



HAL
open science

Analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en oeuvre dans les vaisseaux sanguins par les composants des fibres élastiques

Zeinab Ghandour

► **To cite this version:**

Zeinab Ghandour. Analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en oeuvre dans les vaisseaux sanguins par les composants des fibres élastiques. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV013 . tel-00949211

HAL Id: tel-00949211

<https://theses.hal.science/tel-00949211>

Submitted on 19 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Physiologie Physiopathologies Pharmacologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Zeinab GHANDOUR

Thèse dirigée par le **Pr. Gilles FAURY**

préparée au sein des **Laboratoires**
-Physiopathologies Vasculaires : Interactions cellulaires,
signalisation et vieillissement (INSERM-U882)

- Hypoxie : Physiopathologie Cardiovasculaire et Respiratoire - HP2
(INSERM U1042)

dans **l'École Doctorale Chimie et Sciences du vivant**

Analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires mis en oeuvre dans les vaisseaux sanguins par les composants des fibres élastiques.

Thèse soutenue publiquement le **20 mars 2013**,
devant le jury composé de :

Pr. Christophe RIBUOT

Université Joseph Fourier - Grenoble 1, Président

Pr. Laurent DEBELLE

Université de Reims Champagne Ardennes, Rapporteur

Dr. Marie-Paule JACOB

INSERM U 698, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Rapporteur

Pr. Gilles FAURY,

Université Joseph Fourier - Grenoble 1, Membre



Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du Jury de ma thèse : Laurent DEBELLE, Marie-Paule JACOB, Christophe RIBUOT et Gilles FAURY.

Je remercie Gilles FAURY d'avoir accepté de m'encadrer, pour la qualité de ses conseils scientifiques et moraux, pour le soutien et pour l'aide qu'il m'a offert aux différents moments de ma thèse, même les plus difficiles.

Merci à Philippe HUBER de m'avoir accueilli dans son laboratoire LAPV, d'avoir mis à ma disposition les moyens pour accomplir mon travail de thèse, pour ses conseils scientifiques et l'aide qu'il m'a apportée même après avoir changé de laboratoire.

Merci également à Patrick LEVY, Christophe RIBUOT, et Diane GODIN-RIBUOT pour l'accueil et l'aide qu'ils nous ont offerts après avoir déménagé dans leur laboratoire HP2.

Un Grand Merci à tous les membres des 2 laboratoires LAPV et HP2, pour leur sympathie, leur soutien moral, leurs conseils, et leur aide précieuse de tous les jours, ainsi que pour les bons moments passés ensemble et qui m'ont permis de pouvoir accomplir pleinement mon travail de thèse. En particulier, je remercie Adeline, Mariella, Adama, Isabelle, Stéphanie, Abbass, Sandrine, Marie, Emeline et Anne pour leur soutien scientifique et leur aide technique.

Je tiens à remercier aussi Christine, François et Audrey pour leur patience dans les démarches administratives et pour leur aide. Merci aussi aux différents animaliers pour leur disponibilité.

Particulièrement, j'adresse mes remerciements aux membres de notre petite équipe. Merci à Boubacar et Marion pour m'avoir transmis, même à distance, leur savoir-faire. Merci à Wassim pour les conseils scientifiques, le soutien et les bons moments partagés. Merci à Justine et Marjorie ainsi qu'à Eric de m'avoir guidée à certains moments de ma thèse.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de différentes équipes de recherche au CEA et au bâtiment Jean Roget, je tiens à remercier tous ceux qui y ont contribué.

Je remercie l'Université LIBANAISE, pour la bonne formation qu'elle m'avait offerte pendant mes premières années universitaires, ainsi que pour mon financement de thèse.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée pour mes amies, Hawraa, Wafaa, Hanane, Fatima, Manar, Zeinab, Roukaya, Abir, Doha, ainsi que les différents membres de notre « équipe » libanaise à Grenoble, mes vifs remerciements pour vous toutes, je vous suis profondément reconnaissante pour avoir su m'écouter et me redonner de l'énergie dans les moments les plus critiques de mon séjour à Grenoble.

