvement of the latter in fibrogenesis, we sought to explore whether TGF- $\beta$ 1 was involved in the phenotype induced by SSC on fibroblasts. It is noteworthy that TGF- $\beta$  isoforms were not found to be increased in SSC-DMSO compared to SSC-ZVAD, as determined by the 2 proteomics approaches. Also, co-incubation of fibroblasts with neutralizing pan-TGF- $\beta$

antibodies failed to inhibit myofibroblast differentiation of fibroblasts exposed to SSC or CTGF, whereas myofibroblast differentiation induced by recombinant TGF- $\beta$ 1 was significantly reduced (Fig. 5E). These data suggest that the fibrogenic paracrine pathways activated by EC apoptosis are largely TGF- $\beta$ -independent and point to CTGF as a central mediator.

### ***CTGF induces a fibrogenic signaling signature characteristic of SSC***

We then evaluated whether the «fibrogenic signaling signature» evoked by CTGF in fibroblasts was similar to that observed with SSC. Human WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to SS supplemented with recombinant CTGF (10 ng/mL) showed augmented  $\alpha$ SMA levels (Fig. 6A). Co-incubation with PP2 and LY2940002, inhibitors of SFK and PI3K, respectively, blocked CTGF-dependent  $\alpha$ SMA upregulation in human and mouse fibroblasts (Fig. 6A and supplemental data). In agreement with our previous work (15, 16), heightened Akt phosphorylation was found in fibroblasts exposed to SSC (Fig. 6B). CTGF also increased Akt phosphorylation in fibroblasts which was inhibited in presence of PP2 (Fig. 6B). CTGF also enhanced stress fiber formation in fibroblasts which was inhibited by Pyk2 silencing (Fig. 6C). Finally, SYF fibroblasts failed to upregulate  $\alpha$ SMA upon exposure to CTGF for 7 days (Fig. 6D). Collectively, our findings demonstrate similar signaling signatures for CTGF and SSC.

To further demonstrate the key role of CTGF in this paracrine fibrogenic loop, SSC was immunodepleted of CTGF (Fig. 7A). Fibroblasts exposed for 7 days to immunodepleted SSC showed decreased  $\alpha$ SMA levels compared to fibroblasts exposed to either SSC alone or SSC treated with an isotype-matched inactive

antibody (Fig. 7A). Altogether, these observations indicate that CTGF is a major fibrogenic mediator released by apoptotic EC.

***CTGF released by apoptotic EC induces skin fibrosis***

To evaluate the role of CTGF as an initiator of skin fibrosis *in vivo*, we compared the fibrogenic activity of SSC immunodepleted of CTGF or control. Mice were injected subcutaneously daily for 3 weeks with 300  $\mu$ L of CTGF-immunodepleted mSSC (mIP-CTGF) or mSSC treated with an isotype-matched non-depleting control (mIP-Ctl). Skin fibrosis and thickness were significantly reduced in mice injected with mIP-CTGF compared to mIP-Ctl (Fig. 7B and C).  $\alpha$ SMA and vimentin protein levels were also reduced in mIP-CTGF-treated mice compared to mIP-Ctl-treated mice (Fig. 7D). Collagen type I accumulation was also reduced in IP-CTGF-treated mice compared to IP-Ctl-treated mice (Fig. 7B). Taken together, our results demonstrate that apoptotic EC release increases CTGF levels, which, in turn, plays a central role in triggering fibrogenic pathways *in vivo*.

## Discussion

Fibrosis is associated with sustained accumulation of myofibroblasts responsible for the production of ECM components, tissue contraction and loss of function. Inappropriate and sustained resistance to apoptosis in myofibroblasts prevents their clearance and fuels fibrogenic reactions. Intriguingly, and as opposed to myofibroblasts, increased EC apoptosis has been reported to play a primary pathogenic role in various fibrotic diseases such as chronic rejection of solid organ transplants, graft-vs-host disease and systemic sclerosis (4, 5, 25).

The fibrogenic pathways elicited by endothelial apoptosis are still poorly defined. Here, we aimed at evaluating whether paracrine mediators produced by apoptotic EC could activate fibrogenic pathways *in vivo*. Sub-cutaneous injection of recombinant proteins such as TGF- $\beta$  or CTGF in rodents has played a key role in characterizing the fibrogenic activity of these mediators (26). Also, subcutaneous injection of bleomycin in mice is a classical model of fibrosis (17). Hence, to address the fibrogenic activity of the paracrine component of apoptosis, EC apoptosis was induced *ex vivo*, and the mediators produced by apoptotic EC were collected and injected *in vivo*. This approach showed that paracrine mediators produced by apoptotic EC induce key characteristics of fibrosis *in vivo*, such as increased skin thickness, heightened expression of  $\alpha$ SMA, vimentin and collagen I. The fibrogenic response evoked by subcutaneous SSC injection in mice was similar to that obtained with bleomycin.

The critical role of caspase activation in controlling the secretion of fibrogenic mediators was confirmed by showing that medium conditioned by caspase-inhibited EC elicited significantly less fibrosis when injected *in vivo* than medium



conditioned by apoptotic EC. Also, medium conditioned by caspase-inhibited or caspase-3 silenced EC failed to induce myofibroblast differentiation *in vitro*, unlike medium conditioned by apoptotic EC. These results demonstrate a pivotal role for effector caspase-3 activation in the induction of paracrine fibrogenic pathways.

LG3, the C-terminal fragment of perlecan, is produced downstream of caspase-3-activation in apoptotic EC (8). Yet, in this system, LG3 failed to favor myofibroblast differentiation, indicating that caspase-3 activation in EC promotes the release of various factors with specialized functions; some mediators, such as LG3, elicit resistance to apoptosis in fibroblasts, whereas others regulate myofibroblast differentiation.

We used a comparative proteomics approach to identify additional mediators released by apoptotic EC and with known fibrogenic activity. However, the identification of a specific protein by MS/MS does not necessarily translate into functional activity, as identified peptides could represent degraded fragments or, inversely, unprocessed precursor proteins, both without biological activity. Hence, we also sought to characterize the «fibrogenic signaling signature» of SSC with the aim of focusing on fibrogenic mediator(s) evoking the same signaling pattern. Unexpectedly, only 1 protein with known fibrogenic activity, CTGF, was identified by MS/MS, and its increased protein levels in medium conditioned by apoptotic EC were confirmed by Western blotting. CTGF, a 37-kD cysteine-rich peptide, belongs to the CCN family of matricellular proteins (27). Through its N-terminal domain, it has been shown to mediate myofibroblast differentiation and collagen synthesis, whereas its C-terminal domains have been implicated in the

regulation of proliferation and adhesion (28). Consistent with CTGF's functional activity in our system, sequences identified by MS/MS analysis corresponded to the N-terminal domains. No TGF- $\beta$  isoforms were found to be increased in SSC, yet CTGF is known to potentiate interactions between low levels of TGF- $\beta$ 1 and its cognate receptor (29). Hence, we considered the possibility of TGF- $\beta$ 1-dependent signaling in this fibrogenic loop, even in the absence of elevated amounts of TGF- $\beta$ 1. Surprisingly, blocking TGF- $\beta$  signaling with a pan-TGF- $\beta$ -neutralizing antibody did not prevent myofibroblast differentiation induced by either SSC or recombinant CTGF. These results are in keeping with our previous work (15) showing low TGF- $\beta$ 1 levels in SSC and indicate a predominant role of TGF- $\beta$ 1-independent pathways in our system.

To validate the importance of CTGF in this novel paracrine loop, we first turned to the fibrogenic signaling signature induced in fibroblasts in response to SSC. We had shown, in previous work, that SSC elicited myofibroblast differentiation through PI3K-dependent pathways (15). However, the upstream signaling pathways regulating PI3K activation in our system were still uncharacterized. SFK and FAK are both considered as pathways implicated in myofibroblast differentiation, fibrosis and PI3K activation (18, 19). Our experiments with biochemical inhibitors and gene-deficient fibroblasts confirmed a key function of Src, Fyn and Yes SFK in the transduction of fibrogenic signals by SSC. Surprisingly, FAK silencing did not affect myofibroblast differentiation as  $\alpha$ SMA and stress fiber formation were still induced in response to SSC. However, Pyk2, which is approximately 60% identical to FAK in its central catalytic domains and shares approximately 40% identity in both the N- and C-

terminal domains (30), was identified as a novel fibrogenic signaling effector as its silencing largely blocked fibrogenic signals induced by SSC. Collectively, these results characterized the SFK-Pyk2-PI3K pathways as important signaling components activated by SSC. Recombinant CTGF reproduced the same signaling signature in fibroblasts, and inhibition of these signaling pathways blocked CTGF-dependent myofibroblast differentiation *in vitro*. Finally, we also showed that immunodepleting SSC of CTGF blocked myofibroblast differentiation *in vitro* and prevented the development of fibrosis *in vivo*, providing compelling evidence that CTGF is pivotal in the fibrogenic paracrine loop activated by endothelial apoptosis.

CTGF is constitutively overexpressed in a number of fibrotic diseases, the most severe being systemic sclerosis (31). Elevated CTGF protein levels, reported in serum (32), broncho-alveolar lavage (33) and dermal interstitial fluid (34) in systemic sclerosis patients, are an indicator of disease extent and severity. A polymorphism in the CTGF promoter region, increasing CTGF expression levels, has recently been associated with systemic sclerosis (35). CTGF has also been identified as a marker of fibrosis in chronic renal and heart allograft rejection, disease states also associated with sustained endothelial injury (36, 37). Blocking CTGF expression by systemic injection of siRNAs was recently shown to prevent fibrosis in a model of chronic renal allograft rejection (38). Hence, CTGF is increasingly recognized as a key fibrotic mediator in a number of severe fibrotic diseases, but the various pathways that regulate its expression and secretion are only just beginning to be unraveled.

In summary, our study provides novel insights into the mediators and pathways linking EC apoptosis to fibrogenesis. Caspase-3 activation in EC leads to the release of CTGF which, in turn, favors myofibroblast differentiation and fibrogenesis *in vivo*. Myofibroblast differentiation induced by CTGF occurs largely through TGF- $\beta$ -independent pathways that rely on SFK, Pyk2 and PI3K activation. These results open new areas of intervention for controlling fibrosis in situations of chronic endothelial damage and apoptosis.

## **Materials and Methods**

### ***Cell lines***

HUVEC, obtained from Clonetics (San Diego, CA) and grown in endothelial cell basal medium (Clonetics), were used between passages 2 to 4. WI-38 human fibroblasts from normal embryonic lung tissue were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD), grown in fibroblast basal medium (Cambrex, Walkersville, MD) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS, Medicorp, Montreal, QC, Canada) and used between passages 2 to 17.

Fibroblasts genetically deficient in Src ( $Src^{-/-}$ ) and/or Fyn ( $Fyn^{-/-}$ ) were isolated from mouse embryo fibroblasts homozygous for disruption of the Src and/or Fyn genes and immortalized with large T antigen (39). These cells were kindly provided by Jun-Ichi Abe (Center for Cardiovascular Research, University of Rochester, Rochester, New York). SYF mouse fibroblasts were procured from the ATCC and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Wisent, Saint-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% inactivated FBS.

EC were isolated from the aorta of C3H mice, as described previously (40). They were identified by immunostaining for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) with a goat polyclonal antibody directed against mouse CD31 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). SSC, SSC-ZVAD and SSC-DMSO were generated from C3H EC, as described for HUVEC (8, 15, 16). In brief, an equal number of EC were exposed to vehicle (DMSO) or ZVAD-FMK (100  $\mu$ M) for 2 hours, washed, kept in SS for 4 hours and harvested. For all experiments,

equal volumes of media conditioned by an equal number of cells (apoptotic or not) were compared.

### ***Characterization of the fibrogenic proteins produced by apoptotic EC***

We took 2 complementary proteomics approaches: SDS-PAGE-LC-MS/MS and 2D-LC-MS/MS (24). For both methods, equal volumes of SS conditioned from an equal number of apoptotic EC (SSC-DMSO) or non-apoptotic EC (SSC-ZVAD) were centrifuged to eliminate cell debris and apoptotic bodies (8). Proteins in supernatants were concentrated, denatured, digested with trypsin, and tryptic peptides fractionated by weak anion exchange HPLC with analysis by LC-MS/MS or resolved by SDS-PAGE to sequence the proteins present in all band pairs with LC-MS/MS (supplemental data).

### ***Immunoblotting***

Proteins were extracted, separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and probed, as described previously (15). For comparison of protein levels in conditioned media, 1 mL of each medium was precipitated with TCA (9:1) for 1 hour on ice, centrifuged at 14,000 RPM, washed with cold acetone and solubilized in Laemmli sample buffer, followed by Western blotting against CTGF. The antibodies for Western blotting were: anti- $\alpha$ SMA and anti-vimentin (Sigma, St. Louis, MO), anti-type I collagen (Biodesign International, Saco, ME), anti-Pyk2 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ), anti-FAK, anti-CTGF (Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-Akt (Ser<sup>473</sup>) and anti-Akt (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA).

The membranes were stained with Ponceau S Red or, alternatively, after initial probing, they were stripped and reprobed with anti- $\alpha$ -tubulin monoclonal antibody (Oncogene, Boston, MA). Ponceau S Red was considered as a loading control for all experiments involving conditioned media, as a means of comparing their entire protein contents (8).

### ***Confocal microscopy for stress fiber characterization***

Cells were grown on 35-mm glass bottom microwell dishes (MatTek Corporation, Ashland, MA), rinsed with PBS and fixed with 2% formaldehyde. They were washed 3 times in PBS prior to permeabilization and after each subsequent step. Permeabilization was performed with 50 nM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and 0.3% Triton X-100 in PBS for 15 minutes. Microwell dishes were blocked with PBS/BSA 3% for 30 minutes and incubated with phalloidin-tetramethylrhodamine (Sigma) for 60 minutes at room temperature. The cells were then visualized at room temperature under a Leica SP5 confocal microscope (emission detector 570-620 nm) and analyzed with Leica LAS AF software.

### ***RNA interference***

WI-38 fibroblasts were plated in 6-well plates or 35-mm glass bottom microwell dishes at 100,000 cells per well. After 20 hours, they were transfected with double-stranded RNA-DNA hybrids at a final concentration of 200 nM annealed oligonucleotides and Oligofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA). After 45 hours of transfection, the cells were kept under experimental conditions for 7 days, followed by evaluation of myofibroblast differentiation. FAK

oligonucleotides were procured from Dharmacon Research (Lafayette, CO) and used as reported previously (16). Pre-designed oligonucleotides for Pyk2 (ON-TARGETplus SMARTpool) were also obtained from Dharmacon Research.

HUVEC were grown in 6- and 24-well plates until 75% confluence per well. They were transfected with pre-designed oligonucleotides for caspase-3 (ON-TARGETplus SMARTpool) at a final concentration of 100 nM and Oligofectamine. After 16 hours, the cells were placed in normal medium for 72 hours. They were then exposed to serum-free media for 4 hours, followed by the evaluation of apoptosis and procaspase-3 protein levels or the production of conditioned media (8, 15).

#### ***Screening for apoptosis by fluorescence microscopy***

Fluorescence microscopy of unfixed/unpermeabilized adherent cells stained with Hoechst 33342 (2'-(4-ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2.5'-bi-1H-benzimidazole) and propidium iodide was undertaken as in our previous work (15, 16). The percentages of normal, apoptotic and necrotic cells adherent to the dishes were estimated by an investigator blinded to the experimental conditions.

#### ***Immunodepletion and TCA precipitation***

Ten (10) mL of SSC were incubated with 40 µg of anti-CTGF antibody (or isotype-matched immunoglobulin G (IgG) as negative control) for 6 hours at 4°C with gentle shaking. 250 µL of protein A/G (Santa Cruz Biotechnology) was added, followed by overnight incubation at 4°C with gentle shaking. Then, the



media were collected, centrifuged at 14,000 RPM for 10 minutes to remove protein A/G complexes and sterilized with a 0.2- $\mu$ m filter. TCA precipitation was performed as described above.

### ***Murine model of skin fibrosis***

Female pathogen-free, 6-week-old C3H mice (Charles River Laboratories, Inc. (Wilmington, MA) were maintained on food and water *ad libitum*. The protocol was approved by the Animal Care Committee of the Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM).

Three hundred microliters (300  $\mu$ L) of conditioned media were injected subcutaneously into a single location on the shaved back of the mice daily for 3 weeks with a 27-gauge needle. Bleomycin injections (1 mg/mL) daily for 3 weeks, as described by others (17), served as positive controls. The mice (n=8 per group) were sacrificed on day 21.

### ***Tissue preparation and immunohistochemistry***

The mice were euthanized 1 day after the final injection, and skin from the injection site was removed and cut into 2 pieces: one was fixed in 10% formalin solution and embedded in paraffin; the other was snap-frozen in liquid nitrogen and stored immediately at -80°C. Sections (3  $\mu$ m) were cut from the embedded pieces of skin, mounted on slides and stained with hematoxylin-phloxine-saffron. Dermal thickness was measured under the light microscope by an investigator blinded to the experimental conditions in 3 randomly-selected fields (average of 3 measurements per field) for each mouse. Immunohistochemistry of collagen type I

(1:50 for 2 hours at room temperature) was performed with an ABC anti-rabbit staining kit, according to the manufacturer's protocol (Santa Cruz Biotechnology). Negative controls were prepared by replacing the primary antibody with isotype-matched rabbit IgG (R & D Systems, Minneapolis, MN).

Snap-frozen skin pieces were processed for the isolation of proteins with TRIzol as per the manufacturer's recommendations (Invitrogen) with a few modifications. Briefly, the chopped skin pieces were immersed in 1.0 ml of ice-cold TRIzol reagent and homogenized for 2 minutes with a PowerGen-125 tissue grinder from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). After phase separation, the air-dried protein pellet was dissolved in 1% SDS solution and heated at 50°C for 5 minutes to improve protein solubility. The protein concentration of each sample was measured according to the BCA method (15).

### ***Reagents***

PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) and PP3 (4-amino-7-phenylpyrazolo[3,4-d]pyrimidine) were purchased from Calbiochem (San Diego, CA). Recombinant human CTGF and recombinant human TGF- $\beta$ 1 were bought from Cell Sciences (Canton, MA) and R&D Systems (Minneapolis, MN) respectively. LG3 was produced as described previously (16). Pan-TGF- $\beta$ 1-blocking antibody was obtained from R&D Systems. All other reagents were from Sigma Chemicals (Oakville, ON, Canada).

*Statistical analysis.* The results are expressed as means  $\pm$  SEM. The data were analyzed by Student's T-test or ANOVA, as appropriate.  $P < 0.05$  was considered significant for all tests.

**Acknowledgements**

This work was supported by research grants from the Kidney Foundation of Canada (to MJH) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to MJH (MOP-89869) and AVP (MOP-66980). MJH is the holder of the Shire Chair in Nephrology, Transplantation and Renal Regeneration of the Université de Montréal. PL is the recipient of a training award from Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). IS is the recipient of a training fellowship from the CIHR. We thank the J.-L.Lévesque Foundation for their renewed support as well as Mr. Romain Cayrol and Mr. Nicolas Parent for their help with confocal and light microscopy.

## References

1. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 2007 Mar; 127(3): 526-537.
2. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2002; 3: 349-363.
3. Horowitz JC, Rogers DS, Sharma V, Vittal R, White ES, Cui Z, *et al.* Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell Signal* 2007 Apr; 19(4): 761-771.
4. Jun JB, Kuechle M, Harlan JM, Elkon KB. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2003 Nov; 15(6): 756-760.
5. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum* 2000 Nov; 43(11): 2550-2562.
6. Deschaumes C, Verneuil L, Ertault-Daneshpouy M, Adle-Biassette H, Galateau F, Ainoun F, *et al.* CD95 ligand-dependant endothelial cell death initiates oral mucosa damage in a murine model of acute graft versus host disease. *Lab Invest* 2007 May; 87(5): 417-429.
7. Murata H, Janin A, Leboeuf C, Soulier J, Gluckman E, Meignin V, *et al.* Donor-derived cells and human graft-versus-host disease of the skin. *Blood* 2007 Mar 15; 109(6): 2663-2665.

8. Cailhier JF, Sirois I, Laplante P, Lepage S, Raymond MA, Brassard N, *et al.* Caspase-3 Activation Triggers Extracellular Cathepsin L Release and Endorepellin Proteolysis. *J Biol Chem* 2008 Oct 3; 283(40): 27220-27229.
9. Ishii Y, Sawada T, Kubota K, Fuchinoue S, Teraoka S, Shimizu A. Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 2005; 67: 321-332.
10. Truman LA, Ford CA, Pasikowska M, Pound JD, Wilkinson SJ, Dumitriu IE, *et al.* CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood* 2008 Sep 17.
11. Lauber K, Bohn E, Krober SM, Xiao YJ, Blumenthal SG, Lindemann RK, *et al.* Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 2003 Jun 13; 113(6): 717-730.
12. Holmes A, Abraham DJ, Chen Y, Denton C, Shi-wen X, Black CM, *et al.* Constitutive connective tissue growth factor expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *J Biol Chem* 2003 Oct 24; 278(43): 41728-41733.
13. Shi-Wen X, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008 Apr; 19(2): 133-144.
14. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996 Sep; 107(3): 404-411.
15. Laplante P, Raymond MA, Gagnon G, Vigneault N, Sasseville AMJ, Langelier Y, *et al.* Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial

apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 2005; 174(9): 5740-5749.

16. Laplante P, Raymond MA, Labelle A, Abe J, Iozzo RV, Hebert MJ. Perlecan proteolysis induces an alpha2beta1 integrin- and Src family kinase-dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. *J Biol Chem* 2006 Oct 13; 281(41): 30383-30392.

17. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, Yamazaki K, Hamazaki Y, Shinkai H, *et al.* Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999 Apr; 112(4): 456-462.

18. Mishra R, Zhu L, Eckert RL, Simonson MS. TGF-beta-regulated collagen type I accumulation: role of Src-based signals. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 Apr; 292(4): C1361-1369.

19. Vepachedu R, Gorska MM, Singhanian N, Cosgrove GP, Brown KK, Alam R. Unc119 regulates myofibroblast differentiation through the activation of Fyn and the p38 MAPK pathway. *J Immunol* 2007 Jul 1; 179(1): 682-690.

20. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997; 13: 513-609.

21. Tang H, Zhao ZJ, Landon EJ, Inagami T. Regulation of calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2 by angiotensin II in endothelial cells. Roles of Yes tyrosine kinase and tyrosine phosphatase SHP-2. *J Biol Chem* 2000 Mar 24; 275(12): 8389-8396.

22. Wu SS, Jacamo RO, Vong SK, Rozengurt E. Differential regulation of Pyk2 phosphorylation at Tyr-402 and Tyr-580 in intestinal epithelial cells: roles of

calcium, Src, Rho kinase, and the cytoskeleton. *Cell Signal* 2006 Nov; 18(11): 1932-1940.

23. Pshezhetsky AV. Proteomic analysis of vascular smooth muscle cells treated with ouabain. *Methods Mol Biol* 2007; 357: 253-269.

24. Pshezhetsky AV, Fedjaev M, Ashmarina L, Mazur A, Budman L, Sinnett D, *et al.* Subcellular proteomics of cell differentiation: quantitative analysis of the plasma membrane proteome of Caco-2 cells. *Proteomics* 2007 Jun; 7(13): 2201-2215.

25. Cailhier JF, Laplante P, Hebert MJ. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant* 2006 Feb; 6(2): 247-253.

26. Chujo S, Shirasaki F, Kawara S, Inagaki Y, Kinbara T, Inaoki M, *et al.* Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 2005 May; 203(2): 447-456.

27. Leask A, Abraham DJ. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol* 2003 Dec; 81(6): 355-363.

28. Grotendorst GR, Duncan MR. Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J* 2005 May; 19(7): 729-738.

29. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002 Aug; 4(8): 599-604.



30. Sasaki H, Nagura K, Ishino M, Tobioka H, Kotani K, Sasaki T. Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem* 1995 Sep 8; 270(36): 21206-21219.
31. Leask A. Transcriptional profiling of the scleroderma fibroblast reveals a potential role for connective tissue growth factor (CTGF) in pathological fibrosis. *Keio J Med* 2004 Jun; 53(2): 74-77.
32. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, *et al.* Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000 Jan; 27(1): 149-154.
33. Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, Leask A, Bradham D, Beauchamp JR, *et al.* Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Exp Cell Res* 2000 Aug 25; 259(1): 213-224.
34. Stratton R, Shiwen X, Martini G, Holmes A, Leask A, Haberberger T, *et al.* Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients. *J Clin Invest* 2001 Jul; 108(2): 241-250.
35. Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M, Sestini P, Renzoni EA, Holmes AM, *et al.* A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med* 2007 Sep 20; 357(12): 1210-1220.
36. Cheng O, Thuillier R, Sampson E, Schultz G, Ruiz P, Zhang X, *et al.* Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *Am J Transplant* 2006 Oct; 6(10): 2292-2306.

37. Csencsits K, Wood SC, Lu G, Faust SM, Brigstock D, Eichwald EJ, *et al.* Transforming growth factor beta-induced connective tissue growth factor and chronic allograft rejection. *Am J Transplant* 2006 May; 6(5 Pt 1): 959-966.
38. Luo GH, Lu YP, Song J, Yang L, Shi YJ, Li YP. Inhibition of connective tissue growth factor by small interfering RNA prevents renal fibrosis in rats undergoing chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc* 2008 Sep; 40(7): 2365-2369.
39. Thomas SM, Soriano P, Imamoto A. Specific and redundant roles of Src and Fyn in organizing the cytoskeleton. *Nature* 1995 Jul 20; 376(6537): 267-271.
40. Shi W, Haberland ME, Jien ML, Shih DM, Luscis AJ. Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice. *Circulation* 2000 Jul 4; 102(1): 75-81.

**Titles and legends to figures**

**Figure 1.** Apoptosis of EC induces dermal fibrosis.

**A.** Histopathological evaluation of dermal fibrosis in C3H mice receiving daily subcutaneous injections of serum-free medium (SS), medium conditioned by apoptotic EC (mSSC) or bleomycin for 3 weeks. Representative hematoxylin-phloxine-saffron (HPS)-stained sections (magnification x100), n=8 per group. Zoom 1 and 2 show higher magnifications of fibrotic areas within submuscular and fat layers (magnification x400). **B.** Dermal thickness was increased in mice treated with bleomycin or mSSC for 3 weeks. The results are expressed as percent increases vs the respective controls. \* $p < 0.02$  vs PBS, and  $p < 0.04$  vs SS, n=6 per mouse. **C.** Immunoblotting analysis: Elevated  $\alpha$ SMA (upper panel) and vimentin (lower panel) protein levels in the skin of mice treated with mSSC for 3 weeks compared to mice treated with SS, n=6 per condition. **D.** Collagen type I was detected immunohistochemically in tissue sections from SS- and mSSC-treated mice. Areas of collagen I deposition stain brown. The micrographs are representative of 4 animals per group (magnification x100). Zoom 1 and 2 are respectively higher magnifications of submuscular and fat layers demonstrating the presence of collagen I (magnification x400). All tissue sections were counterstained with hematoxylin, and isotype-matched IgG served as negative controls (mSSC-Ctl) for collagen I.

**Figure 2.** Caspase activation in EC induces the release of fibrogenic mediators.

**A.** Upper panel: Light microscopy of hematoxylin-phloxine-saffron (HPS)-stained skin sections from C3H mice injected daily with mSSC-ZVAD or mSSC-DMSO

(magnification x100). Fibrosis was increased in mSSC-DMSO-injected mice, n=4 per group. Lower panel: Collagen type I was detected immunohistochemically in tissue sections from mSSC-ZVAD- and mSSC-DMSO-treated mice. The micrographs (magnification x100) are representative of 4 animals per group. All tissue sections were counterstained with hematoxylin. Fibrotic areas, which were larger in mice treated with mSSC-DMSO, were positive for collagen I immunostaining. **B.** Decreased skin thickness in mice treated with mSSC-ZVAD for 3 weeks. The results are expressed as percent increases vs SS. \*p<0.004 vs mSSC, and &p<0.04 vs mSSC-DMSO, n=4 per group. **C.** Immunoblotting analysis: Skin protein extracts from mice treated with mSSC-DMSO for 3 weeks showed heightened  $\alpha$ SMA (left panel) and vimentin (right panel) levels compared to the respective mSSC-ZVAD controls, n=6 per condition.

**Figure 3.** Caspase-3 activation in EC is required for release of mediators that induce myofibroblast differentiation.

**A.** Immunoblotting analysis: Elevated  $\alpha$ SMA protein levels in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to serum-free medium conditioned by apoptotic EC (SSC) or medium conditioned by apoptotic EC pre-incubated with DMSO (SSC-DMSO), compared to normal medium (N), serum-free medium (SS) and medium conditioned by EC in which apoptosis was inhibited with ZVAD-FMK (SSC-ZVAD). These results are representative of 3 independent experiments. **B.** Immunoblotting analysis: Upper panel: Elevated  $\alpha$ SMA levels in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to serum-free medium conditioned by apoptotic EC pre-incubated with control siRNA (SSC-siCTL), compared to serum-free medium

conditioned by caspase-3-silenced EC (SSC-siCasp3). Lower panel: Caspase-3 protein levels in HUVEC treated with either caspase-3 siRNAs or control siRNAs. These results are representative of 3 independent experiments. **C.** Confocal microscopy: Rhodamine-phalloidin staining showing increased stress fiber formation in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to SSC and SSC-DMSO compared to N, SS and SSC-ZVAD. The micrographs are representative of 3 independent experiments. Bar, 25  $\mu$ m.

**Figure 4.** Importance of SFK and Pyk2 in myofibroblast differentiation induced by SSC.

**A.** Immunoblotting analysis: Decreased  $\alpha$ SMA protein levels in WI-38 fibroblasts exposed to SSC in the presence of PP2 (5  $\mu$ M) for 7 days, compared to inactive control PP3. These results are representative of 6 independent experiments. **B.** Confocal microscopy: Rhodamine-phalloidin staining showing increased stress fiber formation in WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to SSC-PP3 compared to SSC-PP2. The micrographs are representative of 3 independent experiments. Bar, 25  $\mu$ m. **C.** Immunoblotting analysis: Decreased  $\alpha$ SMA protein levels in wild type (WT) and Src<sup>-/-</sup> Fyn<sup>-/-</sup> mouse fibroblasts exposed to SSC in the presence of PP2 (5 mM) for 7 days, compared to the controls (PP3). SYF cells exposed for 7 days to SSC do not show elevated  $\alpha$ SMA protein levels compared to SS. Ponceau S Red staining was included as a loading control. The results are representative of 3 independent experiments. **D.** Immunoblotting analysis: Fibroblasts transfected with control siRNA (C) or FAK siRNA (F) and exposed to SSC for 7 days showed similar  $\alpha$ SMA protein levels, whereas FAK levels were decreased in FAK-

silenced fibroblasts. The results are representative of 5 independent experiments.

**E.** Immunoblotting analysis: Fibroblasts transfected with Pyk2 siRNA (P) and exposed to SSC for 7 days showed decreased  $\alpha$ SMA and Pyk2 protein levels compared to fibroblasts transfected with control siRNA (C). These results are representative of 3 independent experiments. **F.** Confocal microscopy: Rhodamine-phalloidin staining of stress fibers in WI-38 fibroblasts transfected with control siRNA or siRNA against FAK or Pyk2 and exposed to SSC for 7 days. Stress fiber formation is inhibited in Pyk2-silenced fibroblasts. The micrographs are representative of 2 independent experiments. Bar, 25  $\mu$ m.

**Figure 5.** Caspase-3 activation triggers the release of active CTGF by apoptotic EC.

**A.** Schematic representation of CTGF and corresponding peptides identified by SDS-PAGE-LC-MS/MS. Sequences identified in SSC-DMSO are in red. **B and C.** Immunoblotting analysis: SSC-ZVAD and SSC-DMSO, respectively generated from human and C3H EC, were precipitated by TCA, followed by Western blotting against CTGF. CTGF protein levels were increased in SSC-DMSO compared to SSC-ZVAD. These results are representative of 3 independent experiments. **D.** Immunoblotting analysis: SSC-siCTL and SSC-siCasp3 were precipitated by TCA followed by Western blotting against CTGF. CTGF protein levels were augmented in SSC-siCTL compared to SSC-siCasp3. The results are representative of 4 independent experiments. **E.** Left panel: Immunoblotting analysis: Fibroblasts exposed for 7 days to SSC or CTGF (10 ng/mL), either alone, with a pan-TGF- $\beta$ -blocking antibody (5 mg/mL) or with isotype-matched IgG,

showed elevated  $\alpha$ SMA protein levels compared to fibroblasts exposed to SS. Right panel: Immunoblotting analysis: Fibroblasts exposed for 7 days to TGF- $\beta$ 1 (2 ng/mL) with a pan-TGF- $\beta$ -blocking antibody (5 mg/mL) manifested decreased  $\alpha$ SMA protein levels compared to fibroblasts exposed to TGF- $\beta$ 1 alone or with isotype-matched IgG. These results are representative of 4 independent experiments.

**Figure 6.** CTGF reproduces the signaling signature of SSC.

**A.** Immunoblotting analysis: Elevated  $\alpha$ SMA protein levels in fibroblasts exposed for 7 days to SS supplemented with CTGF (10 ng/mL) alone or concomitantly with PP3 or DMSO. The results are representative of 3 independent experiments. **B.** Immunoblotting analysis: Decreased Akt phosphorylation in fibroblasts exposed for 4 hours to serum-free medium supplemented with CTGF or PP2 (5 mM). These results are representative of 3 independent experiments. **C.** Confocal microscopy: Rhodamine-phalloidin staining in fibroblasts non-transfected (vehicle) or transfected with Pyk2 siRNA or control siRNA and exposed for 7 days to CTGF. Stress fiber formation was decreased in fibroblasts transfected with Pyk2 siRNA. The micrographs are representative of 2 independent experiments. Bar, 25  $\mu$ m. **D.** Immunoblotting analysis: SYF mouse fibroblasts exposed for 7 days to CTGF do not show elevated  $\alpha$ SMA protein levels compared to SS. Ponceau S Red staining was included as a loading control. WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to SSC are positive controls (Ctl+) for  $\alpha$ SMA expression. These results are representative of 3 independent experiments.

**Figure 7.** CTGF is a key fibrogenic mediator released by apoptotic EC.

**A.** Upper panel: Immunoblotting analysis: CTGF protein levels in SSC immunodepleted of CTGF (IP-CTGF) or SSC exposed to isotype-matched immunoglobulin (IP-Ctl). Ponceau S Red staining was the loading control. Lower panel: Immunoblotting analysis: Fibroblasts exposed for 7 days to IP-CTGF showed decreased  $\alpha$ SMA protein levels compared to fibroblasts exposed to SSC or IP-Ctl. These results are representative of 3 independent experiments. **B.** Upper panel: Light microscopy of hematoxylin-phloxine-saffron (HPS)-stained skin sections from C3H mice injected daily with SSC immunodepleted of CTGF (mIP-CTGF) or its control (mIP-Ctl) (magnification x100). Fibrosis was increased in mIP-Ctl-injected mice, n=6 per group. Lower panel: Collagen type I was detected immunohistochemically in tissue sections from mIP-CTGF- and mIP-Ctl-treated mice. The micrographs (magnification x100) are representative of 4 animals per group. All tissue sections were counterstained with hematoxylin. Fibrotic areas, which were larger in mice treated with mIP-Ctl, were positive for collagen I immunostaining. **C.** Decreased skin thickness in mice treated with mIP-CTGF for 3 weeks. The results are expressed as percent increases vs SS. \* $p < 0.004$  vs mSSC, and  $p < 0.03$  vs mIP-Ctl, n=6 per group. **D.** Immunoblotting analysis: Skin protein extracts from mice treated with mIP-Ctl for 3 weeks showed elevated  $\alpha$ SMA (upper panel) and vimentin (lower panel) levels compared to mice treated with mIP-CTGF, n=6 per condition.