Je ne peux oublier de remercier ma soeur SOUKAYNA, avec qui j'avais passé les meilleurs moments depuis que j'avais l'âge de un an jusqu'à maintenant, et qui n'a cessé d'être à mes côtés, même quand elle était très occupée. Merci pour ton

soutien, tes conseils et tes cadeaux, et pour le bon séjour passé ensemble à Grenoble. J'ai du mal à arriver à ce moment où on doit se séparer physiquement.

Pour mes frères Mouhamad Housein et Abbass, pour mes soeurs Hiba, Amina, Soumaya et Batoul, vous avez été toujours là, vous m'avez offert le soutien le plus remarquable, j'espère pouvoir vous le rendre un jour. Je pense à mes nièces et neveux, en particulier Fatima, Mariam, Nour et Zeinab : soyez protégées et guidées vers la droite ligne et ayez le meilleur destin dans la vie.

Je ne peux terminer sans remercier mes deux parents, pour qui les mots ne sauraient pas exprimer et expliquer le grand merci que je vous dois, et à qui je dédie ce travail.

*À ceux qui m'ont incitée à suivre les chemins de la connaissance
À Papa, À Maman,
À la mémoire de notre père miséricordieux...*

Table des matières

1. Introduction Bibliographique.....	8
1.1. Le système vasculaire- Les artères.....	9
1.1.1. Système cardio-vasculaire et évolution des espèces.....	9
1.1.2. Le cœur.....	9
1.1.3. Les vaisseaux sanguins : structure générale.....	10
1.1.3.1. Intima.....	10
1.1.3.2. Média.....	11
1.1.3.3. Adventice.....	11
1.1.4. Les différents vaisseaux sanguins des mammifères.....	12
1.1.5. Les artères :.....	14
1.1.5.1. Structure des artères :.....	15
1.1.5.2. Fonction principale des artères- Rôle mécanique.....	15
1.1.5.3. Relation structure fonction des composants artériels.....	15
1.2. Les composants vasculaires.....	17
1.2.1. Les cellules vasculaires.....	17
1.2.1.1. Cellules endothéliales.....	17
1.2.1.1.1. Histologie.....	17
1.2.1.1.2. Rôles.....	17
(a) Régir les échanges sang-tissu : perméabilité vasculaire.....	18
(b) Rôle dans l'angiogenèse.....	19
(c) Rôle dans l'hémostase.....	19
(d) La synthèse de molécules vasoactives.....	20
i. Le NO.....	20
ii. La prostacycline:.....	21
iii. L'EDHF.....	21
iv. Les endothélines.....	21
1.2.1.2. Cellules musculaires lisses vasculaires.....	22
1.2.1.2.1. Histologie.....	22
1.2.1.2.2. Rôles des CMLV.....	23
(a) Phénotype contractile :.....	23
(b) Phénotypes prolifératif et sécrétoire.....	24
1.2.1.3. Les fibroblastes.....	25
1.2.2. La matrice extracellulaire.....	26
1.2.2.1. Les fibres élastiques.....	26
1.2.2.1.1. L'élastine.....	27

(a)	Gène et structure de la tropoélastine	28
(b)	Synthèse et sécrétion de la tropoélastine	29
1.2.2.1.2.	Les microfibrilles	31
(a)	Les fibrillines :	31
(b)	Les autres composants des microfibrilles	32
1.2.2.1.3.	Formation des fibres élastiques.....	34
1.2.2.2.	Les autres composants de la matrice extracellulaire.....	36
1.2.2.2.1.	Le collagène	36
1.2.2.2.2.	Les glycoprotéines.....	37
1.2.2.2.3.	Les protéoglycanes.....	38
1.2.2.3.	Dégradation de la matrice extracellulaire	39
1.2.2.3.1.	Les sérine-protéases.....	40
1.2.2.3.2.	Les cystéine-protéases.....	40
1.2.2.3.3.	Les métallo-protéinases :	40
1.2.2.3.4.	Les inhibiteurs tissulaires des MMPs : les TIMPs	42
1.3.	Régulation de la fonction vasculaire : les interactions cellules-matrice dans les vaisseaux sanguins.....	44
1.3.1.	Rôle de cette interaction.....	44
1.3.1.1.	Influence de la cellule sur la matrice	44
1.3.1.2.	Influence de la matrice sur la cellule	44
1.3.1.2.1.	Rôle dans le maintien d'un état différencié des cellules	45
1.3.1.2.2.	Rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire	45
1.3.1.2.3.	Rôle dans la migration cellulaire	45
1.3.1.2.4.	Rôle de filtre.....	46
1.3.2.	Formation de l'interaction : liaison ligand-récepteur	47
1.3.2.1.	La famille des Intégrines.....	47
1.3.2.2.	Les interactions fibres élastiques-cellules : rôle biologiques des fibres élastiques....	50
1.3.2.2.1.	Rôle biologique des microfibrilles	50
(a)	Les récepteurs des microfibrilles.....	50
(b)	Biologie de cette interaction	50
1.3.2.2.2.	Rôle biologique de l'élastine.....	51
(a)	Récepteurs de l'élastine	51
i.	Le complexe récepteur de l'élastine.....	51
ii.	L'intégrine $\alpha_v\beta_3$	52
iii.	La galectine-3	53
(b)	Biologie de l'interaction élastine-cellules.....	53