Figure 1

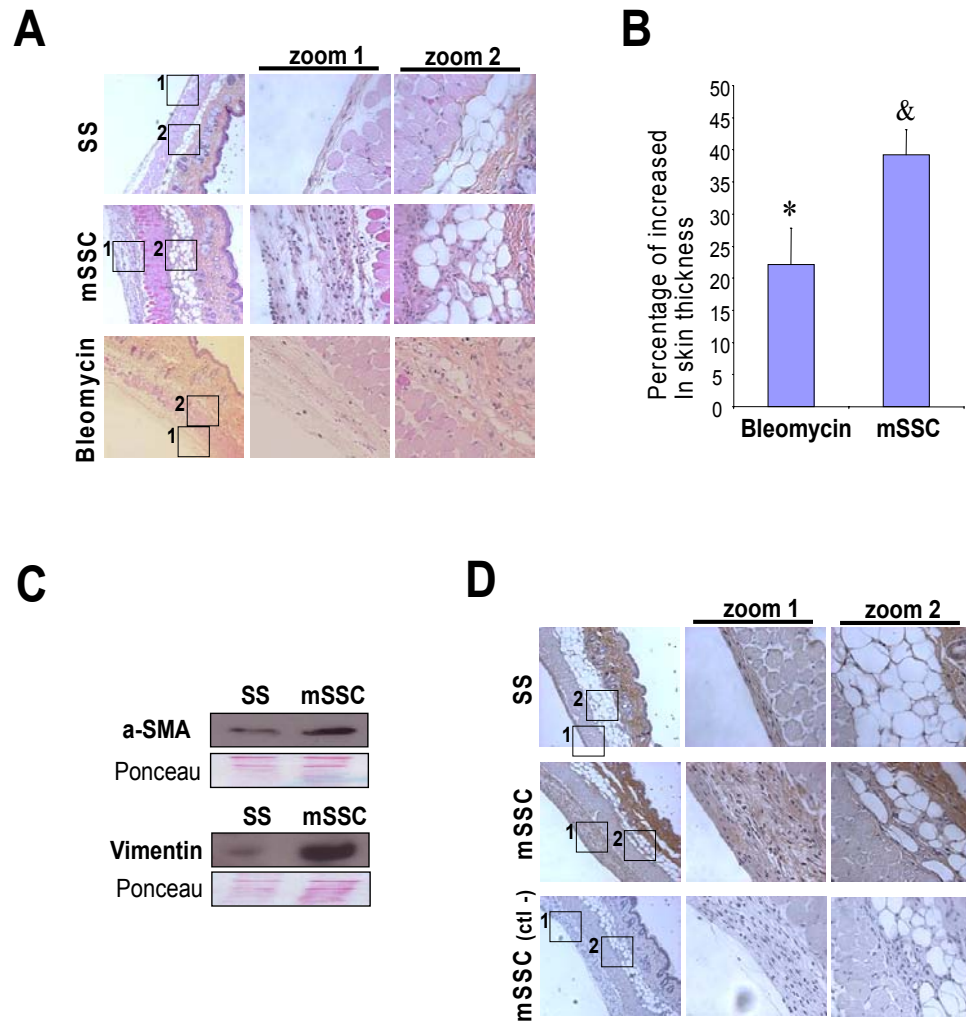


Figure 2

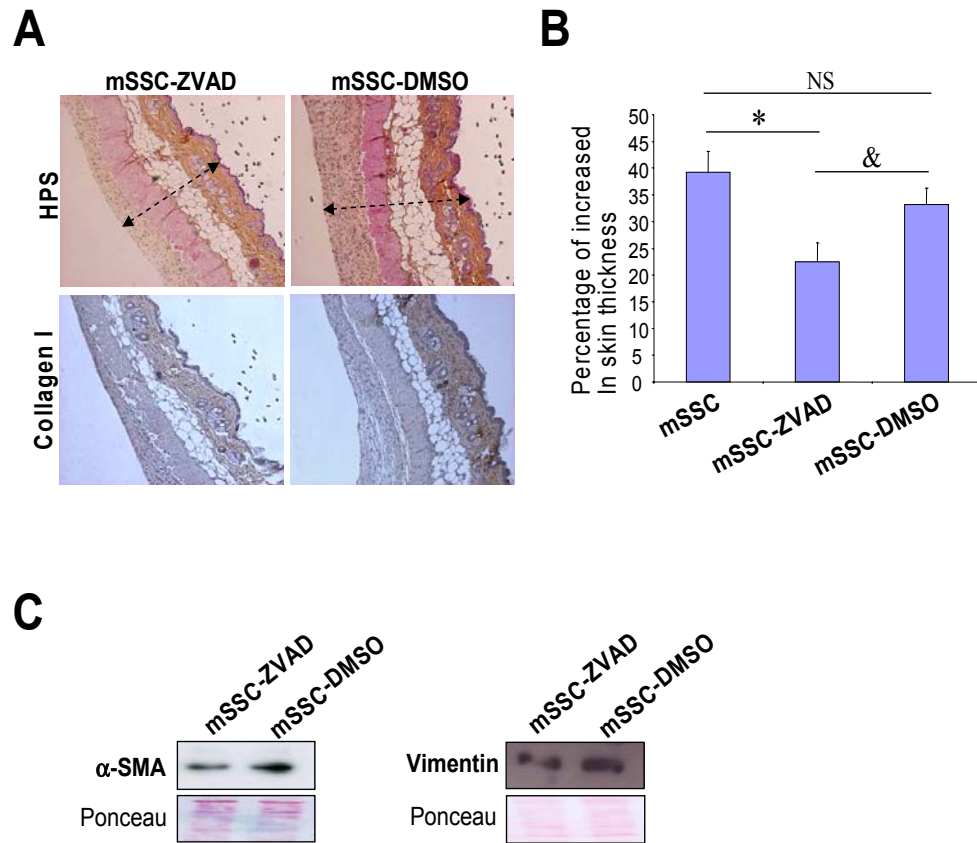


Figure 3

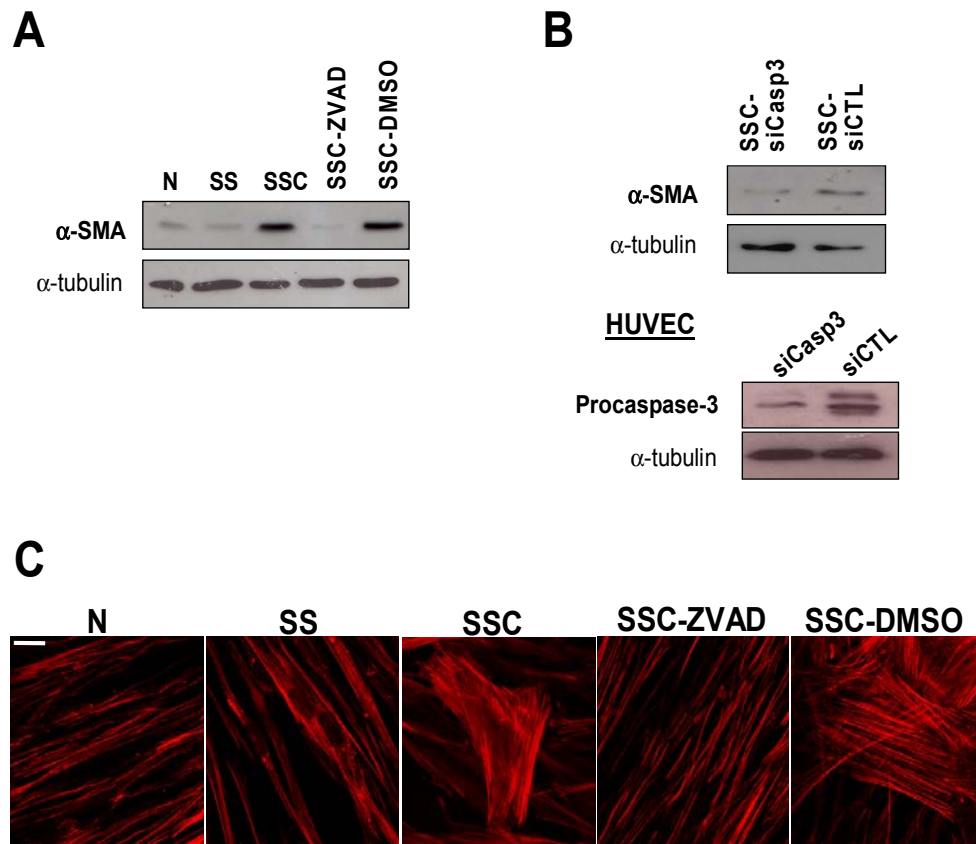


Figure 4

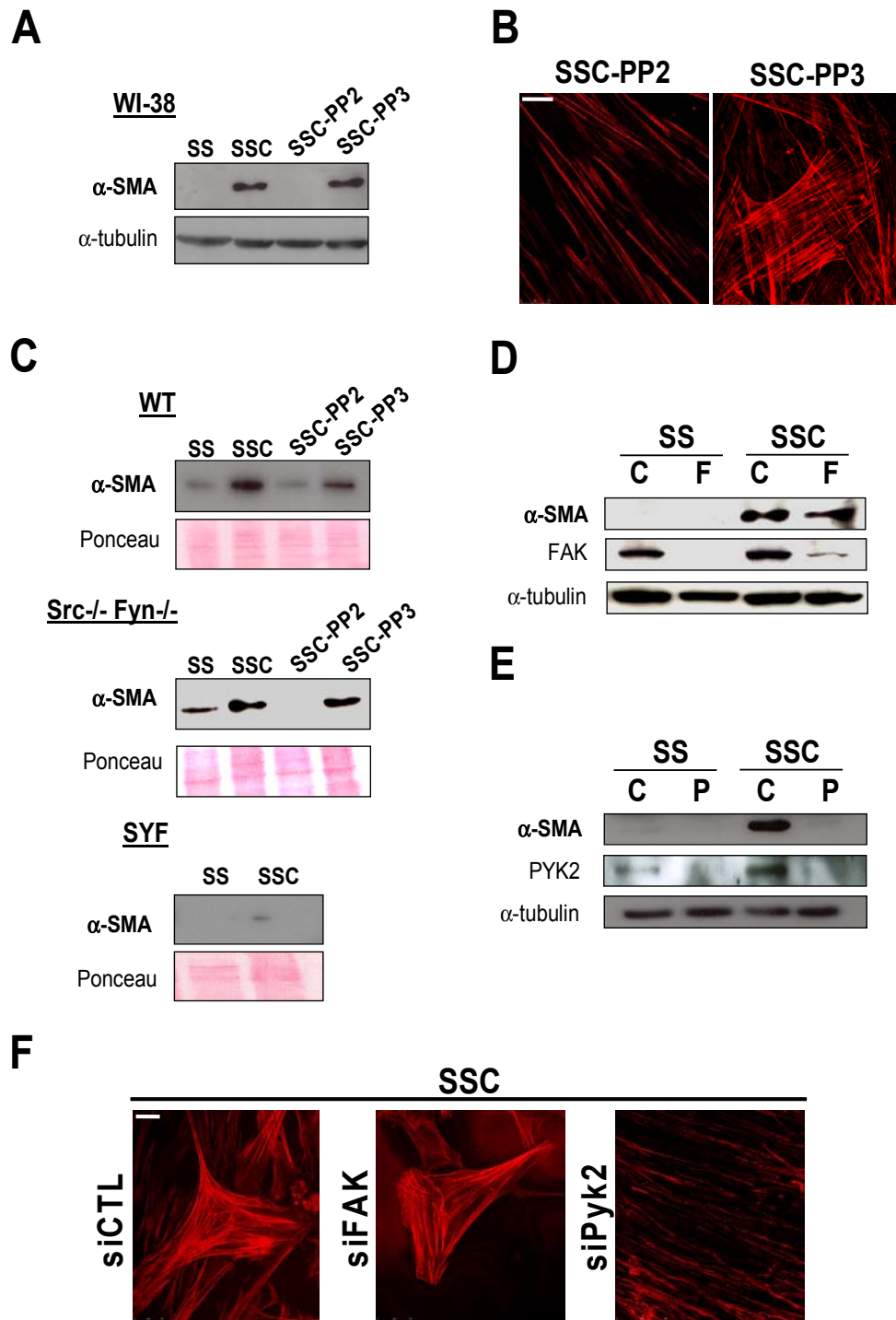


Figure 5

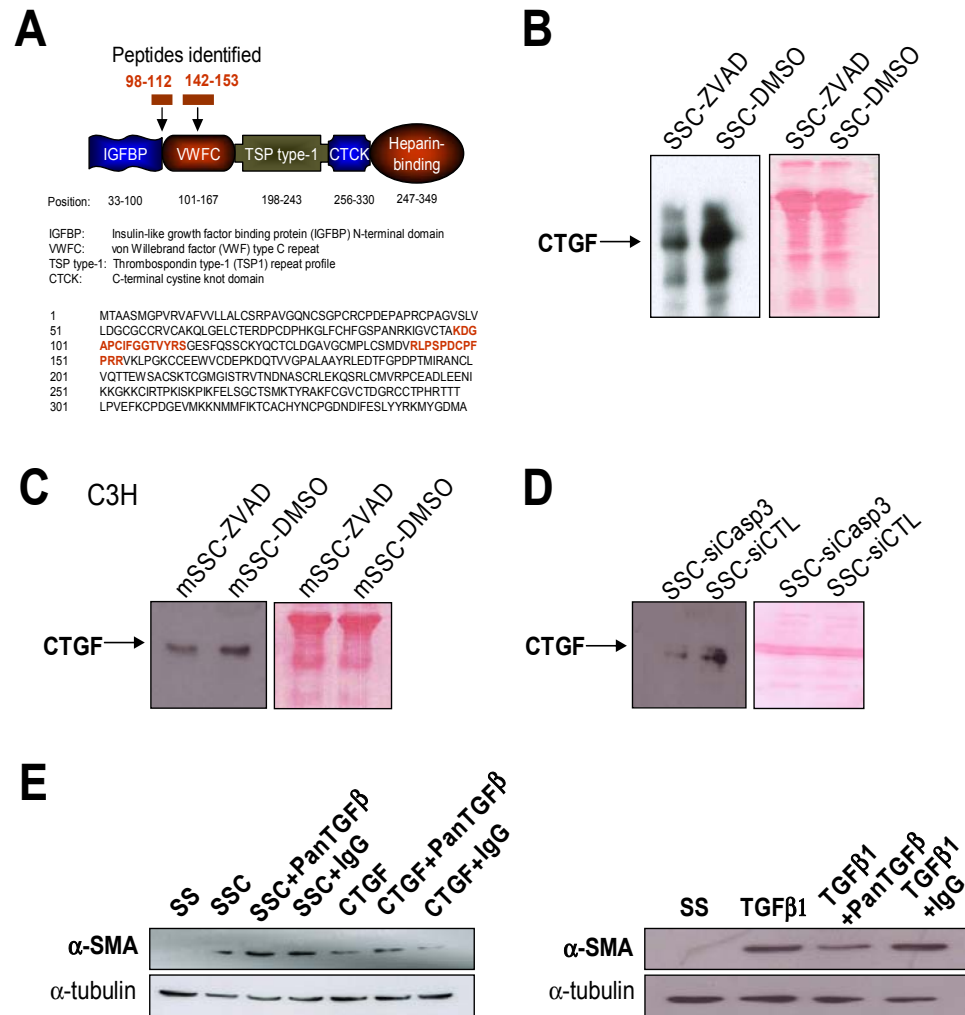


Figure 6

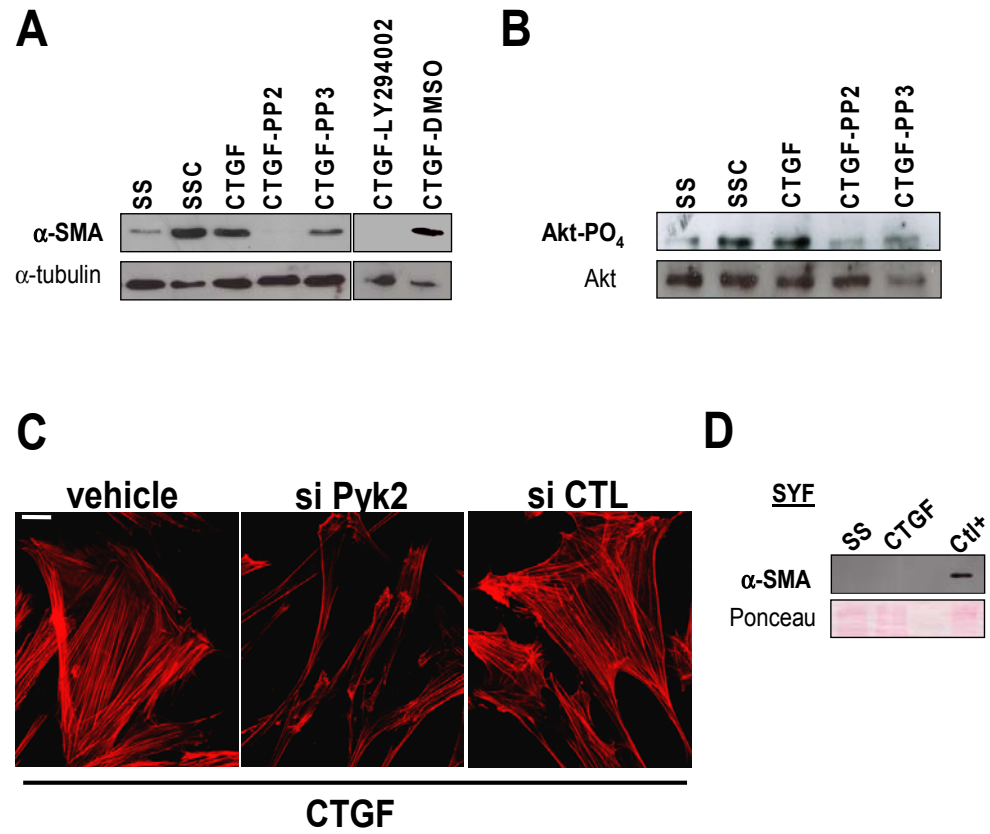
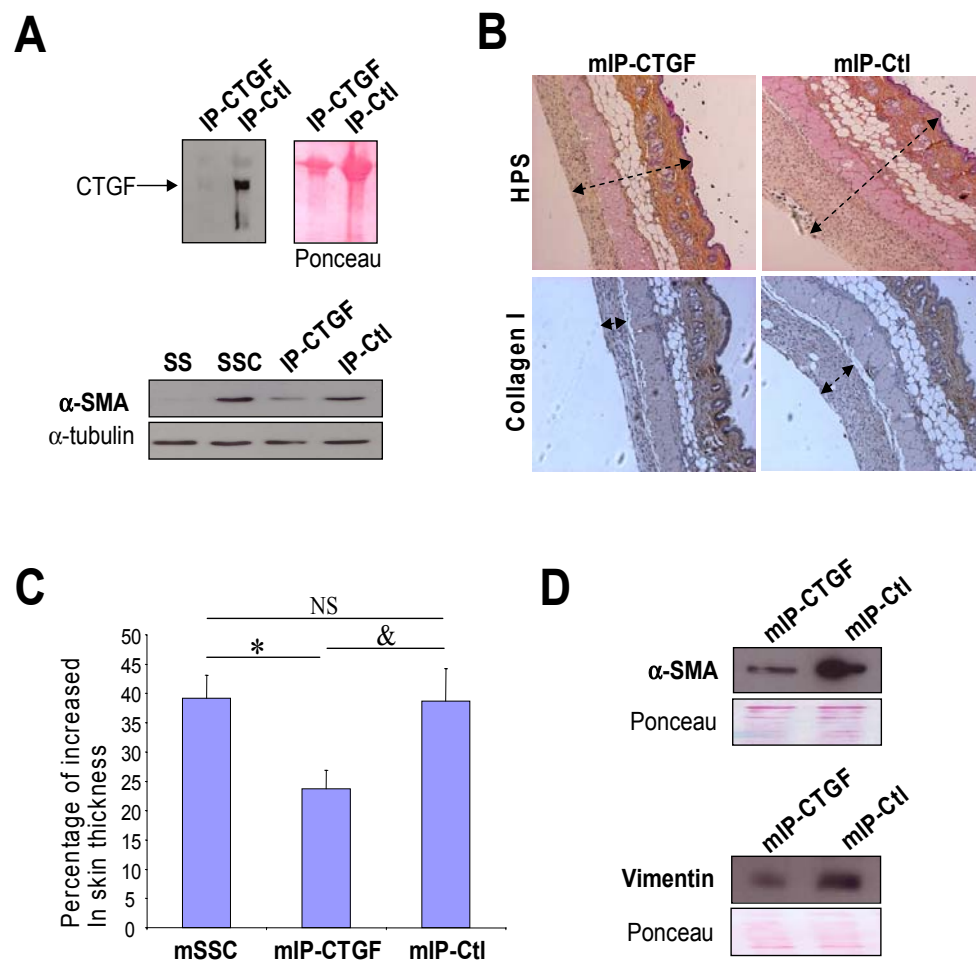


Figure 7



## **Supplemental Data**

### **Methods**

#### ***Characterization of the fibrogenic proteins produced by apoptotic EC***

To characterise the fibrogenic proteins secreted by apoptotic EC downstream of caspase activation, we used a semi-quantitative comparative proteomic approach as described previously (1). Serum-free media conditioned by apoptotic EC (SSC-DMSO) and non-apoptotic EC (SSC-ZVAD) were centrifuged sequentially at 1,200 g and 50,000 g, to eliminate respectively cell debris and apoptotic bodies (2). Proteins in supernatants were concentrated and solubilised in 4X Laemmli buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 2% SDS, 0.5% (w/v) bromophenol blue). 125 µg of total protein from each sample was separated by a SDS-PAGE on a 15% acrylamide gel. The gel was stained with Coomassie blue. Each lane was cut into 20 slices, reduced in the presence of 4 mM DTT for 1 hour at room temperature, alkylated with 10 mM phenylmaleimide for 1 hour at room temperature and treated with trypsin (Promega) for 16 hours. Tryptic peptides were extracted with 60% acetonitrile, 0.1% formic acid, evaporated to dryness, and resuspended in 25 µl of 3% acetonitrile, 0.1% formic acid.

Peptide digests were analyzed in duplicate using a LC-MS/MS system consisting of an Agilent 1100 Series nanoflow liquid chromatography system and a 1100 Series LC/MSD-Trap-SL ion trap mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). The peptides were enriched on a Zorbax 300SB-C18 trap column (5 µm, 5 x 0.3 mm) and separated by reversed phase chromatography on a Zorbax 300SB-C18 analytical column (3.5 µm, 150 x 0.075 mm) with a gradient of 5-90% acetonitrile in 0.1% formic acid at a flow rate of



300 nl/min. Acquisition parameters were as following: (a) positive mode, (b) scan range from 400 to 2200 Da, (c) “trap drive” of 90, (d) maximum 3 MS/MS per cycle, (e) preferred charge state of +2, (f) active exclusion after 2 spectra for 1 min, (g) scan speed of  $13000 \text{ m/z} \times \text{sec}^{-1}$ . Spectra were recorded in a profile mode. The mass spectra were interpreted and quantified using the Spectrum Mill software (Rev. A.03.02.060a, Agilent). Using a “Data Extractor” module of the program, the MS/MS spectra were (a) converted to a centroid mode based on the area in the top 50% of a peak intensity, (b) merged by similarity (in order for 2 spectra to be merged, at least 25 out of their 50 most intensive peaks had to match and the matching peaks had to represent >70% of the total spectral intensity) within a time window of  $\pm 40$  sec and  $m/z$  window  $\pm 1.2$  Da and (c) filtered by quality (precursor signal to noise ratio > 25, sequence tag length > 1). For every spectrum the MS intensity was calculated as the area under the extracted chromatogram of ion intensity versus the retention time (EIC) using the same parameters as for the merging. “MS/MS search” was performed for the 25 most intensive peaks in every spectrum using the human UniProt database (release of September 7<sup>th</sup>, 2006; <ftp://ftp.expasy.org>).

For 2D-LC-MS/MS analysis the samples were solubilised in 100  $\mu\text{l}$  of 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 7.5 M urea, 2.0 M thiourea, reduced in the presence of 6 mM DTT, alkylated with 15 mM iodoacetamide and digested overnight with trypsin (Promega, sequencing grade, estimated trypsin/protein ratio 1:100). The tryptic peptides were resuspended in 55% acetonitrile, 25% dimethylformamide and labeled with pentafluorophenyl-4-anilino-4-oxobutanoate-d<sub>0</sub> or pentafluorophenyl-4-anilino-4-oxobutanoate-d<sub>5</sub>. The labeled samples were

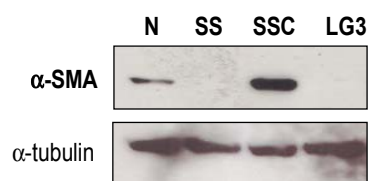
combined, desalted, evaporated to dryness, resuspended in 10% acetonitrile containing 10 mM ammonium acetate, pH 7.0, and analyzed by weak anion exchange chromatography using a PolyWAX column (100 x 1 mm, 5  $\mu$ m, 300 Å; PolyLC inc, Columbia, MO) connected to an Agilent 1100 Series LC system. The peptides were eluted by a salt gradient of 0 to 1 M NaCl in 10 mM ammonium acetate, pH 6.0, containing 10% acetonitrile, at a flow rate of 20  $\mu$ l/min. 36 fractions of 80  $\mu$ l were collected and acidified with formic acid. 30  $\mu$ l from each fraction was analyzed by LC-MS/MS as described above.

## References

1. Pshezhetsky, A.V., Fedjaev, M., Ashmarina, L., Mazur, A., Budman, L., Sinnott, D., Labuda, D., Beaulieu, J.F., Menard, D., Nifant'ev, I., et al. 2007. Subcellular proteomics of cell differentiation: quantitative analysis of the plasma membrane proteome of Caco-2 cells. *Proteomics* 7:2201-2215.
2. Hristov, M., Erl, W., Linder, S., and Weber, P.C. 2004. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 104:2761-2766.

## Supplemental data

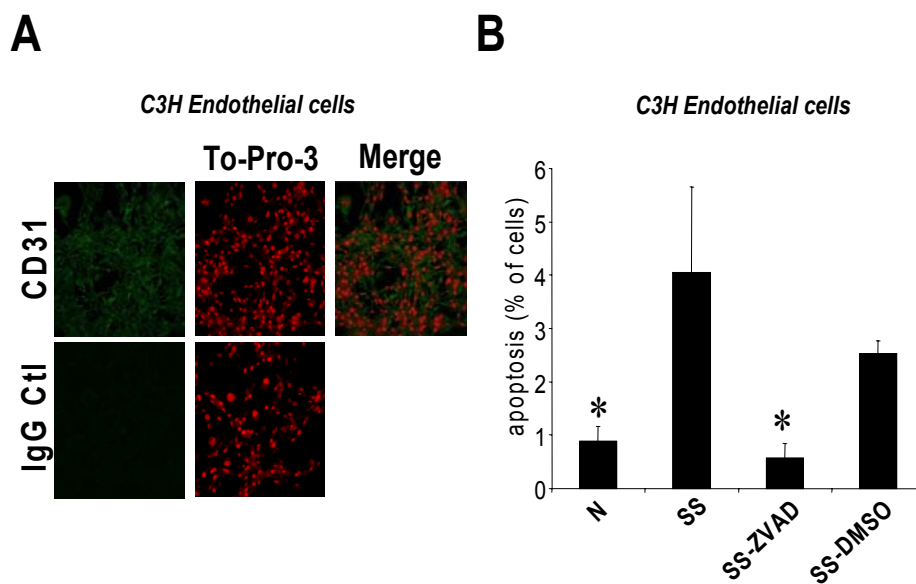
## Figure S1



**Figure S1.** LG3 does not induce myofibroblast differentiation. Immunoblotting analysis: WI-38 fibroblasts exposed for 7 days to SS supplemented with LG3 recombinant peptide (1  $\mu$ g/mL) do not show increased  $\alpha$ SMA protein levels. These results are representative of 4 independent experiments.

## Supplemental data

Figure S2

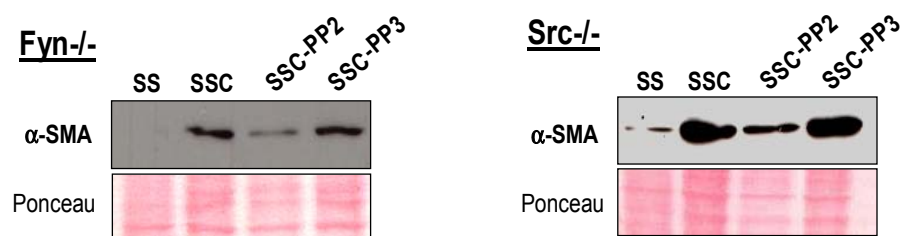


**Figure S2.** ZVAD-FMK inhibits apoptosis in serum-starved EC isolated from C3H mice.

**A.** Characterization of mouse EC. Staining of PECAM-1 (CD31) on EC isolated from the aorta of a C3H mouse. Confocal microscopy (magnification x400). To-Pro-3 was used as a nuclear dye, and isotype-matched IgG served as a negative control for PECAM-1. **B.** Percentage of apoptosis in C3H EC exposed to normal medium (N) and serum-free medium (SS) for 4 hours either alone or after 2 hours of pre-incubation with ZVAD-FMK or its vehicle, DMSO (respectively SS-ZVAD and SS-DMSO). \* $p < 0.05$  vs SS and DMSO,  $n = 6$ .

## Supplemental data

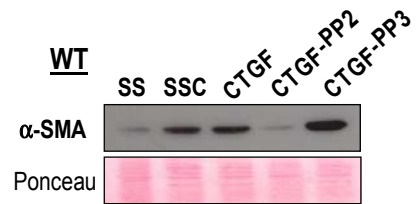
## Figure S3



**Figure S3.** Importance of SFK in myofibroblast differentiation induced by endothelial apoptosis. Immunoblotting analysis: Decreased  $\alpha$ SMA protein levels in *Src<sup>-/-</sup>* and *Fyn<sup>-/-</sup>* mouse fibroblasts exposed to SSC in the presence of PP2 (5  $\mu$ M) for 7 days, compared to the controls (PP3). Ponceau S Red staining is shown as the loading control. These results are representative of 3 independent experiments.

## Supplemental data

## Figure S4



**Figure S4.** CTGF induces myofibroblast differentiation in wild-type mouse fibroblasts. Immunoblotting analysis: Decreased  $\alpha$ SMA protein levels in wild-type mouse fibroblasts exposed for 7 days to SS supplemented with 10 ng/mL of CTGF and 5  $\mu$ M of PP2 compared to mouse fibroblasts exposed to CTGF alone or with PP3. These results are representative of 3 independent experiments.

## **4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

### *Fibrose*

Il est généralement accepté que les fibroblastes et myofibroblastes, de par leur présence soutenue, représentent des joueurs importants dans la reconstruction physiologique des tissus de même que dans la déformation tissulaire pathologique qui caractérise la fibrose (300, 391, 392). La fibrose est en effet consécutive d'un phénomène de réparation incontrôlée. À ce titre, la caractérisation des mécanismes de réparation ouvre une fenêtre importante quant aux possibilités de régulation du développement de la fibrose. La thèse présentée ici traite du développement de la fibrose en se concentrant sur deux phénomènes nécessaires à son développement, soient la résistance à l'apoptose chez les fibroblastes et la différenciation myofibroblastique.

Classiquement et ce en réponse à l'insulte initiale, les composantes tissulaires adjacentes au site endommagé initient une cascade inflammatoire et des événements de reconstruction de la matrice qui sont nécessaires à la restauration de l'intégrité et de la fonction du tissu (393). La caractéristique typique de cette reconstruction est la déposition d'éléments de la matrice extracellulaire qui mèneront à la formation d'une cicatrice mature. Dans un premier temps, la réparation tissulaire est un processus complexe qui débute avec des interactions à travers les différents types cellulaires ce qui mène, entre autres, à l'activation des plaquettes et à l'induction de la cascade de coagulation (393). S'en suit la relâche d'une multitude de facteurs solubles essentiels au recrutement des leucocytes et à l'activation des cellules résidentes. Les cellules inflammatoires recrutés, dont font partie les macrophages, ne seront pas seulement en



mesure de sécréter plusieurs cytokines, chémokines et facteurs de croissance durant la phase immunoinflammatoire, mais aussi en mesure de réguler la phase fibrogénique de la réparation par des interactions directes avec le fibroblaste (394, 395). Cette dernière interaction entre les fibroblastes et les cellules inflammatoires peut aussi favoriser davantage la production de molécules pro-inflammatoires et pro-fibrogéniques résultant en un développement d'une réponse fibroproliférative (396, 397). Au fil des ans, plusieurs cytokines produites par les cellules inflammatoires, en particulier par les macrophages, ont été identifiées et ce aux sites de réparation de même qu'aux sites où la fibrose est activée. Entre autres, on y retrouve du TGF- $\beta$ , du TNF- $\alpha$ , du PDGF, du FGF, de l'interleukine-1 et du MCP-1 qui, d'une façon combinée ou individuellement, peuvent avoir des répercussions sur la régulation de processus fibrotiques telles que l'induction d' $\alpha$ SMA et la production de matrice extracellulaire chez le fibroblaste (177). Les fibroblastes répondent aux altérations de leur microenvironnement par des interactions cellule-cellule et cellule-matrice de façon à réguler la synthèse et/ou la dégradation de la matrice extracellulaire (393). La dérégulation de cette réponse mène à une déposition excessive d'éléments de la matrice extracellulaire et à une cicatrisation hypertrophiée avec perte de fonction au niveau du tissu (393). Une réponse de réparation contrôlée, contrairement au développement de la fibrose, résulte en une cicatrisation minimale qui préserve l'intégrité et la fonction normale du tissu atteint.

À ce jour, plusieurs études tentent encore de caractériser les effets de la réponse inflammatoire en ce qui a trait à l'activation, la prolifération, la différenciation et la sécrétion qui sont associées au comportement du fibroblaste. Pour sa part, mon travail s'est intéressé à définir le potentiel fibrogénique des médiateurs paracrins relâchés par les CE apoptotiques. Non pas que nous rejetons l'idée d'une composante inflammatoire dans la fibrogénèse, mais nous pensons que l'apoptose des CE, par une sécrétion de médiateurs, peut contribuer et même agir individuellement dans l'établissement de processus fibrotiques. Plusieurs groupes ont d'ailleurs démontré que l'insulte initiale, souvent perçue par un dommage endothélial / épithélial, précède le développement de la fibrose (131, 218, 398). Des manifestations cliniques de la fibrose comme la sclérose systémique (SSc), le rejet chronique d'allogreffe ou le «Graft vs Host Disease» (GvHD) sont de bons exemples des répercussions encourues suite à un dommage endothélial chronique (131, 218, 249).

#### *Apoptose endothéliale*

L'augmentation de l'apoptose endothéliale est une des conséquences induites suite à l'insulte initiale et se traduit subséquentement par le déclenchement des processus de réparation (226-228). Des dysfonctions au niveau des mécanismes régulant les processus de mort apoptotique peuvent donc être la source de plusieurs pathologies où l'intégrité du tissu atteint est compromise, soit par un manque ou un surplus de cellules (2). L'élucidation des divers mécanismes d'action contrôlant ces processus représente donc un centre d'intérêt important pour la recherche portant sur l'induction et l'inhibition de la mort cellulaire. La relation évidente existant entre l'augmentation

de l'apoptose endothéliale et le développement de la fibrose est bien détaillée dans la littérature (218, 398). À cet effet, les mécanismes qui y sont décrits portent principalement sur les interactions cellulaires existant entre les CE, les macrophages et les fibroblastes, cette dernière impliquant la sécrétion de TGF- $\beta$ 1. Nous proposons ici un nouveau mécanisme pouvant expliquer le développement de la fibrose secondaire à une augmentation de l'apoptose endothéliale. En accord avec les résultats expérimentaux présentés dans cette thèse, nous démontrons que l'apoptose endothéliale initie la relâche de médiateurs paracrins qui viennent directement favoriser la résistance à l'apoptose chez les fibroblastes et la différenciation myofibroblastique sans nécessité d'interaction avec les cellules inflammatoires. Pour se faire, la carence en sérum a été utilisée pour induire l'apoptose des CE et ce, pour trois principales raisons : la première étant que la carence en sérum représente un inducteur classique de l'apoptose, la deuxième étant que notre système présente beaucoup de similitudes avec plusieurs stimuli pro-apoptoiques fréquemment rencontrés *in vivo* comme l'hypoxie et les stress génotoxiques, tous étant connus pour induire une apoptose p53 dépendante et la troisième étant que le milieu conditionné par des CE soumises au stress pro-apoptotique qu'est la carence en sérum contient que les facteurs issus des CE. En fait, la carence en sérum est un inducteur « propre » de l'apoptose et nous permet de générer un milieu SSC sans les facteurs de croissance normalement présents dans un milieu normal complet avec sérum. Les effets du SSC peuvent donc être attribués aux médiateurs issus des CE.

Beaucoup de recherches ont été concentrées sur les mécanismes intracellulaires régulant l'apoptose, mais peu se sont intéressées aux répercussions paracrines de cette mort cellulaire programmée sur son environnement local. Grâce au système expérimental utilisé dans notre laboratoire, l'apoptose des CE a pu être directement associée à la production de médiateurs qui favorisent l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique et la différenciation myofibroblastique chez le fibroblaste, le tout étant sous contrôle de la voie PI3K/Akt. Le fibroblaste est alors prompt à remodeler la matrice extracellulaire endommagée de façon à réparer le tissu et favoriser une cicatrisation normale. Cependant, une activation excessive de ces mécanismes, par une augmentation chronique de l'apoptose endothéliale menant à une production soutenue de médiateurs issus de cette apoptose ou par l'acquisition d'une sensibilité accrue des fibroblastes à ces médiateurs, serait source de pathologies fibrotiques comme la SSc où le fibroblaste ne cesse de remodeler la matrice extracellulaire.

Les caractéristiques de la SSc font un parallèle plus qu'intéressant avec les résultats obtenus dans ce travail quant à la résistance à l'apoptose des fibroblastes et la différenciation myofibroblastique induites par les médiateurs issus de CE apoptotiques. L'ensemble des mécanismes responsables de ces effets s'apparente aux mécanismes responsables du développement de la fibrose chez les gens atteints de SSc et ce, à partir du tout début du processus. Bien que le développement de cette maladie s'effectue en plusieurs étapes, il a été montré que l'apoptose des CE en SSc constitue un événement pathogénique primaire dans l'établissement de la réponse fibrotique subséquente (196, 399). La relation exacte entre les anomalies de

l'endothélium et le comportement pathologique des fibroblastes n'est pas tout à fait connue, mais les résultats ici présentés décrivent de nouveaux mécanismes fibrotiques d'importance pour la SSc. Les résultats obtenus au cours de mon projet de maîtrise nous ont permis de valider qu'un fragment de perlécan libéré par les CE apoptotiques est en mesure d'induire un phénotype anti-apoptotique chez des fibroblastes issus de lésions de patients atteints de sclérodermie. Nous avons, en fait, montré que ces fibroblastes sclérodermiques disposent d'une sensibilité accrue à l'activité anti-apoptotique du fragment C-terminal du perlécan en comparaison avec des fibroblastes issus de gens contrôles normaux. Il est connu que la survie prolongée des fibroblastes en SSc mène à une augmentation du nombre de cellules fibroblastiques et à une augmentation de la déposition d'éléments de la matrice extracellulaire causant ainsi la progression de la fibrose (206). Des parallèles intéressants peuvent donc être faits entre nos résultats et la littérature existante au sujet de la sclérose systémique : 1. les fibroblastes exposés aux médiateurs issus de CE apoptotiques présentent un phénotype anti-apoptotique tout comme les fibroblastes en SSc, 2. tout comme les fibroblastes issus de patients atteints de SSc, les fibroblastes exposés aux médiateurs issus de CE apoptotiques sont en mesure de sécréter davantage de collagène de type I (202), 3. *Jun et al.* ont montré une augmentation de l'activation de Akt chez les fibroblastes issus de patients sclérodermiques en comparaison avec des fibroblastes normaux. De notre côté, nous avons aussi détecté une augmentation de l'activation de Akt chez les fibroblastes exposés au milieu conditionné par des CE apoptotiques. Dans les deux cas, la voie PI3K/Akt a été impliquée dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste (194). L'ensemble de ces résultats suggère que les

médiateurs issus de l'apoptose endothéliale sont des joueurs déterminants dans l'initiation et l'entretien des processus caractéristiques à la fibrose.

En ce qui a trait aux médiateurs, nous avons identifié des fragments C-terminaux du perlécan et des fragments N-terminaux du «Connective tissue growth factor» qui se retrouvent tous deux présents en plus grande quantité dans le milieu conditionné par des CE apoptotiques en comparaison avec le milieu conditionné par des CE non-apoptotiques. À ce titre, le perlécan et le CTGF sont des éléments qui composent le « protéome » issu des CE apoptotiques qui affectent drastiquement le comportement du fibroblaste, le conduisant même à développer un caractère pro-fibrotique (Figure 6). Physiologiquement parlant, les fibroblastes sont aussi soumis aux diverses interactions qu'ils entretiennent avec la matrice extracellulaire environnante qui, tel que mentionnée dans l'introduction, peut contenir d'importants facteurs de croissance comme le FGF et le TGF- $\beta$ . En fait, la matrice extracellulaire joue un rôle actif dans la mobilisation des facteurs de croissance qui viendront réguler le comportement des cellules environnantes en plus de jouer un rôle passif dans la séquestration de ces dits facteurs (303). La matrice extracellulaire est donc capable de contrôler la diffusion de facteurs solubles permettant alors un approvisionnement local constant de molécules biologiquement actives et ce, même sans la production de nouveaux facteurs (303). Certains facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$ 1 et le PDGF contenus dans la matrice extracellulaire ont besoin d'être clivés par des protéases pour exercer leurs actions (400). Des fragments propres à la matrice extracellulaire peuvent aussi être

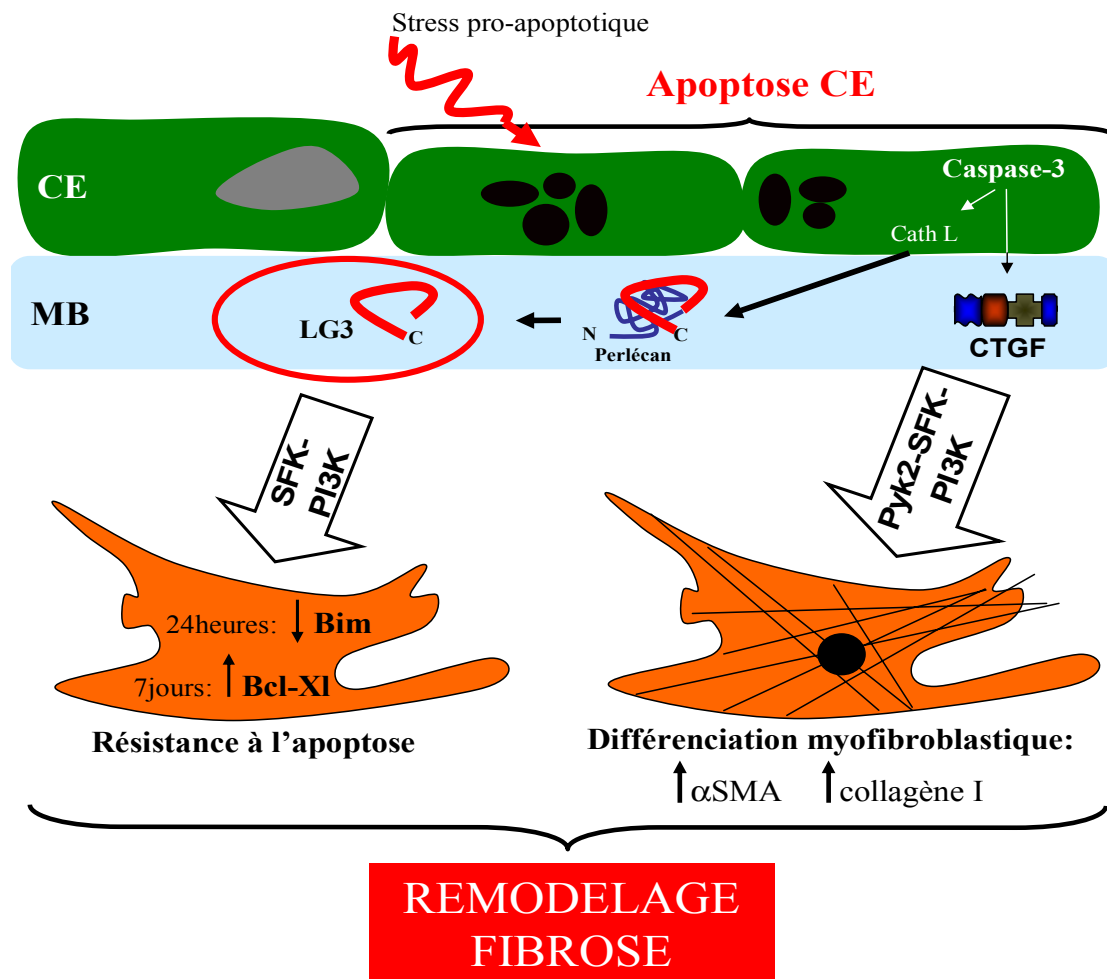


Figure 6. Schéma récapitulatif. Processus pathophysiologiques induits suite à l'apoptose endothéliale au niveau du fibroblaste adapté de *Laplante et al.* (375). L'apoptose caspase-3 dépendante des CE entraîne la production de LG3 via la Cathepsine L (Cath L) et la production de CTGF. Dans un premier, le LG3 induit un

phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste par des voies SFK-PI3K dépendantes modulant séquentiellement les niveaux protéiques de Bim et Bcl-Xl. Dans un deuxième temps, le CTGF induit la différenciation myofibroblastique par des voies Pyk2-SFK et PI3K dépendantes modulant l'expression d' $\alpha$ SMA et de collagène I. L'ensemble de ces effets contribuent au développement d'une réponse fibrotique qui a été validée dans un modèle murin.



libérés comme nous le proposons ici avec le perlécan qui une fois clivé suite à l'apoptose endothéliale, a une activité biologique reconnue (401, 402). D'autres facteurs présents dans le milieu issu des CE apoptotiques, que nous tentons toujours de caractériser, pourraient avoir des activités biologiques spécifiques sur le comportement des fibroblastes. Nos résultats suggèrent que l'apoptose des CE représente un mécanisme permettant l'induction de la protéolyse de la matrice extracellulaire et la production de facteurs pro-fibrotiques qui, à leur tour, influencent la résistance à l'apoptose des fibroblastes et la différenciation myofibroblastique, deux processus caractéristiques au remodelage tissulaire normal. En fait, l'apoptose des CE constitue une étape initiale dans les processus de réparation normaux, mais la production constante des médiateurs issus de cette apoptose devient alors potentiellement responsable du développement de pathologies à caractère fibrotique.

À cet effet, nous avons développé au laboratoire un nouveau modèle murin de peau fibrotique qui nous permet d'évaluer l'impact des médiateurs produits par les CE apoptotiques en faisant abstraction des interactions cellules (CE)-cellules (macrophages) normalement retrouvées. Pour ce faire, des CE isolées à partir d'aortes de souris ont été mises en culture et utilisées de façon à générer *ex vivo* du milieu conditionné comme nous l'avons fait avec les HUVEC. Les milieux récupérés, contenant les médiateurs issus de l'apoptose endothéliale, ont ensuite été injectés aux souris de façon à évaluer directement leur potentiel fibrogénique. Les autres modèles de fibrose utilisant des agents pro-fibrotiques exogènes, tels que la bléomycine ou les rayonnements ionisants ne permettent pas de tester adéquatement notre hypothèse. En

effet, ceux-ci engendrent une réponse inflammatoire et vasculaire aiguë issue du recrutement de macrophages par les CE apoptotiques («interaction cellule-cellule»), qui ne nous permet pas d'évaluer spécifiquement la réponse paracrine des médiateurs produits par les CE apoptotiques sur le développement de la fibrose (403). Le modèle murin de GVHD représente également un modèle de fibrose cutanée, qui mime une forme sévère de sclérodémie humaine à évolution rapide, mais où les monocytes/macrophages et les lymphocytes T déclenchent la réponse fibrogénique (403). Notre modèle d'injection de milieux conditionnés nous permet de déjouer la réponse inflammatoire issue de la composante «interaction cellule apoptotique – cellule phagocytaire» et de la production de TGF- $\beta$ 1 qui lui est normalement associée. Les souris qui ont reçu le milieu conditionné par des CE apoptotiques, qui contient davantage de CTGF en comparaison avec le milieu conditionné par des CE non-apoptotiques, ont présenté des caractéristiques de fibrose accentuées au niveau de la peau. Par ailleurs, le milieu SSC de souris immunodéplété de son CTGF et injecté dans la souris a réduit significativement le développement de la fibrose cutanée en comparaison avec le groupe contrôle confirmant ainsi l'importance du CTGF dans cette réponse.

De façon à confirmer l'importance de l'apoptose endothéliale *in vivo* dans le développement de la fibrose, les prochaines expériences porteront plus spécifiquement sur les CE elles-mêmes. Dans un premier temps, nous ferons des injections de bléomycine (contrôle positif du modèle murin) sur de plus courtes périodes (1 à 3

jours) afin d'évaluer les niveaux initiaux d'apoptose au niveau de l'endothélium des vaisseaux sanguins par TUNEL ou par immunohistochimie contre la caspase-3 activée. La bléomycine est associée dans la littérature avec le développement de la SSc et de la fibrose pulmonaire chez différents modèles animaux dont l'homme (404). Elle peut induire l'apoptose des CE d'une façon dose dépendante en plus d'être responsable de la réponse fibrotique subséquente (405, 406). Les souris qui ont reçu de la bléomycine développent, tout comme celles qui ont reçu du SSC, de la fibrose avec un épaissement de la peau qui est caractérisé par une présence accrue de myofibroblastes et de collagène de type I. Dans un deuxième temps, il serait intéressant de bloquer l'apoptose des CE *in vivo* et d'évaluer les conséquences des injections de bléomycine sur le développement de la fibrose. Pour ce faire, nous disposons de souris transgénique TET:myrAkt sous contrôle d'un promoteur VE-cadherin. Ces souris expriment une forme mutante constitutivement active de Akt qui peut être spécifiquement induite aux niveaux des cellules endothéliales lorsque le traitement à la tétracycline est arrêté (système «tet-off») (407). Une étude a par ailleurs démontré que l'activation endothéliale d'Akt diminue la formation de lésions vasculaires par une augmentation de l'oxyde nitrique (NO), par une diminution de l'apoptose endothéliale et par une diminution des changements inflammatoires et prolifératifs au niveau des composantes du vaisseau sanguin (408). À l'aide de ce modèle, nous pourrions donc évaluer l'impact qu'a l'apoptose endothéliale sur la fibrogénèse induite par la bléomycine. En accord avec nos résultats, une diminution de l'apoptose endothéliale devrait diminuer le développement de la fibrose.

Dans un autre ordre d'idées, il nous est aussi possible d'éliminer la composante «interaction cellule-cellule» (CE apoptotiques et macrophages) dans le modèle murin de fibrose induite à la bléomycine. Nous devons cependant utiliser ici des souris transgéniques CD11b-DTR («diphtheria toxin receptor») qui lorsque traitées à la toxine diphtérique, perdent leur contenu en macrophage (409). Brièvement, la souris CD11b-DTR exprime la forme humaine du «heparin binding epidermal growth factor» (hbEGf ou DT) sous contrôle du promoteur CD11b spécifique au macrophage. La forme murine du hbEGF lie faiblement la toxine diphtérique. Cependant, les souris qui expriment la forme humaine d'une façon cellule spécifique sont excessivement sensibles à la toxine si bien qu'il en résulte en une élimination de la lignée cellulaire affectée, dans le cas présent : les macrophages. À ce titre, les injections de bléomycine dans ce modèle murin nous permettront d'isoler la composante endothéliale sur le développement de la fibrose sans avoir à se soucier d'une éventuelle coopération avec les macrophages.

Ultimement, nous devons aussi s'intéresser aux différentes voies de signalisation que nous avons caractérisées *in vitro* au niveau du fibroblaste. Les injections de LY294002 (inhibiteur de PI3K) et de PP2 (inhibiteur des SFK) ont déjà été répertoriées dans la littérature comme étant efficaces dans les modèles murins. En ce qui regarde Pyk2, nous savons qu'il existe des souris Pyk2 déficientes qui pourraient nous permettre d'évaluer l'importance de Pyk2 *in vivo* dans la différenciation myofibroblastique et la fibrogénèse. Pour l'instant, le nouveau modèle murin que

nous avons établi au laboratoire nous a permis de confirmer l'importance de l'apoptose endothéliale dans la relâche de médiateurs paracrins pro-fibrotiques.

### *Médiateurs*

Dans notre système, l'induction d'un état pro-fibrotique chez le fibroblaste suite à l'apoptose endothéliale nécessite l'action d'au moins deux médiateurs différents, soient le LG3 et le CTGF, suggérant l'existence d'un mécanisme hautement régulé. Par ailleurs, comme nous avons identifié plusieurs médiateurs contenus dans le milieu SSC par spectrométrie de masse, il est fort approprié d'imaginer des interactions potentielles de ces derniers avec le perlécan et/ou le CTGF dont nous connaissons les portées d'action. En fait, l'action seule du CTGF ou du perlécan n'a jamais été en mesure d'induire un phénotype anti-apoptotique ou myofibroblastique aussi important que ceux induits par le milieu conditionné par des CE apoptotiques complet, voire le milieu SSC. Nous devons retenir que : 1. le milieu SSC induit la fibrose, la résistance à l'apoptose et la différenciation myofibroblastique chez les fibroblastes, 2. le LG3 est associé à l'acquisition du phénotype anti-apoptotique, 3. le CTGF est associé à l'acquisition du phénotype myofibroblastique et 4. d'autres médiateurs contenus dans le milieu SSC amplifient ces effets.

En ce qui concerne les autres médiateurs libérés exclusivement par les CE apoptotiques, nous avons identifié la cathepsine L, un enzyme lysosomal. Une étude, récemment publiée, issue de notre groupe de recherche et pour laquelle je suis auteur a pour titre : « Caspase-3 activation triggers extra-cellular cathepsin L release and

endorepellin proteolysis » (410). Le titre en soi élucide une problématique non résolue issue de la première publication proposée dans cette thèse qui porte sur l'acquisition du phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste par le motif LG3 du perlécan. À cet effet, le lien entre l'apoptose endothéliale et la libération d'un fragment tronqué de perlécan était, jusqu'au jour de l'identification de la cathepsine L, inconnu. Il est à noter qu'aucun site de clivage connu par les caspases n'est présent sur le perlécan dans son intégralité. Nous savions, par contre, que les caspases étaient réellement impliquées dans la production du motif LG3 par l'utilisation de l'inhibiteur pan-caspase zVAD-fmk. Ce dernier, lorsque mis en présence des CE en pré-conditionnement, est en mesure de bloquer l'apoptose endothéliale et la production de LG3 (410). La cathepsine L s'est donc avérée être la protéine de liaison entre l'activation des caspases chez les CE et la production du motif LG3 de perlécan. Brièvement, l'étude réalisée par *Cailhier et al.* montre que : 1. des analyses complémentaires de spectrométrie de masse (SDS-PAGE-LC-MS/MS et 2D-LC-MS/MS) ont identifié la cathepsine L comme étant exclusivement relâchée par les CE apoptotiques en comparaison avec les CE non-apoptotiques, 2. la cathepsine L clive l'endorepelline (un fragment C-terminal du perlécan caractérisé et fourni par un collaborateur, Renato V. Iozzo de l'Université Thomas Jefferson à Philadelphie) et libère ainsi le motif LG3 du perlécan, 3. l'inhibition de l'activité Cathepsine L chez les CE prévient la relâche de LG3 lorsque celles-ci sont placées en condition apoptotique et 4. l'inhibition de la caspase-3 par siRNA ou avec l'aide de DEVD-fmk (un inhibiteur chimique spécifique) prévient l'apoptose des CE, l'activation de la cathepsine L et la relâche de LG3 (410). Ce dernier induit un phénotype anti-

apoptotique chez le fibroblaste et a récemment été identifié comme un marqueur de rejet chronique au niveau des transplantations rénales (411, 412). On ne s'attend cependant pas à ce que la cathepsine L, par elle-même, puisse jouer directement un rôle positif sur le développement de la fibrose puisqu'elle est importante à l'homéostasie tissulaire chez la souris. En fait, il a été démontré que les souris déficientes pour la cathepsine L (CTSL<sup>-/-</sup>) sont davantage susceptibles à développer des néphropathies diabétiques (413) et de la néphrose (414). Par ailleurs, les patients souffrant d'une défaillance dans la synthèse et la maturation d'enzymes lysosomiales (*mucopolysaccharidose II*), dont fait partie la cathepsine L, présentent une peau plus épaisse (415). C'est donc dire que le LG3, produit par les CE apoptotiques par l'entremise de la cathepsine L, est impliqué dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste.

Un autre médiateur libéré exclusivement par les CE apoptotiques qui suscitera notre attention au cours des prochaines expériences est l'« Epidermal growth factor » (EGF) et ce, pour trois raisons : 1. l'EGF a seulement été détecté dans le milieu issu de CE apoptotiques, 2. il pourrait y avoir une coopération potentielle entre le CTGF et l'EGF (296) et 3. le rôle de l'EGF, bien que fortement débattu dans la littérature (416), pourrait s'avérer un joueur important dans l'établissement de la fibrose. En effet, l'activation du récepteur EGF est associée à la réponse fibroproliférative retrouvée dans des pathologies humaines du poumon et dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire (417). Des études réalisées avec la bléomycine chez le rat ont montré une association entre l'augmentation de l'activité EGF-récepteur et la

déposition de collagène (418). De plus, l'utilisation de « gefitinib », un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase du récepteur EGF, a su prévenir la fibrose induite par la bléomycine dans le modèle murin (419). Par contre, une autre étude a aussi montré une augmentation de la fibrose intra-trachéale dans le même modèle murin suite à l'utilisation combinée de « gefitinib » et de bléomycine (420). En ce qui concerne l'effet coopératif du CTGF et de l'EGF, cela relève plutôt du domaine de l'hypothèse. Grâce à des études préliminaires non publiées portant sur le CTGF, l'équipe du *Dr Duncan* mentionne que le CTGF faciliterait l'assemblage de cofacteurs tel que l'EGF avec son récepteur spécifique de façon à former un complexe de signalisation macromoléculaire et ainsi favoriser l'activité mitogénique au niveau de la cellule (296).

En relation avec le sujet de cette thèse qui traite, entre autres, des mécanismes de réparation activés suite à l'insulte, il serait intéressant d'évaluer le rôle de l'EGF et du CTGF dans l'activité proliférative initiale perçue au niveau des fibroblastes d'autant plus que l'EGF est classiquement associé à la mise en œuvre de signaux de prolifération. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent d'ailleurs que le milieu issu des CE apoptotiques (SSC), dans lequel on retrouve de l'EGF et du CTGF, est en mesure d'augmenter la prolifération des fibroblastes sur une période allant jusqu'à 4 jours (Annexe 1). Ensuite, on observe une diminution de la prolifération cellulaire qui laisse place, d'une façon inversée, à une augmentation de la différenciation myofibroblastique qui atteint son maximum lorsque les fibroblastes sont exposés au SSC pour une période de 7 jours (Annexe 1). C'est donc dire que les



différentes étapes qui composent le processus de réparation tissulaire peuvent être reproduites dans notre système expérimental, c'est-à-dire la prolifération, la différenciation et la résistance à l'apoptose des fibroblastes.

Il y a plusieurs médiateurs produits par les CE apoptotiques qui ont été identifiés au laboratoire. Certains d'entre eux jouent d'une façon concertée sur le comportement du fibroblaste ce qui nous pousse à comprendre leurs interactions de façon à définir la réponse fibrogénique et ainsi cibler les éléments pathologiques de cette réponse. À ce titre, le motif LG3 du perlécan n'est pas en mesure d'induire la différenciation myofibroblastique dans notre système expérimental. Tel que démontré dans le deuxième article présenté dans cette thèse, le CTGF ainsi que le milieu SSC dont il fait partie sont en mesure d'induire la différenciation myofibroblastique chez plusieurs types de fibroblastes. Il est aussi intéressant de faire un parallèle avec l'étude de *Grotendorst et Duncan* qui, tel que mentionné dans l'introduction, a associé le domaine N-terminal du CTGF à des effets inducteurs sur la différenciation myofibroblastique et la synthèse de collagène (296). Dans son ensemble ou en fraction, le CTGF a des effets spécifiques particuliers, mais la conséquence physiologique de ses différents domaines reste à déterminer. Cependant, le CTGF intact semble être le candidat physiologique le plus probable ayant une activité biologique au niveau de cellules en culture (296). Nous avons ensuite évalué l'importance clinique potentielle du CTGF sur la fibrogénèse dans notre modèle murin de peau fibrotique. Les souris qui ont reçu du milieu SSC immunodéplété de son CTGF n'ont pas été en mesure de développer ces caractéristiques fibrotiques

d'une façon aussi importante que les souris qui ont reçu le SSC complet montrant ainsi l'importance du CTGF dans le développement de la fibrose. Cependant, en comparaison avec les souris qui ont reçu du milieu sans sérum (SS), les souris qui ont reçu le milieu SSC immunodéplété en CTGF présentent tout de même un épaissement de la peau. Ces résultats suggèrent, encore une fois, que les CE apoptotiques libèrent d'autres médiateurs qui auront, en surplus du CTGF, des rôles particuliers pouvant avoir des répercussions sur le développement de la fibrose. La caractérisation et la compréhension de l'ensemble des médiateurs et mécanismes engendrés par l'apoptose endothéliale ne font que débiter.