1.3.3.	Transduction du signal dans les vaisseaux sanguins.....	56
1.3.3.1.	Signalisation médiée par les intégrines.....	56
1.3.3.2.	La voie de signalisation calcique	57
1.3.3.2.1.	Les canaux calciques membranaires	58
1.3.3.2.2.	Les canaux calciques du réticulum endoplasmique	59
1.3.3.2.3.	Les canaux calciques mitochondriaux.....	60
1.3.3.3.	Les acteurs cytoplasmiques - rôle du phosphatidyl-inositol biphosphate	61
1.3.3.4.	Les effecteurs du complexe focal adhesion kinase (FAK)	62
1.3.3.5.	La voie des Mitogen activated protein kinase (MAPK)	62
1.3.3.6.	Les Rho GTPases	64
1.4.	Remodelage vasculaire	65
1.4.1.	Vieillessement naturel : artériosclérose	65
1.4.1.1.	Modifications physiologiques : artériosclérose, hypertension systolique élevée et ischémie	66
1.4.1.2.	Modifications de la matrice extracellulaire au cours du vieillissement.....	67
1.4.1.2.1.	Accumulation de molécules de la MEC.....	67
1.4.1.2.2.	La glycation non enzymatique.....	68
1.4.1.2.3.	La calcification.....	68
1.4.1.3.	Dysfonction cellulaire lors du vieillissement.....	70
1.4.2.	Vieillessement pathologique des artères.....	70
1.4.2.1.	Hypertension artérielle et ses conséquences.....	70
1.4.2.1.1.	Remodelage hypertrophique	70
1.4.2.1.2.	Remodelage eutrophique	71
1.4.2.2.	Athérosclérose	71
1.4.2.3.	Anévrisme artériel.....	72
1.4.3.	Altération génétique des composants des fibres élastiques et pathologies vasculaires	72
1.4.3.1.	Les fibrillinopathies : Le syndrome de Marfan.....	73
1.4.3.2.	Altérations de l'élastine :	74
1.4.3.2.1.	La sténose supra- valvulaire aortique.....	74
1.5.	Présentation des objectifs de la thèse	76
2.	Expériences et résultats.....	79
2.1.	Etudes organotypiques : Mesure des tensions des anneaux de vaisseaux de rats sous l'effet des composants des fibres élastiques :.....	80
2.2.	Articles 1 et 2 : Effet des composants des fibres élastiques sur les fonctionnalités des cellules endothéliales (HUVEC).....	85
2.2.1.	Introduction des articles 1 et 2.....	85
2.2.2.	Article 1	87