#### *Indépendance du Transforming growth factor beta*

En regard avec l'ensemble de la littérature, il est pratiquement impossible de dissocier TGF- $\beta$ 1 et différenciation myofibroblastique. Toutefois, nos résultats démontrent que le milieu SSC ou le CTGF sont en mesure d'induire la différenciation myofibroblastique d'une façon indépendante au TGF- $\beta$ 1. Nous avons initialement dosé, par ELISA, la quantité de TGF- $\beta$ 1 retrouvée dans le milieu SSC avant et après exposition aux fibroblastes pendant 7 jours. La concentration de TGF- $\beta$ 1 ainsi retrouvée dans le milieu SSC n'est pas suffisante pour induire la différenciation myofibroblastique (375, 421). Nous pensions donc que cette faible concentration de TGF- $\beta$ 1, en collaboration avec les médiateurs présents dans le milieu SSC, serait nécessaire à l'accomplissement des mécanismes de différenciation myofibroblastique d'autant plus que des évidences dans la littérature montrent que le CTGF peut

augmenter l'affinité du TGF- $\beta$ 1 à son récepteur spécifique (161). Par contre, nous avons ensuite caractérisé les médiateurs présents dans le milieu conditionné par des CE apoptotiques par spectrométrie de masse et n'avons pas retrouvé de TGF- $\beta$  sous aucun isoforme. Les autres isoformes du TGF- $\beta$ , soient  $\beta$ 2 et  $\beta$ 3, sont aussi capables d'induire la différenciation de fibroblastes en myofibroblastes *in vitro* (140). L'expérience réalisée avec l'anticorps neutralisant panTGF- $\beta$  permet aujourd'hui d'affirmer l'indépendance du TGF- $\beta$ 1 dans notre système puisque le milieu SSC complet ou le CTGF seul sont en mesure d'induire la différenciation myofibroblastique *in vitro* même en présence de l'anticorps neutralisant. Par ailleurs, le TGF- $\beta$ 1 est classiquement impliqué dans des mécanismes de survie PI3K/Akt dépendants chez plusieurs types cellulaires dont les fibroblastes (422, 423). Nos résultats nous orientent donc vers une nouvelle voie de survie PI3K/Akt dépendante, mais potentiellement indépendante au TGF- $\beta$ 1. À ce titre, des expériences portant sur la résistance à l'apoptose des fibroblastes induite par le SSC ou le LG3 devront être réalisées en utilisant l'anticorps neutralisant panTGF- $\beta$ . En ce qui concerne la différenciation myofibroblastique, peu d'études présentes dans la littérature proposent des voies de signalisation TGF- $\beta$  indépendantes. En fait, certains groupes ont montré que des cytokines telles que l'Interleukine-1 (IL-1), l'IL-13 et le TNF- $\alpha$  étaient en mesure d'augmenter l'expression d' $\alpha$ SMA chez les fibroblastes ou en mesure d'augmenter la fibrose tissulaire et ce, indépendamment de l'activation du récepteur au TGF- $\beta$ 1 et à l'activation des Smads qui en découlent (424-426). De notre côté, nous montrons que le CTGF, via l'activation de PI3K, est en mesure d'induire la

différenciation myofibroblastique d'une façon indépendante du TGF- $\beta$ . Il est généralement convenu que le TGF- $\beta$ 1 induit la production de CTGF chez le fibroblaste qui, par une boucle autocrine, amplifie le processus de différenciation myofibroblastique. Pour notre part, c'est le CTGF issu des CE apoptotiques qui initie une boucle paracrine active sur la différenciation du fibroblaste en myofibroblaste.

Dans la partie *in vivo* de ce projet de recherche, nous avons aussi injecté des souris avec du CTGF humain recombinant de façon à étudier le développement de la fibrose cutanée. Bien que les souris qui ont reçu du milieu SSC présentaient une peau plus épaisse, les souris traitées au CTGF ont aussi présenté des signes caractéristiques au développement de la fibrose en comparaison aux souris qui ont reçu le véhicule contrôle (milieu sans sérum (SS)). En effet les souris qui ont reçu 400 ng de CTGF recombinant pour une période de 3 semaines présentent 9% d'augmentation de l'épaisseur de la peau en comparaison aux souris qui ont reçu le véhicule. De façon à démontrer que le CTGF seul peut aussi être responsable du développement de la fibrose dans le modèle murin de peau fibrotique, davantage d'expériences devront être réalisées à ce sujet. Par exemple, l'injection combinée de CTGF et d'anticorps neutralisant contre le TGF- $\beta$  ou l'utilisation de souris transgéniques SBE/Tk-luc qui expriment la luciférase en réponse à l'activation des voies de signalisation dépendantes de Smads-2/3 nous permettront de répondre à cette question. La souris SBE/Tk-luc, sensible au TGF- $\beta$ , est une souris qui exprime le gène luciférase (luc) sous le contrôle de «Smad-binding element repeats» (SBE) et d'un promoteur

minimal thymidine kinase (Tk). Dans une mesure où nos mécanismes fibrotiques sont TGF- $\beta$  indépendants, les souris qui recevront du CTGF en présence de l'anticorps neutralisant présenteront des évidences de fibrose équivalentes à celles présentées par les souris traitées au CTGF en présence d'un IgG contrôle. Au niveau des souris SBE/Tk-luc et toujours dans la mesure où notre système est TGF- $\beta$  indépendant, les souris traitées au SSC ou au CTGF ne devrait pas exprimer la luciférase *in vivo*.

Le récepteur par lequel le CTGF exerce ses effets demeure encore aujourd'hui énigmatique. Les mécanismes de sécrétion permettant au CTGF de se retrouver à l'extérieur de la cellule endothéliale le sont d'autant plus. Initialement identifié dans le milieu de culture normal de CE (en fait, des HUVEC), nos résultats ont démontré que le CTGF se retrouve sécrété en plus grande quantité lorsque les CE sont soumises à un stress apoptotique. À cet effet, comme nous l'avons démontré, la sécrétion de CTGF est sous contrôle de la caspase-3 au niveau des CE puisque l'utilisation de l'inhibiteur pan-caspase zVAD-fmk ou de siRNA contre la caspase-3 diminue significativement la libération du facteur de croissance. Malgré cette observation, le lien entre le CTGF et la machinerie sécrétoire est encore aujourd'hui peu définie et ce, même en condition normale. En utilisant des expériences de « pulse-chase » et d'immunofluorescence, l'équipe du *Dr. Leask* a montré chez des fibroblastes et des cellules hépatiques stellaires que le CTGF sécrété colocalise avec le GM130, un marqueur du Golgi (427). Ils ont aussi montré que le CTGF possède en N-terminal une séquence peptidique de sécrétion contenant 37 acides aminés. Cette séquence est

d'ailleurs suffisante et nécessaire à la localisation du CTGF à l'appareil de Golgi (427). Que se passe-t-il entre l'appareil de Golgi et l'externalisation du CTGF et par quelle mesure l'apoptose des CE permet une augmentation de sa sécrétion ? Des études en cours au laboratoire tentent d'élucider cette question. Nous savons cependant que la caspase-3 y joue un rôle important. L'utilisation de siRNA contre la caspase-3 et de microscopie électronique au niveau des CE normales et apoptotiques nous permettra de suivre le cheminement du CTGF à travers son processus sécrétoire.

### *Signalisation*

Tel que discuté plus bas, nous avons caractérisé la signalisation impliquée dans les processus anti-apoptotiques et pro-myofibroblastiques induits au niveau du fibroblaste suite à l'apoptose endothéliale. Ce que l'on remarque de fascinant, c'est l'activation de deux voies de signalisation différentes, issues de deux médiateurs différents, qui se retrouvent régulés spécifiquement dans l'espace temps. Pour faire un parallèle avec les pathologies fibrotiques qui se développent chez l'homme, nous pouvons penser aux phases aiguës et chroniques qui les caractérisent. Cette analogie, d'un point de vue médical, offre une opportunité unique d'approfondir nos connaissances sur ces différentes phases, mais aussi une opportunité de développer un traitement à chacune de ces phases puisqu'elles sont régulées différemment au niveau moléculaire. Par exemple, les kinases Src et Fyn semblent importantes dans la modulation protéique de Bim et dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique précoce (t = 24 heures) chez le fibroblaste en réponse au motif LG3. À long terme (t = 7 jours), une kinase de la famille SFK autre que Src et Fyn semble jouer un rôle important dans la modulation

protéique de Bcl-X1 et dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique tardif chez le fibroblaste en réponse à l'apoptose endothéliale. Le phénotype myofibroblastique qui s'établit tardivement, implique aussi l'activation d'une kinase de la famille SFK autre que Src et Fyn (discuté plus loin). À cet effet, le CTGF et non le LG3 est responsable du processus de différenciation myofibroblastique. C'est donc dire que différents médiateurs, par différentes voies de signalisation, sont séquentiellement responsables des processus de résistance à l'apoptose initiaux et chroniques ainsi que de la différenciation myofibroblastique induits par l'apoptose endothéliale. Advenant le cas où nous pourrions traiter différentes phases caractéristiques au développement de la fibrose, différents outils moléculaires ou pharmacologiques nous permettraient de cibler, par exemple, le fibroblaste résistant initial ou le myofibroblaste persistant. La caractérisation des effecteurs et des voies de signalisation impliqués dans l'acquisition et surtout dans la perpétuation de ces phénotypes pourrait nous aider à prévenir le développement de la fibrose.

En ce qui concerne les voies de signalisation, nos études sur la résistance à l'apoptose des fibroblastes ainsi que la littérature classique attribuée aux processus de différenciation myofibroblastique nous pousse à s'intéresser aux récepteurs de type intégrine. Le perlécan est un constituant majeur de la matrice extracellulaire principalement retrouvé au niveau de la membrane basale des vaisseaux sanguins, sur laquelle repose la couche de CE (261). La CE *in vivo*, soumise à un stress pro-apoptotique, pourrait activer des mécanismes protéolytiques menant au clivage du perlécan de la membrane basale de façon à permettre au motif LG3 d'interagir avec

les cellules avoisinantes. Cette interaction cellule-matrice extracellulaire, via les intégrines  $\alpha 2\beta 1$ , est en mesure d'induire le phénomène de résistance à l'apoptose chez les fibroblastes; phénomènes observés au laboratoire et normalement associés à plusieurs pathologies d'ordre fibrotique comme le rejet chronique d'allogreffe et la SSc. Les fibroblastes possèdent plusieurs récepteurs de type intégrine, lesquels sont friands d'éléments de la matrice extracellulaire et qui, pour certains d'entre eux, ont déjà été répertoriés dans des effets anti-apoptotiques et pro-différenciation (168, 170). Il est aussi connu que le motif LG3 du perlécan est en mesure d'interagir avec la CE de par les intégrines  $\alpha 2\beta 1$  lui conférant un caractère anti-angiogénique (272). Dans notre système, les intégrines  $\alpha 2\beta 1$  sont impliquées dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique chez les fibroblastes. Au niveau de la différenciation myofibroblastique, nos résultats montrent que le motif LG3 du perlécan n'est pas en mesure d'activer ce mécanisme. Nous n'avons donc pas considéré les intégrines  $\alpha 2\beta 1$  dans ce système de différenciation. Par ailleurs, le récepteur cellulaire au CTGF n'est pas connu, mais certaines études ont montré des interactions du CTGF avec les intégrines  $\alpha 5\beta 3$  au niveau des CE (428) ou avec les intégrine  $\alpha I I b \beta 3$  au niveau des plaquettes activées (429). Les intégrines  $\alpha 6\beta 1$  de fibroblastes de peau interagissent aussi avec le CTGF laissant suggérer une potentielle compétition de liaison entre le LG3 et le CTGF au niveau de la  $\beta 1$  intégrine (430). L'effet du CTGF pourrait donc passer par l'activation de ces récepteurs intégrines, ce qui sera considéré dans de futures expériences.



L'indépendance du TGF- $\beta$ 1 en ce qui a trait à la différenciation myofibroblastique n'est pas l'unique découverte qui découle avec la littérature existante. En effet, l'indépendance de FAK dans l'expression d' $\alpha$ SMA et de fibres de stress, soient deux caractéristiques propres aux myofibroblastes, chez les fibroblastes exposés aux médiateurs issus des CE apoptotiques est intéressante. Le groupe de recherche du *Dr Thannickal* s'intéresse depuis plusieurs années aux voies de signalisation activées chez le fibroblaste par le TGF- $\beta$ 1. Ils ont tout d'abord démontré que la différenciation myofibroblastique par le TGF- $\beta$ 1 est dépendante de l'adhésion cellulaire et de l'activation de FAK (168). Plus précisément, l'activation et la phosphorylation de la FAK au site tyrosine 397 dépendent de l'activation des Smad (via le récepteur TGF- $\beta$ 1) en plus de dépendre de son association avec des sous-unités intégrines préalablement activés par l'adhésion de la cellule à une matrice extracellulaire composée de collagène et / ou de fibronectine, le tout étant médié par la liaison du TGF- $\beta$ 1 à son récepteur. La signalisation par les intégrines via l'activation de la FAK est essentielle à l'établissement d'un phénotype myofibroblastique stable dans ce système. Pour faire un parallèle intéressant avec la sclérose systémique, une équipe japonaise a récemment démontré, en utilisant des fibroblastes issus de patients atteints de sclérodermie, qu'une phosphorylation constitutive de FAK était nécessaire à la différenciation myofibroblastique induite par le TGF- $\beta$ 1 (431). Dernièrement, le groupe de recherche du *Dr Thannickal* a démontré l'importance d'une activation combinée de FAK et de PI3K dans l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique chez les myofibroblastes induits au TGF $\beta$ 1 (169). D'autres études ont, par ailleurs,

mentionné que la signalisation intégrine-FAK dépendante prévient l'apoptose dans une variété de types cellulaires (432). Pour notre part, nous avons démontré que l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique et myofibroblastique chez les fibroblastes, bien que non-influencé par le TGF- $\beta$ 1, ne nécessite pas l'activation de FAK, mais bien celle de Pyk2.

L'utilisation de siRNA contre Pyk2 a, en effet, permis d'identifier cette protéine comme étant importante dans le processus de différenciation myofibroblastique induit par le milieu SSC complet ou le CTGF seul. Ayant préalablement démontré l'indépendance surprenante de FAK dans ce système, nous fûmes rassurés qu'un membre de la famille FAK puisse être en mesure de prendre le relais et ainsi assurer le processus de différenciation. Tel que mentionné en introduction, l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique s'établit initialement par l'adhésion du fibroblaste à la matrice extracellulaire environnante (formation des points d'adhésion focaux), une étape qui se fait classiquement par l'activation des intégrines et une signalisation FAK dépendante (130). Il devenait alors bien inquiétant de voir que l'utilisation de siRNA contre FAK n'était pas en mesure de renverser le phénotype myofibroblastique induit par le milieu SSC. Nous ne sommes cependant pas les seuls à avoir trouver un rôle compensatoire pour Pyk2 dans des situations où l'activité de FAK est non requise ou compromise. Une récente étude a dénoté un rôle compensatoire de Pyk2 durant l'angiogénèse de cellules endothéliales conditionnellement muté pour le gène FAK (433). En fait, ils ont même dénoté une augmentation de la présence et de la

phosphorylation de la protéine Pyk2 au niveau des vaisseaux sanguins FAK-déficients. Cette étude, tout comme la nôtre, révèle la capacité d'adaptation exceptionnelle des cellules d'effectuer la transition vers un mécanisme Pyk2-dépendant dans des situations où l'activation de FAK est mise de côté. Cette adaptation permet aussi à la signalisation intégrine dépendante de perdurer en des temps plus difficiles. Une autre étude parallèle et toute aussi récente, réalisée avec des fibroblastes primaires humains et murins, a montré une élévation de l'activité Pyk2 dans des situations où l'activation de FAK est inhibée (434). Cette activation de Pyk2 a pour conséquence d'augmenter l'expression de la p190RhoGEF favorisant ainsi l'activation de RhoA, la formation de points d'adhésion focaux et la motilité cellulaire (434). RhoA, tout comme Cdc42 et Rac1, fait partie de la famille des Rho GTPases et joue un rôle important au niveau du remodelage de l'actine dans pratiquement tous les types cellulaires surtout en ce qui a trait à la formation des fibres de stress. Des résultats non présentés dans cette thèse suggèrent que RhoA est aussi impliquée dans le processus de différenciation myofibroblastique induit par le milieu SSC faisant de ce résultat un parallèle intéressant avec la littérature. En effet, nous avons transfecté nos fibroblastes avec des constructions dominantes négatives (DN) pour RhoA, Rac1 et Cdc42 pour ensuite les exposer au milieu SSC sur une période de 7 jours. Les fibroblastes qui ont reçu le vecteur DN-RhoA n'ont pas été en mesure de se différencier en myofibroblaste, de par l'expression d' $\alpha$ SMA, comparativement aux fibroblastes qui ont reçu les autres vecteurs DN. Davantage d'expériences devront cependant être réalisées afin d'éclaircir la relation potentielle

existant entre Pyk2 et l'activation de RhoA. Par ailleurs, il sera primordial de vérifier l'état des complexes fibronexus au niveau des fibroblastes exposés au milieu SSC (ou au CTGF) dans des situations où l'expression de Pyk2 est compromise puisque FAK y joue normalement un rôle important. Nos résultats suggèrent donc que les médiateurs libérés par les CE apoptotiques sont en mesure d'induire un processus de différenciation myofibroblastique Pyk2 dépendant et non FAK dépendant faisant de cette voie une nouvelle cible d'intervention anti-fibrotique.

Nous avons aussi déterminé que les kinases de la famille Src jouent un rôle important à la fois dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique chez le fibroblaste et à la fois dans la différenciation myofibroblastique. Du côté de l'apoptose, les kinases Src et Fyn, par l'utilisation de fibroblastes déficients, ont été identifiées comme importantes dans l'acquisition du phénotype «résistant» à court terme. Cependant à long terme, le milieu SSC est toujours en mesure d'induire la résistance à l'apoptose chez les fibroblastes Src<sup>-/-</sup>/Fyn<sup>-/-</sup>, qui peut être inhibée par l'utilisation de PP2, laissant sous-entendre l'importance d'une autre kinase de la famille Src dans ce mécanisme. La même tendance a été retrouvée au niveau de la différenciation myofibroblastique, soit un mécanisme qui prend aussi un certain temps à s'établir. Plus précisément, les fibroblastes Src<sup>-/-</sup>/Fyn<sup>-/-</sup> exposés au milieu SSC expriment aussi l' $\alpha$ SMA qui peut s'en trouver inhibée lorsque ces fibroblastes sont mis en présence de PP2. Encore une fois, il doit y avoir une autre kinase de la famille SFK, inhibée par le PP2, qui viendrait assurer les processus tardifs de résistance à

l'apoptose et de différenciation myofibroblastique. L'utilisation de fibroblastes SYF nous a permis d'identifier Yes comme la kinase potentielle étant responsable de ces effets. Potentielle, du fait que les preuves ne sont pas irrévocables pour l'instant. Les fibroblastes SYF exposés au milieu SSC n'expriment pas d' $\alpha$ SMA contrairement aux autres fibroblastes à l'étude laissant donc planer deux hypothèses : 1. les trois kinase (Src, Yes et Fyn) doivent être inhibées pour perdre le phénotype myofibroblastique ce qui montrerait une fonction de redondance et/ou de compensation des membres de la famille SFK ou 2. Yes est la seule kinase responsable de la différenciation myofibroblastique. Nous devons répondre à ces hypothèse prochainement, soit par l'utilisation de siRNA spécifique pour Yes ou soit par l'utilisation de fibroblastes déficients pour cette seule kinase. Les résultats ainsi obtenus seront importants d'un point de vue pharmacologique à savoir si nous devons inhiber seulement une ou plusieurs kinases de façon à prévenir une différenciation myofibroblastique potentiellement pathologique. Notons aussi que les résultats présentés dans le deuxième article de cette thèse portant sur les fibroblastes murins ont comme marqueur de charge le ponceau rouge en immunobuvardage pour des raisons techniques. En effet, il a été jusqu'à présent impossible de détecter l'alpha-tubuline, l'actine ou la GAPDH («glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase») chez les fibroblastes murins traités au milieu sans sérum (SS).

Les voies de signalisation impliquées dans l'acquisition du phénotype anti-apoptotique et myofibroblastique chez le fibroblaste exposé aux médiateurs issus de l'apoptose endothéliale culminent vers l'activation de la PI3K. Initialement, quelques

expériences préliminaires portant sur la viabilité des fibroblastes exposés à différents inhibiteurs chimiques spécifiques (PD98059, Staurosporine, LY294004, Wortmanine) nous ont permis de cibler la voie des PI3K comme potentiellement importante dans le comportement du fibroblaste en réponse au milieu SSC. Nous avons ensuite remarqué que les fibroblastes exposés au milieu SSC avait une activité PI3K précoce importante, de par les niveaux augmentés de phosphorylation de son principal substrat : Akt. À court terme (24 heures), l'utilisation de LY294002, un inhibiteur de l'activité PI3K, permet à la fois de réduire l'activité anti-apoptotique du SSC tout en rétablissant l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim tandis qu'à long terme (7 jours), l'utilisation de LY294002 permet à la fois de réduire l'activité anti-apoptotique du SSC tout en diminuant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-Xl. C'est donc dire que les facteurs relâchés par les CE apoptotiques induisent un état de résistance à l'apoptose PI3K dépendant chez les fibroblastes séquentiellement régulé par les protéines Bim et Bcl-Xl. Encore une fois, l'activation séquentielle des différentes kinases de la famille Src en amont de l'activation de la PI3K pourrait contribuer à la spécificité du signal perçu par le fibroblaste. La voie de signalisation PI3K/Akt est connue dans la littérature pour être impliquée dans une multitude de mécanismes ayant à la fois des rôles dans la prolifération, le métabolisme et la survie de la cellule (194, 374, 383). Puisque l'acquisition d'un phénotype anti-apoptotique PI3K-dépendant chez les fibroblastes est une des caractéristiques du développement de la SSc (194), la voie PI3K/Akt représente une cible d'intervention potentielle pour inhiber le développement de la fibrose dans le modèle murin *in vivo* et ultimement chez l'humain. Il est aussi connu que la voie PI3K/Akt joue aussi un rôle important

dans les mécanismes de différenciation myofibroblastique, une autre caractéristique du développement de la fibrose (168, 435). Nous avons initialement vérifié si le LY294002 était en mesure de bloquer le processus de différenciation induit par le SSC chez les fibroblastes. L'exposition de fibroblastes pour 7 jours au milieu SSC en présence de LY294002 bloque l'expression d' $\alpha$ -SMA suggérant ainsi un mécanisme de différenciation myofibroblastique PI3K dépendant. Encore ici, la voie PI3K/Akt pourrait être ciblée en temps opportun de façon à empêcher les processus de différenciation myofibroblastique pathologiques comme on le retrouve en SSc (436). Nous devons cependant tenir compte de l'importance de la voie PI3K/Akt dans les processus de réparation initiaux induits par l'apoptose des CE.

L'apoptose est un mécanisme de suicide cellulaire hautement orchestré qui joue un rôle important dans les processus allant de l'embryogénèse à l'homéostasie tissulaire. Une dérégulation des mécanismes impliqués dans le processus de mort cellulaire programmé entraîne un déséquilibre au niveau de l'homéostasie chez l'être vivant qui peut avoir des conséquences pathologiques fort importantes. Entre autres, l'apoptose des CE est de plus en plus associée à des pathologies d'ordre fibrotiques où elle y joue un rôle d'initiateur. En ce qui concerne la fibrose, c'est davantage un manque d'apoptose au niveau de la population fibroblastique qui est cause de la pathogénèse. Comme dans bien des choses, l'équilibre prime. La régulation des processus apoptotiques n'y échappe pas. Nos résultats ont cependant permis d'améliorer notre compréhension quant aux mécanismes caractéristiques du développement de la

fibrose. Précédemment, l'interaction retrouvée entre les CE apoptotiques, les macrophages et les fibroblastes représentait un mécanisme unique dans la fibrogénèse TGF- $\beta$ 1 dépendante. Maintenant, nous devons, en plus, considérer que les médiateurs paracrins, tels que le LG3 et le CTGF, issus des CE apoptotiques sont en mesure d'interagir directement avec les fibroblastes d'une façon indépendante au TGF- $\beta$ 1. Cette dernière interaction est en mesure de favoriser la différenciation myofibroblastique et la résistance à l'apoptose des fibroblastes, deux caractéristique de la fibrose, par des voies de signalisation dépendantes de SFK, Pyk2 et PI3K.



## **5. CONCLUSION**

La fibrose en deux parties : de la paillasse à la souris. Je titre, en fait, la fibrose en deux parties pour deux raisons. Dans un premier temps, je me suis intéressé aux deux caractéristiques principales associées au développement de la fibrose, soit la résistance à l'apoptose des fibroblastes et soit, la différenciation myofibroblastique. Dans un deuxième temps, j'ai tout d'abord caractérisé les phénotypes anti-apoptotiques et myofibroblastiques *in vitro* au niveau de cellules en culture pour ensuite appliquer les résultats de façon *in vivo* avec un modèle fibrotique murin. Comme dans bien des cas de fibrose (sclérose systémique, rejet chronique d'allogreffe), l'apoptose des CE a, encore une fois, été identifiée comme élément déclencheur.