2.2.3.	Article 2	117
2.2.4.	Discussion des articles 1 et 2 :.....	158
2.3.	Article 3 : Mise au point d'un protocole de culture de cellules musculaires lisses (CMLV) à partir d'aortes de souris	160
2.3.1.	Introduction de l'article 3 :	160
2.3.2.	Article 3	162
2.3.3.	Discussion de l'article 3 :	188
2.4.	Etudes sur cultures de CMLV : effet des composants des fibres élastiques sur la signalisation calcique des CMLV, effet du vieillissement et de la déficience en élastine et en fibrilline-1	190
3.	Discussion	203
3.1.	Fonctions cellulaires modifiées par les composants des fibres élastiques :.....	205
3.2.	Signalisations cellulaires déclenchées par les composants des fibres élastiques :.....	207
3.3.	Récepteurs mis en jeu dans les interactions fibres élastiques- cellules vasculaires :	208
3.4.	Mise au point d'un nouveau protocole de culture de CMLV de souris :.....	209
3.5.	Impact de la déficience en élastine et en fibrilline-1 sur la réactivité des cellules musculaires lisses vasculaires en culture aux composants des fibres élastiques :	210
3.6.	Effet du vieillissement sur la réactivité des cellules musculaires lisses vasculaires :.....	210
3.7.	Différences d'interactions entre les différentes molécules étudiées :.....	211
3.8.	Hypothèse d'explication de la différence des altérations présentes dans les syndrome de Williams-Beuren et de Marfan :.....	212
4.	Conclusions et perspectives	215
4.1.	Fibres élastiques et physiologie des vaisseaux sanguins	216
4.2.	Fibres élastiques et cellules endothéliales	217
4.3.	Fibres élastiques et cellules musculaires lisses vasculaires.....	218
4.4.	Fibres élastiques et vieillissement normal et pathologique (cas du WBS et du MS)	218
5.	Références Bibliographiques:.....	221
6.	Annexe.....	244
	Résumé	261
	Abstract	261

Liste des Figures

Figure 1: Structure générale d'un vaisseau sanguin	10
Figure 2 : Schéma des différents types de vaisseaux sanguins.....	12
Figure 3: Variations de pression sanguine dans les vaisseaux sanguins.	14
Figure 4 : Fonctions endothéliales diverses régies par les molécules secrétées par les cellules endothéliales.	20
Figure 5 : Rôle de l'endothéline dans la vasoréactivité vasculaire et la signalisation au niveau des CE et des CMLV vasculaires.	22
Figure 6 : Mécanismes moléculaires envisagés lors de la contraction et du relâchement des cellules musculaires lisses.....	24
Figure 7 : Mécanisme de chevauchement entre les deux phenotypes contractiles et prolifératif des CMLV.....	25
Figure 8 : Formation des fibres élastiques.....	27
Figure 9 : Elasticité des fibres élastiques	28
Figure 10 : Les différents domaines de la molécule de la tropoélastine.	29
Figure 11 : Différentes étapes de synthèse et de maturation de la tropoélastine.	30
Figure 12: Les différents domaines de la molécule de Fibrilline-1.....	32
Figure 13: Structure des microfibrilles sous microscopie électronique	33
Figure 14: Distensibilité des microfibrilles..	34
Figure 15: Différentes étapes de maturation des fibres élastiques	36
Figure 16: Mécanismes cellulaires mis en jeu lors du phénomène de la migration cellulaire	46
Figure 17: Domaines de liaison moléculaires de la molécule d'intégrine.....	48
Figure 18: Différentes conformations d'une intégrine et leurs rôles dans la signalisation cellulaire	49
Figure 19: Structure de l'ERC et voies de signalisation déclenchées par son activation.....	52
Figure 20: Proposition de mécanisme expliquant la synergie observée entre les récepteurs de l'élastine : ERC et intégrine $\alpha\beta 3$ au cours de la maturation des fibres élastiques	53
Figure 21 : Schéma simplifié de la signalisation cellulaire via les intégrines ou via des récepteurs de croissance impliquant l'angiogenèse	56
Figure 22: Transduction du signal via les intégrines : activation des voies FAK ou MAPK ou ILK	57
Figure 23: Les différentes voies d'entrée membranaire du calcium.....	59
Figure 24: Les différents types de canaux calciques cellulaires	61
Figure 25: Les voies de signalisation du phosphatidyl-inositol bi-phosphate (PIP2).	62
Figure 26: La voie de la MAPK.	63
Figure 27: Changement de la pression pulsatile dans l'arbre vasculaire.....	67
Figure 28: Différentes modifications affectant les artères en cours du vieillissement.....	69
Figure 29: Représentation schématique du remodelage hypertrophique et du remodelage eutrophique observés lors de l'hypertension artérielle	71
Figure 30: Effet de la rTE , des MF et de PF14 sur la tension des anneaux d'aorte de rat.	84
Figure 31: Activation de la voie de signalisation calcique des CMLV de souris C57Bl6 âgées de 6-8mois sous l'effet de rTE, kE, MF et PF14.	193
Figure 32: Effet de l'âge sur la réponse calcique des CMLV sous rTE, kE, MF et PF14	197
Figure 33: Réponse calcique obtenue après exposition à la rTE, la kE, les MF et PF14 des CMLV isolées de souris C57Bl6, Eln+/-, Fbn-1 +/-mg Δ âgées de 6 mois.	201