Nous avons démontré au laboratoire que l'apoptose des CE entraîne la production de médiateurs qui viendront affecter les différents constituants cellulaires avoisinants, dont font partie les fibroblastes. Le thème de recherche au laboratoire du Dre Hébert s'oriente sur le remodelage vasculaire induit par l'apoptose endothéliale. À ce sujet, les résultats présentés dans cette thèse cadrent bien avec les autres résultats issus du laboratoire portant sur les CE et les cellules musculaires lisses, soient deux autres composantes cellulaires de la paroi vasculaire. En effet, les médiateurs issus des CE apoptotiques sont en mesure d'induire un phénotype anti-apoptotique chez les cellules musculaires lisses et les CE elle-même et ce, respectivement par l'activation de voies de signalisation ERK1/2 et PKC dépendantes (402, 437). Le point de départ de ce projet de doctorat était, en fait, la fin de mon projet de maîtrise où nous avons démontré que l'activation d'une voie de signalisation PI3K dépendante chez les fibroblastes leur conférait aussi un phénotype anti-apoptotique (375). Trois voies de

signalisation différentes pour trois types cellulaires différents ! Cette situation, d'un point de vue pharmacologique, peut s'avérer avantageuse d'une façon où plusieurs stratégies moléculaires peuvent être développées afin de bloquer spécifiquement et sélectivement les cellules et voies de signalisation impliquées dans le remodelage tissulaire pathologique. En temps normaux, les signaux protecteurs et réparateurs transmis par la CE apoptotique modulent le comportement des cellules musculaires lisses et des fibroblastes assurant ainsi les processus de réparation activés suite à l'insulte. Cependant, une activation soutenue de l'apoptose endothéliale peut mener à une production excessive de médiateurs pro-réparation qui pourront alors être considérés comme pro-fibrotiques et responsables du développement des pathologies ci-haut mentionnées. En fait, il est possible d'y observer un remodelage tissulaire perpétuel qui se caractérise par une production excessive de matrice extracellulaire menant au développement de la fibrose. Les fibroblastes et myofibroblastes jouent d'ailleurs un rôle important au niveau de cette réponse.

Grâce à la poursuite de mon projet de maîtrise portant sur la réponse du fibroblaste, les résultats obtenus au doctorat améliorent davantage la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la fibrose en général. L'utilisation de la souris a par ailleurs permis d'associer physiologiquement et de façon impressionnante l'importance de nos résultats avec la fibrogénèse. Globalement, nous avons associé les répercussions paracrines de l'apoptose endothéliale au développement de processus fibrotiques. Les mécanismes impliqués dans ces processus n'ont jamais été bien caractérisés. Nous possédons maintenant

deux candidats issus de l'apoptose endothéliale qui sont responsable de ces phénomènes fibrotiques, soient le motif LG3 du perlécan et le CTGF. L'un semblant davantage impliqué au niveau de la résistance à l'apoptose chez le fibroblaste, le deuxième davantage impliqué au niveau de la différenciation myofibroblastique. Encore une fois, différents médiateurs pour différents comportements cellulaires ! Avec l'élucidation des voies de signalisation intracellulaires activées chez le fibroblaste, les différents effets de ces médiateurs offrent davantage de possibilités de « contrôle » en ce qui concerne le développement de la fibrose. Les médiateurs eux-mêmes ou les récepteurs cellulaires par lesquels ils interagissent représentent maintenant, tout comme les protéines de signalisation, des avenues thérapeutiques intéressantes. Notons cependant que les CE apoptotiques produisent plus que ces deux médiateurs que sont le perlécan et le CTGF et que c'est l'ensemble de ceux-ci qui produisent les phénotypes anti-apoptotiques et myofibroblastiques complets dans notre système expérimental. Le motif LG3 et le CTGF ne reproduisent qu'une partie de la réponse normalement médiée par le milieu SSC laissant ainsi entrevoir l'importance de d'autres médiateurs jusqu'à ce jour, non caractérisé.

L'apoptose est un processus de mort cellulaire caractérisé par le retrait silencieux d'une cellule en désir de mourir, mais qui, à l'encontre de certains dogmes, est aussi bien actif sur son environnement. L'évolution des êtres vivants, dont nous faisons partie, a permis d'adapter différents mécanismes de protection contre l'insulte. En fait, l'apoptose des cellules endothéliales et les répercussions paracrines de ce suicide que nous avons observées chez les fibroblastes dans cette étude en sont un bon

exemple. Par contre, une chronicité de l'insulte au niveau de l'endothélium pourrait potentialiser la relâche de facteurs paracrins ce qui perpétuera l'activité du remodelage tissulaire, le tout favorisant le développement de la fibrose.

## **6. RÉFÉRENCES**

1. Yuan, J.Y., and Horvitz, H.R. 1990. The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Dev Biol* 138:33-41.
2. Ameisen, J.C. 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 9:367-393.
3. Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776.
4. Leist, M., and Jaattela, M. 2001. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:589-598.
5. Reed, J.C. 2000. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157:1415-1430.
6. Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. 2003. Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 299:214-215.
7. Raff, M.C. 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356:397-400.
8. Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S., and Orlandini, S.Z. 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol* 182:41-49.
9. Van Cruchten, S., and Van Den Broeck, W. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31:214-223.
10. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.
11. Steller, H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267:1445-1449.

12. Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
13. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148:2207-2216.
14. Roy, C., Brown, D.L., Little, J.E., Valentine, B.K., Walker, P.R., Sikorska, M., Leblanc, J., and Chaly, N. 1992. The topoisomerase II inhibitor teniposide (VM-26) induces apoptosis in unstimulated mature murine lymphocytes. *Exp Cell Res* 200:416-424.
15. Wyllie, A.H. 1980. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556.
16. Bratton, S.B., and Cohen, G.M. 2001. Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* 22:306-315.
17. Kaufmann, S.H., and Hengartner, M.O. 2001. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11:526-534.
18. Yuan, J. 1997. Transducing signals of life and death. *Curr Opin Cell Biol* 9:247-251.
19. Earnshaw, W.C., Martins, L.M., and Kaufmann, S.H. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68:383-424.
20. Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312-1316.



21. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., and Wang, X. 1999. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:269-290.
22. Degterev, A., and Yuan, J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:378-390.
23. Takai, Y., Matikainen, T., Jurisicova, A., Kim, M.R., Trbovich, A.M., Fujita, E., Nakagawa, T., Lemmers, B., Flavell, R.A., Hakem, R., et al. 2007. Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. *Apoptosis* 12:791-800.
24. Troy, C.M., Rabacchi, S.A., Hohl, J.B., Angelastro, J.M., Greene, L.A., and Shelanski, M.L. 2001. Death in the balance: alternative participation of the caspase-2 and -9 pathways in neuronal death induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurosci* 21:5007-5016.
25. Grutter, M.G. 2000. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10:649-655.
26. Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273:2926-2930.
27. Cryns, V., and Yuan, J. 1998. Proteases to die for. *Genes Dev* 12:1551-1570.
28. Lamkanfi, M., Declercq, W., Kalai, M., Saelens, X., and Vandenabeele, P. 2002. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* 9:358-361.
29. Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., et al. 1997.

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* 272:17907-17911.

30. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-184.

31. Widlak, P. 2000. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Pol* 47:1037-1044.

32. Buendia, B., Santa-Maria, A., and Courvalin, J.C. 1999. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci* 112 ( Pt 11):1743-1753.

33. Rao, L., Perez, D., and White, E. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135:1441-1455.

34. Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J., et al. 1997. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278:294-298.

35. Rudel, T., and Bokoch, G.M. 1997. Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276:1571-1574.

36. Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C.M. 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440-1443.

37. Adams, J.M., and Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322-1326.
38. Antonsson, B., and Martinou, J.C. 2000. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256:50-57.
39. Green, D.R., and Reed, J.C. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
40. Veis, D.J., Sorenson, C.M., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75:229-240.
41. Shimizu, S., Shinohara, Y., and Tsujimoto, Y. 2000. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19:4309-4318.
42. Vander Heiden, M.G., Chandel, N.S., Williamson, E.K., Schumacker, P.T., and Thompson, C.B. 1997. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91:627-637.
43. Fang, G., Chang, B.S., Kim, C.N., Perkins, C., Thompson, C.B., and Bhalla, K.N. 1998. "Loop" domain is necessary for taxol-induced mobility shift and phosphorylation of Bcl-2 as well as for inhibiting taxol-induced cytosolic accumulation of cytochrome c and apoptosis. *Cancer Res* 58:3202-3208.
44. Ibrado, A.M., Huang, Y., Fang, G., Liu, L., and Bhalla, K. 1996. Overexpression of Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Res* 56:4743-4748.

45. Nakano, K., and Vousden, K.H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683-694.
46. Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.
47. Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. 2006. Multiple pathways of cytochrome c release from mitochondria in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1757:639-647.
48. Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14:2060-2071.
49. Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., et al. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 315:856-859.
50. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. 2000. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288:1053-1058.
51. Villunger, A., Michalak, E.M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M.J., Adams, J.M., and Strasser, A. 2003. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* 302:1036-1038.
52. Bouillet, P., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., Puthalakath, H., O'Connor, L., Cory, S., Adams, J.M., and Strasser, A. 2000. The role of the pro-apoptotic Bcl-2 family member bim in physiological cell death. *Ann N Y Acad Sci* 926:83-89.

53. Reginato, M.J., Mills, K.R., Paulus, J.K., Lynch, D.K., Sgroi, D.C., Debnath, J., Muthuswamy, S.K., and Brugge, J.S. 2003. Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol* 5:733-740.
54. Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., and Strasser, A. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3:287-296.
55. Reed, J.C. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 387:773-776.
56. Ferri, K.F., and Kroemer, G. 2001. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3:E255-263.
57. Ko, L.J., and Prives, C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10:1054-1072.
58. Prives, C., and Hall, P.A. 1999. The p53 pathway. *J Pathol* 187:112-126.
59. Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. 1995. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80:285-291.
60. Jiang, P., Du, W., Heese, K., and Wu, M. 2006. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 26:9071-9082.
61. Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. 1997. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91:231-241.

62. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33-42.
63. Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412:95-99.
64. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441-446.
65. Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406:855-862.
66. Deveraux, Q.L., and Reed, J.C. 1999. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239-252.
67. Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., et al. 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* 277:445-454.
68. Lorenzo, H.K., Susin, S.A., Penninger, J., and Kroemer, G. 1999. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6:516-524.
69. Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., et al. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* 410:549-554.

70. Loeffler, M., and Kroemer, G. 2000. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* 256:19-26.
71. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43-50.
72. Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W.T., and Wang, X. 1998. The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8461-8466.
73. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479-489.
74. Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R., and Alnemri, E.S. 1999. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 274:17941-17945.
75. Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. 1999. An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274:11549-11556.
76. Hofmann, K., Bucher, P., and Tschopp, J. 1997. The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. *Trends Biochem Sci* 22:155-156.
77. Horvitz, H.R. 1999. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59:1701s-1706s.
78. Salvesen, G.S., and Dixit, V.M. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10964-10967.

79. Bertin, J., Nir, W.J., Fischer, C.M., Tayber, O.V., Errada, P.R., Grant, J.R., Keilty, J.J., Gosselin, M.L., Robison, K.E., Wong, G.H., et al. 1999. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 274:12955-12958.
80. Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F.F., Yamaoka, S., and Nunez, G. 2001. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 276:4812-4818.
81. Poyet, J.L., Srinivasula, S.M., Tnani, M., Razmara, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E.S. 2001. Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1. *J Biol Chem* 276:28309-28313.
82. Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., and Korsmeyer, S.J. 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400:886-891.
83. Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-795.
84. Yang, X., Chang, H.Y., and Baltimore, D. 1998. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis. *Science* 281:1355-1357.
85. Cohen, G.M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 ( Pt 1):1-16.
86. Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491-501.



87. Schendel, S.L., Azimov, R., Pawlowski, K., Godzik, A., Kagan, B.L., and Reed, J.C. 1999. Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID. *J Biol Chem* 274:21932-21936.
88. Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
89. Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., and Jaattela, M. 2001. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 153:999-1010.
90. Harvey, K.J., Lukovic, D., and Ucker, D.S. 2000. Caspase-dependent Cdk activity is a requisite effector of apoptotic death events. *J Cell Biol* 148:59-72.
91. Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., and Egeblad, M. 1998. Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. *Embo J* 17:6124-6134.
92. Lacana, E., Ganjei, J.K., Vito, P., and D'Adamio, L. 1997. Dissociation of apoptosis and activation of IL-1beta-converting enzyme/Ced-3 proteases by ALG-2 and the truncated Alzheimer's gene ALG-3. *J Immunol* 158:5129-5135.
93. Wright, S.C., Schellenberger, U., Wang, H., Kinder, D.H., Talhouk, J.W., and Larrick, J.W. 1997. Activation of CPP32-like proteases is not sufficient to trigger apoptosis: inhibition of apoptosis by agents that suppress activation of AP24, but not CPP32-like activity. *J Exp Med* 186:1107-1117.

94. Elliott, K., Ge, K., Du, W., and Prendergast, G.C. 2000. The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene* 19:4669-4684.
95. McCarthy, N.J., Whyte, M.K., Gilbert, C.S., and Evan, G.I. 1997. 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* 136:215-227.
96. Leist, M., Single, B., Naumann, H., Fava, E., Simon, B., Kuhnle, S., and Nicotera, P. 1999. Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res* 249:396-403.
97. Edinger, A.L., and Thompson, C.B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16:663-669.
98. Lockshin, R.A., and Zakeri, Z. 2004. Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23:2766-2773.
99. Nelson, D.A., and White, E. 2004. Exploiting different ways to die. *Genes Dev* 18:1223-1226.
100. Clarke, P.G. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181:195-213.
101. Schweichel, J.U., and Merker, H.J. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7:253-266.
102. Levine, B., and Klionsky, D.J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463-477.
103. Ohsumi, Y. 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:211-216.

104. Klionsky, D.J., and Emr, S.D. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290:1717-1721.
105. Ahlberg, J., Marzella, L., and Glaumann, H. 1982. Uptake and degradation of proteins by isolated rat liver lysosomes. Suggestion of a microautophagic pathway of proteolysis. *Lab Invest* 47:523-532.
106. Arstila, A.U., and Trump, B.F. 1968. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am J Pathol* 53:687-733.
107. Cuervo, A.M., and Dice, J.F. 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273:501-503.
108. Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et al. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5:539-545.
109. Grimsley, C., and Ravichandran, K.S. 2003. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends Cell Biol* 13:648-656.
110. Lauber, K., Blumenthal, S.G., Waibel, M., and Wesselborg, S. 2004. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 14:277-287.
111. Meley, D., Pattingre, S., and Codogno, P. 2006. [PI3 kinases and the control of autophagia]. *Bull Cancer* 93:439-444.
112. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17:596-603.

113. Luo, J., Manning, B.D., and Cantley, L.C. 2003. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4:257-262.
114. Kwiatkowski, D.J., and Manning, B.D. 2005. Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Hum Mol Genet* 14 Spec No. 2:R251-258.
115. Chan, F.K., Shisler, J., Bixby, J.G., Felices, M., Zheng, L., Appel, M., Orenstein, J., Moss, B., and Lenardo, M.J. 2003. A role for tumor necrosis factor receptor-2 and receptor-interacting protein in programmed necrosis and antiviral responses. *J Biol Chem* 278:51613-51621.
116. Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1:112-119.
117. Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1:489-495.
118. Kawahara, A., Ohsawa, Y., Matsumura, H., Uchiyama, Y., and Nagata, S. 1998. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol* 143:1353-1360.
119. Lemasters, J.J., Qian, T., Bradham, C.A., Brenner, D.A., Cascio, W.E., Trost, L.C., Nishimura, Y., Nieminen, A.L., and Herman, B. 1999. Mitochondrial

dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr* 31:305-319.

120. Alison, M.R., and Sarraf, C.E. 1994. Liver cell death: patterns and mechanisms. *Gut* 35:577-581.

121. Leist, M., and Jaattela, M. 2001. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ* 8:324-326.

122. Deiss, L.P., Galinka, H., Berissi, H., Cohen, O., and Kimchi, A. 1996. Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon-gamma, Fas/APO-1 and TNF-alpha. *Embo J* 15:3861-3870.

123. Roberg, K. 2001. Relocalization of cathepsin D and cytochrome c early in apoptosis revealed by immunoelectron microscopy. *Lab Invest* 81:149-158.

124. Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., Kaufmann, S.H., and Gores, G.J. 2000. Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 106:1127-1137.

125. Schotte, P., Van Criekinge, W., Van de Craen, M., Van Loo, G., Desmedt, M., Grooten, J., Cornelissen, M., De Ridder, L., Vandekerckhove, J., Fiers, W., et al. 1998. Cathepsin B-mediated activation of the proinflammatory caspase-11. *Biochem Biophys Res Commun* 251:379-387.

126. Stoka, V., Turk, B., Schendel, S.L., Kim, T.H., Cirman, T., Snipas, S.J., Ellerby, L.M., Bredesen, D., Freeze, H., Abrahamson, M., et al. 2001. Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 276:3149-3157.

127. Wynn, T.A. 2007. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest* 117:524-529.
128. Kumar, V., Abbas, A.K., and Fausto, N. 2005. Tissue renewal and repair : regeneration, healing, and fibrosis. *Pathological basis of diseases*:87-118{Wynn, 2007 #2385}.
129. Friedman, S.L. 2004. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 1:98-105.
130. Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R.A. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:349-363.
131. Cailhier, J.F., Laplante, P., and Hebert, M.J. 2006. Endothelial apoptosis and chronic transplant vasculopathy: recent results, novel mechanisms. *Am J Transplant* 6:247-253.
132. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. 1994. *Molecular biology of the cell*. 3th:1361p.
133. Sartore, S., Chiavegato, A., Faggin, E., Franch, R., Puato, M., Ausoni, S., and Pauletto, P. 2001. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 89:1111-1121.
134. Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C.E., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. 2001. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 159:1009-1020.

135. Lindahl, P., and Betsholtz, C. 1998. Not all myofibroblasts are alike: revisiting the role of PDGF-A and PDGF-B using PDGF-targeted mice. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7:21-26.
136. Martin, P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276:75-81.
137. Desmouliere, A., Rubbia-Brandt, L., Grau, G., and Gabbiani, G. 1992. Heparin induces alpha-smooth muscle actin expression in cultured fibroblasts and in granulation tissue myofibroblasts. *Lab Invest* 67:716-726.
138. Rubbia-Brandt, L., Sappino, A.P., and Gabbiani, G. 1991. Locally applied GM-CSF induces the accumulation of alpha-smooth muscle actin containing myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 60:73-82.
139. Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., and West, A.B. 1999. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277:C1-9.
140. Serini, G., and Gabbiani, G. 1999. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp Cell Res* 250:273-283.
141. Grinnell, F. 2000. Fibroblast-collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. *Trends Cell Biol* 10:362-365.
142. Burridge, K., and Chrzanowska-Wodnicka, M. 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:463-518.
143. Kreis, T.E., and Birchmeier, W. 1980. Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. *Cell* 22:555-561.

144. Dugina, V., Fontao, L., Chaponnier, C., Vasiliev, J., and Gabbiani, G. 2001. Focal adhesion features during myofibroblastic differentiation are controlled by intracellular and extracellular factors. *J Cell Sci* 114:3285-3296.
145. Singer, II, Kawka, D.W., Kazazis, D.M., and Clark, R.A. 1984. In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. *J Cell Biol* 98:2091-2106.
146. Chicurel, M.E., Chen, C.S., and Ingber, D.E. 1998. Cellular control lies in the balance of forces. *Curr Opin Cell Biol* 10:232-239.
147. Geiger, B., and Bershadsky, A. 2001. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol* 13:584-592.
148. Darby, I., Skalli, O., and Gabbiani, G. 1990. Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 63:21-29.
149. Skalli, O., Ropraz, P., Trzeciak, A., Benzonana, G., Gillessen, D., and Gabbiani, G. 1986. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol* 103:2787-2796.
150. Eyden, B. 2004. Fibroblast phenotype plasticity: relevance for understanding heterogeneity in "fibroblastic" tumors. *Ultrastruct Pathol* 28:307-319.
151. Gabbiani, G., Ryan, G.B., and Majne, G. 1971. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27:549-550.



152. Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., and Gabbiani, G. 1993. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122:103-111.
153. Zhang, H.Y., and Phan, S.H. 1999. Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1). *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:658-665.
154. Phan, S.H. 2002. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* 122:286S-289S.
155. Borsi, L., Castellani, P., Risso, A.M., Leprini, A., and Zardi, L. 1990. Transforming growth factor-beta regulates the splicing pattern of fibronectin messenger RNA precursor. *FEBS Lett* 261:175-178.
156. Brunner, A., Chinn, J., Neubauer, M., and Purchio, A.F. 1991. Identification of a gene family regulated by transforming growth factor-beta. *DNA Cell Biol* 10:293-300.
157. Ronnov-Jessen, L., and Petersen, O.W. 1993. Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Lab Invest* 68:696-707.
158. Schnabl, B., Kweon, Y.O., Frederick, J.P., Wang, X.F., Rippe, R.A., and Brenner, D.A. 2001. The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation. *Hepatology* 34:89-100.

159. Vaughan, M.B., Howard, E.W., and Tomasek, J.J. 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res* 257:180-189.
160. Cheng, O., Thuillier, R., Sampson, E., Schultz, G., Ruiz, P., Zhang, X., Yuen, P.S., and Mannon, R.B. 2006. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *Am J Transplant* 6:2292-2306.
161. Abreu, J.G., Ketpura, N.I., Reversade, B., and De Robertis, E.M. 2002. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 4:599-604.
162. Kim, S.J., Angel, P., Lafyatis, R., Hattori, K., Kim, K.Y., Sporn, M.B., Karin, M., and Roberts, A.B. 1990. Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 10:1492-1497.
163. Schmid, P., Itin, P., Cherry, G., Bi, C., and Cox, D.A. 1998. Enhanced expression of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in wound granulation tissue and hypertrophic scar. *Am J Pathol* 152:485-493.
164. Matthey, D.L., Dawes, P.T., Nixon, N.B., and Slater, H. 1997. Transforming growth factor beta 1 and interleukin 4 induced alpha smooth muscle actin expression and myofibroblast-like differentiation in human synovial fibroblasts in vitro: modulation by basic fibroblast growth factor. *Ann Rheum Dis* 56:426-431.
165. Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471.
166. Massague, J., and Wotton, D. 2000. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *Embo J* 19:1745-1754.

167. Serini, G., Bochaton-Piallat, M.L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L., and Gabbiani, G. 1998. The fibronectin domain ED-A is crucial for myofibroblastic phenotype induction by transforming growth factor-beta1. *J Cell Biol* 142:873-881.
168. Thannickal, V.J., Lee, D.Y., White, E.S., Cui, Z., Larios, J.M., Chacon, R., Horowitz, J.C., Day, R.M., and Thomas, P.E. 2003. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 278:12384-12389.
169. Horowitz, J.C., Rogers, D.S., Sharma, V., Vittal, R., White, E.S., Cui, Z., and Thannickal, V.J. 2007. Combinatorial activation of FAK and AKT by transforming growth factor-beta1 confers an anoikis-resistant phenotype to myofibroblasts. *Cell Signal* 19:761-771.
170. Tian, B., Lessan, K., Kahm, J., Kleidon, J., and Henke, C. 2002. beta 1 integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway. *J Biol Chem* 277:24667-24675.
171. Blobe, G.C., Schiemann, W.P., and Lodish, H.F. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342:1350-1358.
172. Massague, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169-178.
173. Chodon, T., Sugihara, T., Igawa, H.H., Funayama, E., and Furukawa, H. 2000. Keloid-derived fibroblasts are refractory to Fas-mediated apoptosis and

neutralization of autocrine transforming growth factor-beta1 can abrogate this resistance. *Am J Pathol* 157:1661-1669.

174. Horowitz, J.C., Lee, D.Y., Waghray, M., Keshamouni, V.G., Thomas, P.E., Zhang, H., Cui, Z., and Thannickal, V.J. 2004. Activation of the pro-survival phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway by transforming growth factor-beta1 in mesenchymal cells is mediated by p38 MAPK-dependent induction of an autocrine growth factor. *J Biol Chem* 279:1359-1367.

175. Moses, H.L., Coffey, R.J., Jr., Leof, E.B., Lyons, R.M., and Keski-Oja, J. 1987. Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation. *J Cell Physiol Suppl* 5:1-7.

176. Thannickal, V.J., Aldweib, K.D., Rajan, T., and Fanburg, B.L. 1998. Upregulated expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors by transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) mediates enhanced mitogenic responses to FGFs in cultured human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 251:437-441.

177. Zhang, K., and Phan, S.H. 1996. Cytokines and pulmonary fibrosis. *Biol Signals* 5:232-239.

178. Thannickal, V.J., Toews, G.B., White, E.S., Lynch, J.P., 3rd, and Martinez, F.J. 2004. Mechanisms of pulmonary fibrosis. *Annu Rev Med* 55:395-417.

179. Sgonc, R. 1999. The vascular perspective of systemic sclerosis: of chickens, mice and men. *Int Arch Allergy Immunol* 120:169-176.

180. van den Brink, M.R., and Burakoff, S.J. 2002. Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat Rev Immunol* 2:273-281.