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des principales fonctions régies par l'endothélium	18
Tableau 2 : Les principales familles de molécules de la MEC autres que l'élastine.	39
Tableau 3: Protéinases détectables dans les vaisseaux et les cellules inflammatoires.....	42
Tableau 4: Les effets biologiques de l'élastine sur quelques types cellulaires	55
Tableau 5: Principales différences entre l'athérosclérose et l'artériosclérose	72

Abréviations

Ach: Acétylcholine	MS: « Marfan Syndrome »
AP-1 : « Activator Protein-1 »	Neu-1 : Neuraminidase-1
BMP : « Bone Morphogenetic Factor »	NO : Monoxyde d'azote
CE : Cellules Endothéliales	NOS : « NO Synthase »
DAG: Diacylglycérol	PAI : « Plasminogen Activator Inhibitor »
EBP: « Elastin Binding Protein »	PDGFR: "Platlet derived growth factor receptor"
ECE : Enzyme de Conversion des Endothélines	PE: Phényléphrine
ERC : « Elastin Receptor Complex »	PG: Protéoglycanes
ELR : « Elastin- Laminin Receptor »	PGI2 : Prostacycline
ERK : « Extracellular signal-Regulated Kinase »	PI3K : Phosphatidylinositol-3 Kinase
ET- (1, 2, 3) : Endothéline- (1, 2, 3)	PIP2: Phosphatidyl-Inositol bi-Phosphate
ET- (A, B) : Récepteur à l'endothéline (A, B)	PKA : Protéine Kinase A
FAK: « Focal Adhesion Kinase»	PMCA: « Plasma Membrane calcium ATPase »
FGF: « Fibroblast Growth Factor »	PPCA : « Protective Protein/Cathepsin A »
FN: Fibronectine	rTE : Tropoélastine Recombinate
FT : Facteur tissulaire	RyR: « Ryanodine Receptor »
GAG: Glycosaminoglycanes	SERCA: Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase
HUVECs: « Human Umbilical Vein Endothelial Cells »	SLRPs: Small Leucine-Rich Repeat Proteoglycans
ILK: « Integrin-Linked Kinase »	SVAS: Sténose Aortique Supra-Valvulaire
IP3: Inositol tri-Phosphate	TE: Tropoélastine
kE : kappa-élastine	TIMP: « Tissue Inhibitor of MetalloProteinase »
LOX: « Lysyl Oxidase »	t-PA : « Tissue Plasminogen Activator »
LOXL: « Lysyl Oxidase Like »	TSP: Thrombospondine
LTBP : « Latent TGF- β Binding Protein »	VEGF : « Vascular Endothelial Growth Factor »
MAGP : « Microfibrillar Associated GlycoProtein »	VEGF-R: Récepteur au VEGF
MEC : Matrice Extracellulaire	VSMCs, CMLV : Cellules musculaires lisses Vasculaires
MF : Microfibrilles Aortiques Bovines	vWF : Facteur Von- Willebrand
MMP: « Matrix Metalloproteinase »	WBS : « Williams Beuren Syndrome »