181. Symmers, W.S. 1952. Thrombotic microangiopathic haemolytic anaemia (thrombotic microangiopathy). *Br Med J* 2:897-903.
182. Bombeli, T., Karsan, A., Tait, J.F., and Harlan, J.M. 1997. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 89:2429-2442.
183. Bombeli, T., Schwartz, B.R., and Harlan, J.M. 1999. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* 93:3831-3838.
184. Casciola-Rosen, L., Rosen, A., Petri, M., and Schlissel, M. 1996. 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* 93:1624-1629.
185. Greeno, E.W., Bach, R.R., and Moldow, C.F. 1996. Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity. *Lab Invest* 75:281-289.
186. Laurence, J., and Mitra, D. 1997. Apoptosis of microvascular endothelial cells in the pathophysiology of thrombotic thrombocytopenic purpura/sporadic hemolytic uremic syndrome. *Semin Hematol* 34:98-105.
187. Mitra, D., Jaffe, E.A., Weksler, B., Hajjar, K.A., Soderland, C., and Laurence, J. 1997. Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic-uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells. *Blood* 89:1224-1234.
188. Gagnadoux, M.F., Habib, R., Gubler, M.C., Bacri, J.L., and Broyer, M. 1996. Long-term (15-25 years) outcome of childhood hemolytic-uremic syndrome. *Clin Nephrol* 46:39-41.

189. Matsumae, T., Takebayashi, S., and Naito, S. 1996. The clinico-pathological characteristics and outcome in hemolytic-uremic syndrome of adults. *Clin Nephrol* 45:153-162.
190. Morel-Maroger, L., Kanfer, A., Solez, K., Sraer, J.D., and Richet, G. 1979. Prognostic importance of vascular lesions in acute renal failure with microangiopathic hemolytic anemia (hemolytic-uremic syndrome): clinicopathologic study in 20 adults. *Kidney Int* 15:548-558.
191. Renaud, C., Niaudet, P., Gagnadoux, M.F., Broyer, M., and Habib, R. 1995. Haemolytic uraemic syndrome: prognostic factors in children over 3 years of age. *Pediatr Nephrol* 9:24-29.
192. Habib, R., Mathieu, H., and Royer, P. 1967. [Hemolytic-uremic syndrome of infancy: 27 clinical and anatomic observations]. *Nephron* 4:139-172.
193. Remuzzi, G., and Ruggenti, P. 1995. The hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int* 48:2-19.
194. Jun, J.B., Kuechle, M., Harlan, J.M., and Elkon, K.B. 2003. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 15:756-760.
195. Prescott, R.J., Freemont, A.J., Jones, C.J., Hoyland, J., and Fielding, P. 1992. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *J Pathol* 166:255-263.
196. Sgonc, R., Gruschwitz, M.S., Dietrich, H., Recheis, H., Gershwin, M.E., and Wick, G. 1996. Endothelial cell apoptosis is a primary pathogenetic event underlying skin lesions in avian and human scleroderma. *J Clin Invest* 98:785-792.

197. Fleischmajer, R., and Perlish, J.S. 1980. Capillary alterations in scleroderma. *J Am Acad Dermatol* 2:161-170.
198. Trojanowska, M., and Varga, J. 2007. Molecular pathways as novel therapeutic targets in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 19:568-573.
199. Flavahan, N.A., Flavahan, S., Liu, Q., Wu, S., Tidmore, W., Wiener, C.M., Spence, R.J., and Wigley, F.M. 2000. Increased alpha2-adrenergic constriction of isolated arterioles in diffuse scleroderma. *Arthritis Rheum* 43:1886-1890.
200. Levin, E.R. 1995. Endothelins. *N Engl J Med* 333:356-363.
201. Pearson, J.D. 1991. The endothelium: its role in scleroderma. *Ann Rheum Dis* 50 Suppl 4:866-871.
202. LeRoy, E.C. 1974. Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro: a possible defect in the regulation or activation of the scleroderma fibroblast. *J Clin Invest* 54:880-889.
203. Botstein, G.R., Sherer, G.K., and Leroy, E.C. 1982. Fibroblast selection in scleroderma. An alternative model of fibrosis. *Arthritis Rheum* 25:189-195.
204. Goldring, S.R., Stephenson, M.L., Downie, E., Krane, S.M., and Korn, J.H. 1990. Heterogeneity in hormone responses and patterns of collagen synthesis in cloned dermal fibroblasts. *J Clin Invest* 85:798-803.
205. Korn, J.H., Halushka, P.V., and LeRoy, E.C. 1980. Mononuclear cell modulation of connective tissue function: suppression of fibroblast growth by stimulation of endogenous prostaglandin production. *J Clin Invest* 65:543-554.

206. Jelaska, A., and Korn, J.H. 2000. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 43:2230-2239.
207. Kirk, T.Z., Mark, M.E., Chua, C.C., Chua, B.H., and Mayes, M.D. 1995. Myofibroblasts from scleroderma skin synthesize elevated levels of collagen and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) with two forms of TIMP-1. *J Biol Chem* 270:3423-3428.
208. Korn, J.H. 1989. Immunologic aspects of scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 1:479-484.
209. Mauch, C., and Kreig, T. 1990. Fibroblast-matrix interactions and their role in the pathogenesis of fibrosis. *Rheum Dis Clin North Am* 16:93-107.
210. Pannu, J., and Trojanowska, M. 2004. Recent advances in fibroblast signaling and biology in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 16:739-745.
211. Asano, Y., Ihn, H., Yamane, K., Jinnin, M., Mimura, Y., and Tamaki, K. 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in alpha2(I) collagen gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *J Immunol* 172:7123-7135.
212. Bordron, A., Dueymes, M., Levy, Y., Jamin, C., Leroy, J.P., Piette, J.C., Shoenfeld, Y., and Youinou, P.Y. 1998. The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 101:2029-2035.
213. Worda, M., Sgonc, R., Dietrich, H., Niederegger, H., Sundick, R.S., Gershwin, M.E., and Wick, G. 2003. In vivo analysis of the apoptosis-inducing effect of anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis by the chorionallantoic membrane assay. *Arthritis Rheum* 48:2605-2614.



214. Bashkin, P., Doctrow, S., Klagsbrun, M., Svahn, C.M., Folkman, J., and Vlodavsky, I. 1989. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* 28:1737-1743.
215. Abraham, D.J., and Varga, J. 2005. Scleroderma: from cell and molecular mechanisms to disease models. *Trends Immunol* 26:587-595.
216. Siracusa, L.D., McGrath, R., Ma, Q., Moskow, J.J., Manne, J., Christner, P.J., Buchberg, A.M., and Jimenez, S.A. 1996. A tandem duplication within the fibrillin 1 gene is associated with the mouse tight skin mutation. *Genome Res* 6:300-313.
217. Green, M.C., Sweet, H.O., and Bunker, L.E. 1976. Tight-skin, a new mutation of the mouse causing excessive growth of connective tissue and skeleton. *Am J Pathol* 82:493-512.
218. Varga, J., and Abraham, D. 2007. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 117:557-567.
219. Isogai, Z., Ono, R.N., Ushiro, S., Keene, D.R., Chen, Y., Mazzieri, R., Charbonneau, N.L., Reinhardt, D.P., Rifkin, D.B., and Sakai, L.Y. 2003. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem* 278:2750-2757.
220. Yamamoto, T., Takagawa, S., Katayama, I., Yamazaki, K., Hamazaki, Y., Shinkai, H., and Nishioka, K. 1999. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 112:456-462.

221. Lakos, G., Takagawa, S., Chen, S.J., Ferreira, A.M., Han, G., Masuda, K., Wang, X.J., DiPietro, L.A., and Varga, J. 2004. Targeted disruption of TGF-beta/Smad3 signaling modulates skin fibrosis in a mouse model of scleroderma. *Am J Pathol* 165:203-217.
222. Takagawa, S., Lakos, G., Mori, Y., Yamamoto, T., Nishioka, K., and Varga, J. 2003. Sustained activation of fibroblast transforming growth factor-beta/Smad signaling in a murine model of scleroderma. *J Invest Dermatol* 121:41-50.
223. Ferreira, A.M., Takagawa, S., Fresco, R., Zhu, X., Varga, J., and DiPietro, L.A. 2006. Diminished induction of skin fibrosis in mice with MCP-1 deficiency. *J Invest Dermatol* 126:1900-1908.
224. Nankivell, B.J., Borrows, R.J., Fung, C.L., O'Connell, P.J., Allen, R.D., and Chapman, J.R. 2003. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349:2326-2333.
225. Weis, M., and von Scheidt, W. 1997. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation* 96:2069-2077.
226. Choy, J.C., Cruz, R.P., Kerjner, A., Geisbrecht, J., Sawchuk, T., Fraser, S.A., Hudig, D., Bleackley, R.C., Jirik, F.R., McManus, B.M., et al. 2005. Granzyme B induces endothelial cell apoptosis and contributes to the development of transplant vascular disease. *Am J Transplant* 5:494-499.
227. Choy, J.C., Kerjner, A., Wong, B.W., McManus, B.M., and Granville, D.J. 2004. Perforin mediates endothelial cell death and resultant transplant vascular disease in cardiac allografts. *Am J Pathol* 165:127-133.

228. Dong, C., Wilson, J.E., Winters, G.L., and McManus, B.M. 1996. Human transplant coronary artery disease: pathological evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. *Lab Invest* 74:921-931.
229. Ishii, Y., Sawada, T., Kubota, K., Fuchinoue, S., Teraoka, S., and Shimizu, A. 2005. Injury and progressive loss of peritubular capillaries in the development of chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 67:321-332.
230. Shimizu, A., Yamada, K., Meehan, S.M., Sachs, D.H., and Colvin, R.B. 2000. Acceptance reaction: intragraft events associated with tolerance to renal allografts in miniature swine. *J Am Soc Nephrol* 11:2371-2380.
231. Shimizu, A., Yamada, K., Sachs, D.H., and Colvin, R.B. 2000. Intragraft events preceding chronic renal allograft rejection in a modified tolerance protocol. *Kidney Int* 58:2546-2558.
232. Shimizu, A., Yamada, K., Sachs, D.H., and Colvin, R.B. 2002. Mechanisms of chronic renal allograft rejection. II. Progressive allograft glomerulopathy in miniature swine. *Lab Invest* 82:673-686.
233. Shimizu, A., Yamada, K., Sachs, D.H., and Colvin, R.B. 2002. Persistent rejection of peritubular capillaries and tubules is associated with progressive interstitial fibrosis. *Kidney Int* 61:1867-1879.
234. Lin, Y.S., Lin, C.F., Lei, H.Y., Liu, H.S., Yeh, T.M., Chen, S.H., and Liu, C.C. 2004. Antibody-mediated endothelial cell damage via nitric oxide. *Curr Pharm Des* 10:213-221.
235. Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.

236. Lusic, A.J. 2000. Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241.
237. Scoazec, J.Y., and Lasèche, G. 1993. Immunologie des cellules endothéliales et rejet de greffe. *Médecine Science* 9:1094-1101.
238. Munsch, B., Lizard, G., Gueldry, S., and Gambert, P. 1995. [Agents inducing cell death of the vascular wall]. *Ann Biol Clin (Paris)* 53:473-480.
239. Deschaumes, C., Verneuil, L., Ertault-Daneshpouy, M., Adle-Biassette, H., Galateau, F., Ainoun, F., Micic-Polianski, J., Janin, A., and Ameisen, J.C. 2007. CD95 ligand-dependant endothelial cell death initiates oral mucosa damage in a murine model of acute graft versus host disease. *Lab Invest* 87:417-429.
240. Atkinson, K., Biggs, J., Cooley, M., Farrelly, H., O'Flaherty, E., Raphael, H., Ashby, M., Concannon, A., Dodds, A., Morgan, G., et al. 1987. A comparative study of T-cell depleted and non-depleted marrow transplantation for hematological malignancy. *Aust N Z J Med* 17:16-23.
241. Baker, M.B., Altman, N.H., Podack, E.R., and Levy, R.B. 1996. The role of cell-mediated cytotoxicity in acute GVHD after MHC-matched allogeneic bone marrow transplantation in mice. *J Exp Med* 183:2645-2656.
242. Mitsuyasu, R.T., Champlin, R.E., Gale, R.P., Ho, W.G., Lenarsky, C., Winston, D., Selch, M., Elashoff, R., Giorgi, J.V., Wells, J., et al. 1986. Treatment of donor bone marrow with monoclonal anti-T-cell antibody and complement for the prevention of graft-versus-host disease. A prospective, randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med* 105:20-26.

243. Hausermann, P., Walter, R.B., Halter, J., Biedermann, B.C., Tichelli, A., Itin, P., and Gratwohl, A. 2008. Cutaneous graft-versus-host disease: a guide for the dermatologist. *Dermatology* 216:287-304.
244. Braun, M.Y., Lowin, B., French, L., Acha-Orbea, H., and Tschopp, J. 1996. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J Exp Med* 183:657-661.
245. Janin, A., Deschaumes, C., Daneshpouy, M., Estaquier, J., Micic-Polianski, J., Rajagopalan-Levasseur, P., Akarid, K., Mounier, N., Gluckman, E., Socie, G., et al. 2002. CD95 engagement induces disseminated endothelial cell apoptosis in vivo: immunopathologic implications. *Blood* 99:2940-2947.
246. Piguet, P.F., Grau, G.E., Allet, B., and Vassalli, P. 1987. Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med* 166:1280-1289.
247. Schmaltz, C., Alpdogan, O., Horndasch, K.J., Muriglan, S.J., Kappel, B.J., Teshima, T., Ferrara, J.L., Burakoff, S.J., and van den Brink, M.R. 2001. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood* 97:2886-2895.
248. Murata, H., Janin, A., Leboeuf, C., Soulier, J., Gluckman, E., Meignin, V., and Socie, G. 2007. Donor-derived cells and human graft-versus-host disease of the skin. *Blood* 109:2663-2665.

249. Woywodt, A., Haubitz, M., Buchholz, S., and Hertenstein, B. 2004. Counting the cost: markers of endothelial damage in hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 34:1015-1023.
250. Ertault-Daneshpouy, M., Leboeuf, C., Lemann, M., Bouhidel, F., Ades, L., Gluckman, E., Socie, G., and Janin, A. 2004. Pericapillary hemorrhage as criterion of severe human digestive graft-versus-host disease. *Blood* 103:4681-4684.
251. Biedermann, B.C., Sahner, S., Gregor, M., Tsakiris, D.A., Jeanneret, C., Pober, J.S., and Gratwohl, A. 2002. Endothelial injury mediated by cytotoxic T lymphocytes and loss of microvessels in chronic graft versus host disease. *Lancet* 359:2078-2083.
252. Corvol, P. 1993. L'endothélium, plaque tournante de la vasomotricité et de la trophicité de la paroi artérielle. *Médecine Science* 9:1031-1033.
253. Davies, M.G., and Hagen, P.O. 1993. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg* 218:593-609.
254. Pober, J.S., and Cotran, R.S. 1990. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70:427-451.
255. Hebert, M.J., Gullans, S.R., Mackenzie, H.S., and Brady, H.R. 1998. Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1beta-dependent paracrine loop. *Am J Pathol* 152:523-532.
256. Kallunki, P., and Tryggvason, K. 1992. 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* 116:559-571.

257. Appella, E., Weber, I.T., and Blasi, F. 1988. Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. *FEBS Lett* 231:1-4.

258. Mayer, U., Kohfeldt, E., and Timpl, R. 1998. Structural and genetic analysis of laminin-nidogen interaction. *Ann N Y Acad Sci* 857:130-142.

259. Murdoch, A.D., Dodge, G.R., Cohen, I., Tuan, R.S., and Iozzo, R.V. 1992. Primary structure of the human heparan sulfate proteoglycan from basement membrane (HSPG2/perlecan). A chimeric molecule with multiple domains homologous to the low density lipoprotein receptor, laminin, neural cell adhesion molecules, and epidermal growth factor. *J Biol Chem* 267:8544-8557.

260. Ruoslahti, E. 1988. Structure and biology of proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 4:229-255.

261. Friedrich, M.V., Gohring, W., Morgelin, M., Brancaccio, A., David, G., and Timpl, R. 1999. Structural basis of glycosaminoglycan modification and of heterotypic interactions of perlecan domain V. *J Mol Biol* 294:259-270.

262. Noonan, D.M., Fulle, A., Valente, P., Cai, S., Horigan, E., Sasaki, M., Yamada, Y., and Hassell, J.R. 1991. The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 266:22939-22947.

263. Battaglia, C., Mayer, U., Aumailley, M., and Timpl, R. 1992. Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur J Biochem* 208:359-366.
264. Sasaki, T., Costell, M., Mann, K., and Timpl, R. 1998. Inhibition of glycosaminoglycan modification of perlecan domain I by site-directed mutagenesis changes protease sensitivity and laminin-1 binding activity. *FEBS Lett* 435:169-172.
265. Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G., and Yayon, A. 1994. Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* 79:1005-1013.
266. Groffen, A.J., Buskens, C.A., Tryggvason, K., Veerkamp, J.H., Monnens, L.A., and van den Heuvel, L.P. 1996. Expression and characterization of human perlecan domains I and II synthesized by baculovirus-infected insect cells. *Eur J Biochem* 241:827-834.
267. Gohring, W., Sasaki, T., Heldin, C.H., and Timpl, R. 1998. Mapping of the binding of platelet-derived growth factor to distinct domains of the basement membrane proteins BM-40 and perlecan and distinction from the BM-40 collagen-binding epitope. *Eur J Biochem* 255:60-66.
268. Hopf, M., Gohring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y., and Timpl, R. 1999. Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem* 259:917-925.
269. Brown, J.C., Sasaki, T., Gohring, W., Yamada, Y., and Timpl, R. 1997. The C-terminal domain V of perlecan promotes beta1 integrin-mediated cell adhesion,



binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by glycosaminoglycans. *Eur J Biochem* 250:39-46.

270. Iozzo, R.V., Cohen, I.R., Grassel, S., and Murdoch, A.D. 1994. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J* 302 ( Pt 3):625-639.

271. Timpl, R. 1993. Proteoglycans of basement membranes. *Experientia* 49:417-428.

272. Bix, G., Fu, J., Gonzalez, E.M., Macro, L., Barker, A., Campbell, S., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Kim, J.K., Hook, M., et al. 2004. Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin. *J Cell Biol* 166:97-109.

273. Bradham, D.M., Igarashi, A., Potter, R.L., and Grotendorst, G.R. 1991. Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114:1285-1294.

274. Moussad, E.E., and Brigstock, D.R. 2000. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 71:276-292.

275. Perbal, B. 2004. CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* 363:62-64.

276. Brigstock, D.R. 2003. The CCN family: a new stimulus package. *J Endocrinol* 178:169-175.

277. Takigawa, M. 2003. CTGF/Hcs24 as a multifunctional growth factor for fibroblasts, chondrocytes and vascular endothelial cells. *Drug News Perspect* 16:11-21.
278. Chaqour, B., and Goppelt-Struebe, M. 2006. Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *FEBS J* 273:3639-3649.
279. Brigstock, D.R. 2002. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61). *Angiogenesis* 5:153-165.
280. Cooker, L.A., Peterson, D., Rambow, J., Riser, M.L., Riser, R.E., Najmabadi, F., Brigstock, D., and Riser, B.L. 2007. TNF-alpha, but not IFN-gamma, regulates CCN2 (CTGF), collagen type I, and proliferation in mesangial cells: possible roles in the progression of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F157-165.
281. Kireeva, M.L., Latinkic, B.V., Kolesnikova, T.V., Chen, C.C., Yang, G.P., Abler, A.S., and Lau, L.F. 1997. Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. *Exp Cell Res* 233:63-77.
282. Liang, Y., Li, C., Guzman, V.M., Evinger, A.J., 3rd, Protzman, C.E., Krauss, A.H., and Woodward, D.F. 2003. Comparison of prostaglandin F2alpha, bimatoprost (prostanoid), and butaprost (EP2 agonist) on Cyr61 and connective tissue growth factor gene expression. *J Biol Chem* 278:27267-27277.
283. Pendurthi, U.R., Allen, K.E., Ezban, M., and Rao, L.V. 2000. Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor,

extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J Biol Chem* 275:14632-14641.

284. Rimon, E., Chen, B., Shanks, A.L., Nelson, D.M., and Sadovsky, Y. 2008. Hypoxia in human trophoblasts stimulates the expression and secretion of connective tissue growth factor. *Endocrinology* 149:2952-2958.

285. Dziadzio, M., Usinger, W., Leask, A., Abraham, D., Black, C.M., Denton, C., and Stratton, R. 2005. N-terminal connective tissue growth factor is a marker of the fibrotic phenotype in scleroderma. *QJM* 98:485-492.

286. Chujo, S., Shirasaki, F., Kawara, S., Inagaki, Y., Kinbara, T., Inaoki, M., Takigawa, M., and Takehara, K. 2005. Connective tissue growth factor causes persistent proalpha2(I) collagen gene expression induced by transforming growth factor-beta in a mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 203:447-456.

287. Bonniaud, P., Martin, G., Margetts, P.J., Ask, K., Robertson, J., Gauldie, J., and Kolb, M. 2004. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in "fibrosis-resistant" BALB/c mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:510-516.

288. Leask, A., and Abraham, D.J. 2003. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol* 81:355-363.

289. Bork, P. 1993. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* 327:125-130.

290. Frazier, K., Williams, S., Kothapalli, D., Klapper, H., and Grotendorst, G.R. 1996. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 107:404-411.
291. Kothapalli, D., Frazier, K.S., Welply, A., Segarini, P.R., and Grotendorst, G.R. 1997. Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway. *Cell Growth Differ* 8:61-68.
292. Kim, H.S., Nagalla, S.R., Oh, Y., Wilson, E., Roberts, C.T., Jr., and Rosenfeld, R.G. 1997. Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12981-12986.
293. Adams, J.C., and Tucker, R.P. 2000. The thrombospondin type 1 repeat (TSR) superfamily: diverse proteins with related roles in neuronal development. *Dev Dyn* 218:280-299.
294. Inoki, I., Shiomi, T., Hashimoto, G., Enomoto, H., Nakamura, H., Makino, K., Ikeda, E., Takata, S., Kobayashi, K., and Okada, Y. 2002. Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J* 16:219-221.
295. Pearce, J.J., Penny, G., and Rossant, J. 1999. A mouse cerberus/Dan-related gene family. *Dev Biol* 209:98-110.
296. Grotendorst, G.R., and Duncan, M.R. 2005. Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* 19:729-738.

297. Heng, E.C., Huang, Y., Black, S.A., Jr., and Trackman, P.C. 2006. CCN2, connective tissue growth factor, stimulates collagen deposition by gingival fibroblasts via module 3 and alpha6- and beta1 integrins. *J Cell Biochem* 98:409-420.
298. Nishida, T., Kawaki, H., Baxter, R.M., Deyoung, R.A., Takigawa, M., and Lyons, K.M. 2007. CCN2 (Connective Tissue Growth Factor) is essential for extracellular matrix production and integrin signaling in chondrocytes. *J Cell Commun Signal* 1:45-58.
299. Segarini, P.R., Nesbitt, J.E., Li, D., Hays, L.G., Yates, J.R., 3rd, and Carmichael, D.F. 2001. The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *J Biol Chem* 276:40659-40667.
300. Gabbiani, G. 2003. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200:500-503.
301. Keely, P.J., Fong, A.M., Zutter, M.M., and Santoro, S.A. 1995. Alteration of collagen-dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. *J Cell Sci* 108 ( Pt 2):595-607.
302. Prasad, N., Topping, R.S., and Decker, S.J. 2002. Src family tyrosine kinases regulate adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of 5'-inositol phosphatase SHIP2 during cell attachment and spreading on collagen I. *J Cell Sci* 115:3807-3815.
303. Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M., and Barbarisi, A. 2004. From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 199:174-180.

304. Bosman, F., and Stamenkovic, I. 2003. Preface to extracellular matrix and disease. *Journal of Pathology* 200:421-422.
305. Bosman, F.T., and Stamenkovic, I. 2003. Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* 200:423-428.
306. Hulmes, D.J. 1992. The collagen superfamily--diverse structures and assemblies. *Essays Biochem* 27:49-67.
307. Hulmes, D.J. 2002. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. *J Struct Biol* 137:2-10.
308. Kadler, K.E., Holmes, D.F., Trotter, J.A., and Chapman, J.A. 1996. Collagen fibril formation. *Biochem J* 316 ( Pt 1):1-11.
309. Ottani, V., Raspanti, M., and Ruggeri, A. 2001. Collagen structure and functional implications. *Micron* 32:251-260.
310. Woessner, J., and Nagase, H. 2000. Matrix metalloproteinases and TIMPs.
311. Greenwald, R., Zucker, S., and Golub, L. 1999. Inhibition of matrix metalloproteinases: Therapeutic applications.
312. Egeblad, M., and Werb, Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2:161-174.
313. McCawley, L.J., and Matrisian, L.M. 2001. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! *Curr Opin Cell Biol* 13:534-540.
314. Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491-21494.
315. Sternlicht, M.D., and Werb, Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516.

316. Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M.D., and Okada, Y. 1997. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J* 322 ( Pt 3):809-814.
317. Whitelock, J.M., Murdoch, A.D., Iozzo, R.V., and Underwood, P.A. 1996. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem* 271:10079-10086.
318. Yu, Q., and Stamenkovic, I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev* 14:163-176.
319. ten Dijke, P., and Arthur, H.M. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:857-869.
320. Dubois, C.M., Laprise, M.H., Blanchette, F., Gentry, L.E., and Leduc, R. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270:10618-10624.
321. Beck, S., Le Good, J.A., Guzman, M., Ben Haim, N., Roy, K., Beermann, F., and Constam, D.B. 2002. Extraembryonic proteases regulate Nodal signalling during gastrulation. *Nat Cell Biol* 4:981-985.
322. Annes, J.P., Munger, J.S., and Rifkin, D.B. 2003. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 116:217-224.
323. Kanzaki, T., Olofsson, A., Moren, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Miyazono, K., Claesson-Welsh, L., and Heldin, C.H. 1990. TGF-beta 1 binding

protein: a component of the large latent complex of TGF-beta 1 with multiple repeat sequences. *Cell* 61:1051-1061.

324. Saharinen, J., Taipale, J., and Keski-Oja, J. 1996. Association of the small latent transforming growth factor-beta with an eight cysteine repeat of its binding protein LTBP-1. *EMBO J* 15:245-253.

325. Nunes, I., Gleizes, P.E., Metz, C.N., and Rifkin, D.B. 1997. Latent transforming growth factor-beta binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 136:1151-1163.

326. Rifkin, D.B. 2005. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem* 280:7409-7412.

327. Hynes, R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.

328. Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., and van der Geer, P. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372:786-791.

329. Stoker, A.W., Streuli, C.H., Martins-Green, M., and Bissell, M.J. 1990. Designer microenvironments for the analysis of cell and tissue function. *Curr Opin Cell Biol* 2:864-874.

330. Miranti, C.K., and Brugge, J.S. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat Cell Biol* 4:E83-90.

331. Giancotti, F.G. 2003. A structural view of integrin activation and signaling. *Dev Cell* 4:149-151.



332. Wiesner, S., Legate, K.R., and Fassler, R. 2005. Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci* 62:1081-1099.
333. Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. 1998. Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11211-11216.
334. Hannigan, G.E., Leung-Hagesteijn, C., Fitz-Gibbon, L., Coppolino, M.G., Radeva, G., Filmus, J., Bell, J.C., and Dedhar, S. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature* 379:91-96.
335. Wary, K.K., Mainiero, F., Isakoff, S.J., Marcantonio, E.E., and Giancotti, F.G. 1996. The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 87:733-743.
336. Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C., and Giancotti, F.G. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94:625-634.
337. Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.
338. Stupack, D.G., and Cheresch, D.A. 2004. A Bit-role for integrins in apoptosis. *Nat Cell Biol* 6:388-389.
339. Stupack, D.G., Puente, X.S., Boutsaboualoy, S., Storgard, C.M., and Cheresch, D.A. 2001. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *J Cell Biol* 155:459-470.

340. Cornillon, J., Campos, L., and Guyotat, D. 2003. [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med Sci (Paris)* 19:743-752.
341. Schaller, M.D., Borgman, C.A., Cobb, B.S., Vines, R.R., Reynolds, A.B., and Parsons, J.T. 1992. pp125FAK a structurally distinctive protein-tyrosine kinase associated with focal adhesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5192-5196.
342. Chen, H.C., Appeddu, P.A., Parsons, J.T., Hildebrand, J.D., Schaller, M.D., and Guan, J.L. 1995. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem* 270:16995-16999.
343. Schaller, M.D. 2001. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta* 1540:1-21.
344. Shen, Y., and Schaller, M.D. 1999. Focal adhesion targeting: the critical determinant of FAK regulation and substrate phosphorylation. *Mol Biol Cell* 10:2507-2518.
345. Kume, A., Nishiura, H., Suda, J., and Suda, T. 1997. Focal adhesion kinase upregulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not by interleukin-3 in differentiating myeloid cells. *Blood* 89:3434-3442.
346. Manes, S., Mira, E., Gomez-Mouton, C., Zhao, Z.J., Lacalle, R.A., and Martinez, A.C. 1999. Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility. *Mol Cell Biol* 19:3125-3135.
347. Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.W., Vines, R.R., and Parsons, J.T. 1994. Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol* 14:1680-1688.

348. Sieg, D.J., Hauck, C.R., Ilic, D., Klingbeil, C.K., Schaefer, E., Damsky, C.H., and Schlaepfer, D.D. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol* 2:249-256.
349. Calalb, M.B., Polte, T.R., and Hanks, S.K. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol* 15:954-963.
350. Eide, B.L., Turck, C.W., and Escobedo, J.A. 1995. Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60src association in the focal adhesion kinase, pp125FAK. *Mol Cell Biol* 15:2819-2827.
351. Reiske, H.R., Kao, S.C., Cary, L.A., Guan, J.L., Lai, J.F., and Chen, H.C. 1999. Requirement of phosphatidylinositol 3-kinase in focal adhesion kinase-promoted cell migration. *J Biol Chem* 274:12361-12366.
352. Zheng, C., Xing, Z., Bian, Z.C., Guo, C., Akbay, A., Warner, L., and Guan, J.L. 1998. Differential regulation of Pyk2 and focal adhesion kinase (FAK). The C-terminal domain of FAK confers response to cell adhesion. *J Biol Chem* 273:2384-2389.
353. Rocic, P., Govindarajan, G., Sabri, A., and Lucchesi, P.A. 2001. A role for PYK2 in regulation of ERK1/2 MAP kinases and PI 3-kinase by ANG II in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C90-99.
354. Sanjay, A., Houghton, A., Neff, L., DiDomenico, E., Bardelay, C., Antoine, E., Levy, J., Gailit, J., Bowtell, D., Horne, W.C., et al. 2001. Cbl associates with Pyk2 and Src to regulate Src kinase activity, alpha(v)beta(3) integrin-mediated signaling, cell adhesion, and osteoclast motility. *J Cell Biol* 152:181-195.

355. Avraham, S., London, R., Fu, Y., Ota, S., Hiregowdara, D., Li, J., Jiang, S., Pasztor, L.M., White, R.A., Grooman, J.E., et al. 1995. Identification and characterization of a novel related adhesion focal tyrosine kinase (RAFTK) from megakaryocytes and brain. *J Biol Chem* 270:27742-27751.
356. Lev, S., Moreno, H., Martinez, R., Canoll, P., Peles, E., Musacchio, J.M., Plowman, G.D., Rudy, B., and Schlessinger, J. 1995. Protein tyrosine kinase PYK2 involved in Ca(2+)-induced regulation of ion channel and MAP kinase functions. *Nature* 376:737-745.
357. Sasaki, H., Nagura, K., Ishino, M., Tobioka, H., Kotani, K., and Sasaki, T. 1995. Cloning and characterization of cell adhesion kinase beta, a novel protein-tyrosine kinase of the focal adhesion kinase subfamily. *J Biol Chem* 270:21206-21219.
358. Angelucci, A., and Bologna, M. 2007. Targeting vascular cell migration as a strategy for blocking angiogenesis: the central role of focal adhesion protein tyrosine kinase family. *Curr Pharm Des* 13:2129-2145.
359. Orr, A.W., and Murphy-Ullrich, J.E. 2004. Regulation of endothelial cell function BY FAK and PYK2. *Front Biosci* 9:1254-1266.
360. Berk, B.C. 1999. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: pathways activated by specific tyrosine kinases. *J Am Soc Nephrol* 10 Suppl 11:S62-68.
361. Mukhopadhyay, D., Nagy, J.A., Manseau, E.J., and Dvorak, H.F. 1998. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated signaling in mouse mesentery vascular endothelium. *Cancer Res* 58:1278-1284.

362. Sieg, D.J., Ilic, D., Jones, K.C., Damsky, C.H., Hunter, T., and Schlaepfer, D.D. 1998. Pyk2 and Src-family protein-tyrosine kinases compensate for the loss of FAK in fibronectin-stimulated signaling events but Pyk2 does not fully function to enhance FAK- cell migration. *EMBO J* 17:5933-5947.
363. Andreev, J., Simon, J.P., Sabatini, D.D., Kam, J., Plowman, G., Randazzo, P.A., and Schlessinger, J. 1999. Identification of a new Pyk2 target protein with Arf-GAP activity. *Mol Cell Biol* 19:2338-2350.
364. Lowell, C.A. 2004. Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling. *Mol Immunol* 41:631-643.
365. Korade-Mirnic, Z., and Corey, S.J. 2000. Src kinase-mediated signaling in leukocytes. *J Leukoc Biol* 68:603-613.
366. Modafferi, E.F., and Black, D.L. 1999. Combinatorial control of a neuron-specific exon. *RNA* 5:687-706.
367. Harder, K.W., Moller, N.P., Peacock, J.W., and Jirik, F.R. 1998. Protein-tyrosine phosphatase alpha regulates Src family kinases and alters cell-substratum adhesion. *J Biol Chem* 273:31890-31900.
368. Xing, J., Zhang, Z., Mao, H., Schnellmann, R.G., and Zhuang, S. 2008. Src regulates cell cycle protein expression and renal epithelial cell proliferation via PI3K/Akt signaling-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F145-152.
369. Loza-Coll, M.A., Perera, S., Shi, W., and Filmus, J. 2005. A transient increase in the activity of Src-family kinases induced by cell detachment delays anoikis of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 24:1727-1737.

370. Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67:481-507.
371. Martin, T.F. 1998. Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:231-264.
372. Cantley, L.C. 2002. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296:1655-1657.
373. Lawlor, M.A., and Alessi, D.R. 2001. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 114:2903-2910.
374. Brazil, D.P., and Hemmings, B.A. 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26:657-664.
375. Laplante, P., Raymond, M.A., Gagnon, G., Vigneault, N., Sasseville, A.M., Langelier, Y., Bernard, M., Raymond, Y., and Hebert, M.J. 2005. Novel fibrogenic pathways are activated in response to endothelial apoptosis: implications in the pathophysiology of systemic sclerosis. *J Immunol* 174:5740-5749.
376. Ricupero, D.A., Poliks, C.F., Rishikof, D.C., Cuttle, K.A., Kuang, P.P., and Goldstein, R.H. 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stabilization of alpha1(I) collagen mRNA in human lung fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C99-C105.
377. Maehama, T., and Dixon, J.E. 1999. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* 9:125-128.
378. Frisch, S.M., and Ruoslahti, E. 1997. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 9:701-706.

379. Frisch, S.M., and Screaton, R.A. 2001. Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 13:555-562.
380. Liao, Y.F., Gotwals, P.J., Koteliansky, V.E., Sheppard, D., and Van De Water, L. 2002. The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins alpha 9beta 1 and alpha 4beta 1 providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *J Biol Chem* 277:14467-14474.
381. Wen, L.P., Fahrni, J.A., Troie, S., Guan, J.L., Orth, K., and Rosen, G.D. 1997. Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* 272:26056-26061.
382. Frisch, S.M., Vuori, K., Ruoslahti, E., and Chan-Hui, P.Y. 1996. Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 134:793-799.
383. Khwaja, A., Rodriguez-Viciana, P., Wennstrom, S., Warne, P.H., and Downward, J. 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *Embo J* 16:2783-2793.
384. Matter, M.L., and Ruoslahti, E. 2001. A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta3 integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem* 276:27757-27763.
385. Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. 1998. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282:1318-1321.

386. del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278:687-689.
387. Korsmeyer, S.J. 1999. BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* 59:1693s-1700s.
388. Raina, D., Kharbanda, S., and Kufe, D. 2004. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem* 279:20607-20612.
389. Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H.G., Irie, S., Fong, L., and Reed, J.C. 1994. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* 54:5501-5507.
390. Chen, H.C., Appeddu, P.A., Isoda, H., and Guan, J.L. 1996. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 271:26329-26334.
391. Desmouliere, A., Chaponnier, C., and Gabbiani, G. 2005. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair Regen* 13:7-12.
392. Hinz, B. 2007. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127:526-537.
393. Azouz, A., Razzaque, M.S., El-Hallak, M., and Taguchi, T. 2004. Immunoinflammatory responses and fibrogenesis. *Med Electron Microsc* 37:141-148.
394. Krzesicki, R.F., Fleming, W.E., Winterrowd, G.E., Hatfield, C.A., Sanders, M.E., and Chin, J.E. 1991. T lymphocyte adhesion to human synovial fibroblasts.



Role of cytokines and the interaction between intercellular adhesion molecule 1 and CD11a/CD18. *Arthritis Rheum* 34:1245-1253.

395. Panayi, G.S., Lanchbury, J.S., and Kingsley, G.H. 1992. The importance of the T cell in initiating and maintaining the chronic synovitis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 35:729-735.

396. Bombara, M.P., Webb, D.L., Conrad, P., Marlor, C.W., Sarr, T., Ranges, G.E., Aune, T.M., Greve, J.M., and Blue, M.L. 1993. Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. *J Leukoc Biol* 54:399-406.

397. Burger, D., Rezzonico, R., Li, J.M., Modoux, C., Pierce, R.A., Welgus, H.G., and Dayer, J.M. 1998. Imbalance between interstitial collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in synoviocytes and fibroblasts upon direct contact with stimulated T lymphocytes: involvement of membrane-associated cytokines. *Arthritis Rheum* 41:1748-1759.

398. Fattman, C.L. 2008. Apoptosis in pulmonary fibrosis: too much or not enough? *Antioxid Redox Signal* 10:379-385.

399. Schachna, L., and Wigley, F.M. 2002. Targeting mediators of vascular injury in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol* 14:686-693.

400. Dallas, S.L., Miyazono, K., Skerry, T.M., Mundy, G.R., and Bonewald, L.F. 1995. Dual role for the latent transforming growth factor-beta binding protein in storage of latent TGF-beta in the extracellular matrix and as a structural matrix protein. *J Cell Biol* 131:539-549.

401. Mongiat, M., Sweeney, S.M., San Antonio, J.D., Fu, J., and Iozzo, R.V. 2003. Endorepellin, a novel inhibitor of angiogenesis derived from the C terminus of perlecan. *J Biol Chem* 278:4238-4249.
402. Raymond, M.A., Desormeaux, A., Laplante, P., Vigneault, N., Filep, J.G., Landry, K., Pshezhetsky, A.V., and Hebert, M.J. 2004. Apoptosis of endothelial cells triggers a caspase-dependent anti-apoptotic paracrine loop active on VSMC. *Faseb J* 18:705-707.
403. Vozenin-Brotons, M.C., and Mauviel, A. 2006. [How to model the events in cutaneous fibrosis?]. *Med Sci (Paris)* 22:172-177.
404. D'Cruz, D. 2000. Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors. *Toxicol Lett* 112-113:421-432.
405. Mailloux, A., Grenet, K., Bruneel, A., Beneteau-Burnat, B., Vaubourdolle, M., and Baudin, B. 2001. Anticancer drugs induce necrosis of human endothelial cells involving both oncosis and apoptosis. *Eur J Cell Biol* 80:442-449.
406. Yamamoto, T., and Nishioka, K. 2004. Possible role of apoptosis in the pathogenesis of bleomycin-induced scleroderma. *J Invest Dermatol* 122:44-50.
407. Sun, J.F., Phung, T., Shiojima, I., Felske, T., Upalakalin, J.N., Feng, D., Kornaga, T., Dor, T., Dvorak, A.M., Walsh, K., et al. 2005. Microvascular patterning is controlled by fine-tuning the Akt signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:128-133.
408. Mukai, Y., Rikitake, Y., Shiojima, I., Wolfrum, S., Satoh, M., Takeshita, K., Hiroi, Y., Salomone, S., Kim, H.H., Benjamin, L.E., et al. 2006. Decreased vascular lesion formation in mice with inducible endothelial-specific expression of protein kinase Akt. *J Clin Invest* 116:334-343.

409. Cailhier, J.F., Partolina, M., Vuthoori, S., Wu, S., Ko, K., Watson, S., Savill, J., Hughes, J., and Lang, R.A. 2005. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *J Immunol* 174:2336-2342.
410. Cailhier, J.F., Sirois, I., Laplante, P., Lepage, S., Raymond, M.A., Brassard, N., Prat, A., Iozzo, R.V., Pshezhetsky, A.V., and Hebert, M.J. 2008. Caspase-3 activation triggers extra-cellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *J Biol Chem*.
411. Laplante, P., Raymond, M.A., Labelle, A., Abe, J., Iozzo, R.V., and Hebert, M.J. 2006. Perlecan proteolysis induces an alpha2beta1 integrin- and Src family kinase-dependent anti-apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation. *J Biol Chem* 281:30383-30392.
412. Le Bas-Bernardet, S., Hourmant, M., Coupel, S., Bignon, J.D., Soullillou, J.P., and Charreau, B. 2003. Non-HLA-type endothelial cell reactive alloantibodies in pre-transplant sera of kidney recipients trigger apoptosis. *Am J Transplant* 3:167-177.
413. Leehey, D.J., Song, R.H., Alavi, N., and Singh, A.K. 1995. Decreased degradative enzymes in mesangial cells cultured in high glucose media. *Diabetes* 44:929-935.
414. Ling, H., Ardjomand, P., Samvakas, S., Simm, A., Busch, G.L., Lang, F., Sebekova, K., and Heidland, A. 1998. Mesangial cell hypertrophy induced by NH<sub>4</sub>Cl: role of depressed activities of cathepsins due to elevated lysosomal pH. *Kidney Int* 53:1706-1712.

415. Taylor, N.G., and Shuff, R.Y. 1994. I-Cell disease: an unusual cause of gingival enlargement. *Br Dent J* 176:106-108.
416. Strutz, F., and Neilson, E.G. 2003. New insights into mechanisms of fibrosis in immune renal injury. *Springer Semin Immunopathol* 24:459-476.
417. Hardie, W.D., Davidson, C., Ikegami, M., Leikauf, G.D., Le Cras, T.D., Prestridge, A., Whitsett, J.A., and Korfhagen, T.R. 2008. EGF receptor tyrosine kinase inhibitors diminish transforming growth factor-alpha-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L1217-1225.
418. Madtes, D.K., Busby, H.K., Strandjord, T.P., and Clark, J.G. 1994. Expression of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor is increased following bleomycin-induced lung injury in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:540-551.
419. Ishii, Y., Fujimoto, S., and Fukuda, T. 2006. Gefitinib prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 174:550-556.
420. Suzuki, H., Aoshiba, K., Yokohori, N., and Nagai, A. 2003. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition augments a murine model of pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 63:5054-5059.
421. Gabbiani, G. 1998. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res* 38:545-548.
422. Bakin, A.V., Tomlinson, A.K., Bhowmick, N.A., Moses, H.L., and Arteaga, C.L. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* 275:36803-36810.

423. Kim, G., Jun, J.B., and Elkon, K.B. 2002. Necessary role of phosphatidylinositol 3-kinase in transforming growth factor beta-mediated activation of Akt in normal and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46:1504-1511.
424. Kaviratne, M., Hesse, M., Leusink, M., Cheever, A.W., Davies, S.J., McKerrow, J.H., Wakefield, L.M., Letterio, J.J., and Wynn, T.A. 2004. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol* 173:4020-4029.
425. Otte, J.M., Rosenberg, I.M., and Podolsky, D.K. 2003. Intestinal myofibroblasts in innate immune responses of the intestine. *Gastroenterology* 124:1866-1878.
426. Watelet, J.B., Demetter, P., Claeys, C., Cauwenberge, P., Cuvelier, C., and Bachert, C. 2006. Wound healing after paranasal sinus surgery: neutrophilic inflammation influences the outcome. *Histopathology* 48:174-181.
427. Chen, Y., Segarini, P., Raoufi, F., Bradham, D., and Leask, A. 2001. Connective tissue growth factor is secreted through the Golgi and is degraded in the endosome. *Exp Cell Res* 271:109-117.
428. Babic, A.M., Chen, C.C., and Lau, L.F. 1999. Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol* 19:2958-2966.
429. Jedsadayanmata, A., Chen, C.C., Kireeva, M.L., Lau, L.F., and Lam, S.C. 1999. Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse

connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *J Biol Chem* 274:24321-24327.

430. Chen, C.C., Chen, N., and Lau, L.F. 2001. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 276:10443-10452.

431. Mimura, Y., Ihn, H., Jinnin, M., Asano, Y., Yamane, K., and Tamaki, K. 2005. Constitutive phosphorylation of focal adhesion kinase is involved in the myofibroblast differentiation of scleroderma fibroblasts. *J Invest Dermatol* 124:886-892.

432. Zhan, M., Zhao, H., and Han, Z.C. 2004. Signalling mechanisms of anoikis. *Histol Histopathol* 19:973-983.

433. Weis, S.M., Lim, S.T., Lutu-Fuga, K.M., Barnes, L.A., Chen, X.L., Gothert, J.R., Shen, T.L., Guan, J.L., Schlaepfer, D.D., and Cheresh, D.A. 2008. Compensatory role for Pyk2 during angiogenesis in adult mice lacking endothelial cell FAK. *J Cell Biol* 181:43-50.

434. Lim, Y., Lim, S.T., Tomar, A., Gardel, M., Bernard-Trifilo, J.A., Chen, X.L., Uryu, S.A., Canete-Soler, R., Zhai, J., Lin, H., et al. 2008. PyK2 and FAK connections to p190Rho guanine nucleotide exchange factor regulate RhoA activity, focal adhesion formation, and cell motility. *J Cell Biol* 180:187-203.

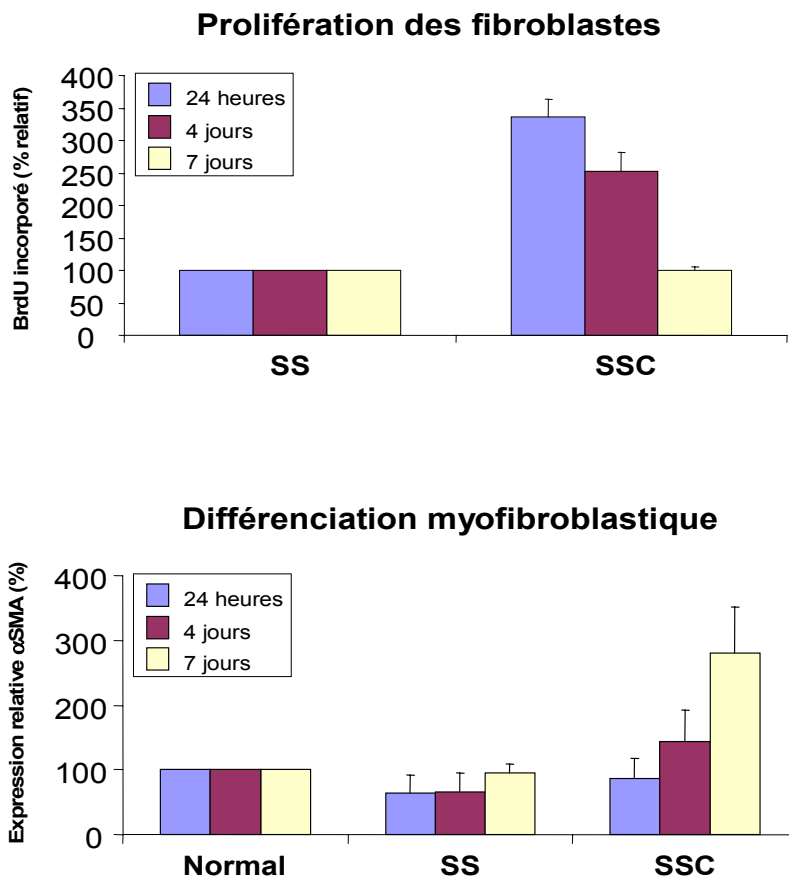
435. Kuo, M.L., and Yang, N.C. 1995. Reversion of v-H-ras-transformed NIH 3T3 cells by apigenin through inhibiting mitogen activated protein kinase and its downstream oncogenes. *Biochem Biophys Res Commun* 212:767-775.

436. Sappino, A.P., Schurch, W., and Gabbiani, G. 1990. Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* 63:144-161.
437. Raymond, M.A., Vigneault, N., Luyckx, V., and Hebert, M.J. 2002. Paracrine repercussions of preconditioning on angiogenesis and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 291:261-269.

## **7. ANNEXE**



## ANNEXE 1



Annexe 1. Prolifération des fibroblastes et différenciation myofibroblastique. Les fibroblastes ont été exposés aux milieux normal, sans-sérum (SS) et sans-sérum conditionné par des CE apoptotiques (SSC) sur une période de 7 jours afin d'évaluer l'incorporation de BrdU (prolifération) et les niveaux protéiques d' $\alpha$ SMA (différenciation). Au fil du temps, la prolifération des fibroblastes laisse place à la différenciation myofibroblastique.