1) Introduction

Bibliographique

1.1 Le système vasculaire- Les artères

1.1.1 *Système cardio-vasculaire et évolution des espèces*

Le système circulatoire est apparu et s'est développé avec l'évolution des espèces, suivant leurs besoins. Chez les organismes unicellulaires, les besoins de l'organisme sont assurés par les simples échanges -par diffusion ou transport actif- entre le milieu intracellulaire et l'environnement. Avec l'évolution, l'apparition des pluricellulaires et l'accroissement de tailles des organismes, le simple système de diffusion n'était plus suffisant pour assurer la nutrition et l'oxygénation des cellules profondes. Ainsi, il était nécessaire de mettre au point un système d'échange développé. Les premiers métazoaires ont développé un système de circulation externe : des cellules ciliées distribuées à la surface du corps permettent de renouveler le milieu et de le filtrer. Chez les organismes plus évolués, un système circulatoire s'est développé avec un réseau vasculaire permettant le transport de substances entre les cellules internes et les zones spécialisées d'échanges avec le milieu extracellulaire. A partir d'un système ouvert, avec les chambres contractiles des invertébrés supérieurs assurant la circulation de l'hémolymphe, est apparu le système circulatoire clos chez les céphalopodes puis chez tous les vertébrés. Chez les vertébrés, il suit un trajet en boucle fermée, avec un réseau de vaisseaux plus large comportant de nombreuses ramifications, ce qui augmente la résistance hémodynamique et a nécessité l'apparition d'un organe plus performant qui joue un rôle de pompe : le cœur (Faury 2001, Opitz and Utkus 2001, Xavier-Neto, Castro et al. 2007)

1.1.2 *Le cœur*

Le cœur est la pompe qui permet de distribuer le sang dans tout l'organisme. Chez l'homme, toutes les minutes, 5 litres de sang sont pompés depuis le cœur et passent à travers les vaisseaux sanguins pour irriguer tous les tissus et organes du corps. Cette fonction du cœur est assurée par ses 2 ventricules qui se contractent pour éjecter le sang dans les grosses artères. En effet, le cœur est subdivisé par une cloison verticale en parties droites et gauches, et par des cloisons horizontales en oreillettes et ventricules, qui communiquent par les orifices auriculoventriculaires. Le sang veineux arrive à l'oreillette droite du cœur par les veines caves inférieures et supérieures, passe dans le ventricule droite pour rejoindre le poumon par l'artère pulmonaire où il sera oxygéné, revient dans l'oreillette gauche par la veine pulmonaire, passe dans le ventricule gauche où il part par l'aorte rejoindre tous les tissus de l'organisme.

L'histologie de la paroi myocardique montre la présence de 3 couches. A l'intérieur, se trouve l'endocarde, couche endothéliale tapissant l'intérieur du cœur et se prolongeant avec l'endothélium vasculaire. L'endocarde tapisse le myocarde, qui est la couche moyenne du tissu cardiaque composée de cellules musculaires striées cardiaques, les cellules myocardiques, dont certaines présentent un automatisme et qui permettent la contraction du cœur. L'enveloppe extérieure est le péricarde qui enveloppe tout le cœur et permet de le rattacher aux organes voisins (Grabowski 2002).

1.1.3 Les vaisseaux sanguins : structure générale

La fonction principale des vaisseaux sanguins est d'acheminer et distribuer le sang contenant nutriments et oxygène depuis le cœur jusqu'aux tissus de tout l'organisme, puis de récupérer les déchets tissulaires et de les conduire aux organes qui permettent leur évacuation. On dénombre trois catégories de vaisseaux sanguins : les artères –qui amènent le sang du cœur vers les organes-, les veines –qui ramènent le sang des organes vers le cœur-, et les capillaires –qui permettent les échanges de molécules entre le sang et les organes. Tout au long de l'arbre vasculaire, on observe des modifications dans le diamètre et la composition de ces vaisseaux qui reflètent leur fonction à un endroit particulier. Malgré cette différence de rôle, certains aspects de la structure des vaisseaux sont proches. La paroi vasculaire est organisée en trois couches bien différenciées morphologiquement et fonctionnellement : l'intima, la média et l'adventice (Figure 1), à l'exception des capillaires qui présentent seulement la couche intimale. L'intima est la tunique la plus interne du vaisseau, elle est en contact direct avec le sang. L'adventice est la couche la plus externe : elle est formée de tissu conjonctif et contient l'innervation et la vascularisation de l'artère (vasa vasorum). Entre les deux, la média est une couche musculaire et/ou élastique. L'espace entre les cellules dans chacune de ces couches contient la matrice extracellulaire (Lindop, Boyle et al. 1995, Pugsley and Tabrizchi 2000, Arribas, Hinek et al. 2006).

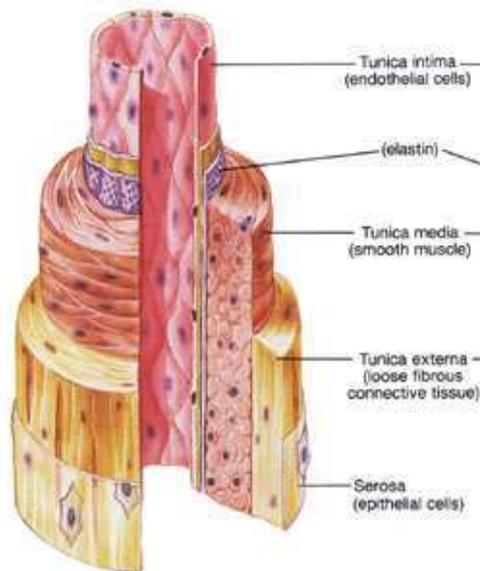


Figure 1: Structure générale d'un vaisseau sanguin composé d'une intima (tunica intima), d'une média (tunica media) et d'une adventice (tunica externa) (Fox 1994).

1.1.3.1 Intima

L'intima est une monocouche de cellules endothéliales tapissant l'ensemble de l'arbre vasculaire. Elle rentre en contact direct avec le flux sanguin et représente ainsi une grande surface de contact entre le sang et les tissus (Baldwin and Thurston 2001).

De part sa fonction de barrière entre le sang circulant et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de la média, l'intima, via les cellules endothéliales, joue un rôle essentiel dans multiples régulations

physiologiques fondamentales, comme l'hémostase, l'angiogenèse, le contrôle du tonus vasculaire (LACOLLEY, BABUTY et al. 2008), et présente aussi un rôle endocrinien.

Les cellules endothéliales sont posées sur une fine couche de matrice extracellulaire (MEC), la membrane basale. La membrane basale a une composition beaucoup plus simple que la MEC de la média. Elle est formée essentiellement de collagène de type IV, laminine, perlécane, protéoglycanes, fibronectine et élastine (Jaffe and Mosher 1978, Gospodarowicz, Greenburg et al. 1981, Mecham, Madaras et al. 1983, Oohira, Wight et al. 1983, Fuh, Bensch et al. 1986)

1.1.3.2 Média

La structure et la composition de la média sont très variables suivant les différents territoires vasculaires. Elles confèrent au vaisseau ses propriétés mécaniques d'étirement et de contraction et permettent ainsi de faire varier le diamètre du vaisseau. Dans les plus grosses artères, la média est constituée de plusieurs lames élastiques concentriques, riche en fibres élastiques, collagènes de types I et III, protéoglycanes (hyaluronane, décorine, versicane et perlécane) et glycoprotéines (laminine, fibronectine et thrombospondine) (Mumby, Abbott-Brown et al. 1984, Giachelli, Bae et al. 1993) Cet ensemble est structuré de manière organisée (Clark and Glagov 1985) ; entre lesquelles on retrouve les CMLV qui sont aussi arrangées de façon concentrique. Chaque ensemble d'une couche de CMLV et de la lame élastique adjacente forme une unité lamellaire (Wolinsky H 1967), ou plus précisément un feuillet musculo-élastique (Clark and Glagov 1985) : c'est un groupe de CMLV enveloppé par une lame basale et des fibrilles de collagène, le tout enveloppé des fibres élastiques. Le nombre de feuillets musculo-élastiques est proportionnel au diamètre du vaisseau et augmente progressivement, dans un type de vaisseau donné, avec le poids et la taille chez les différents animaux. La média est séparée de l'intima et de l'adventice respectivement par la lame élastique interne (= limitante élastique interne) et la lame élastique externe (= limitante élastique externe) (Pugsley and Tabrizchi 2000).

1.1.3.3 Adventice

L'adventice est la tunique la plus extérieure de la paroi vasculaire. Elle est formée de fibroblastes entourés par une grande quantité de MEC riche en collagènes, principalement du collagène de type I. Elle peut contenir également quelques fibres élastiques, comme chez le rat. On y trouve aussi quelques CMLV, adipocytes et péricytes. Cette couche est un réservoir de facteurs de régulation des fonctions biologiques la paroi vasculaire : elle est impliquée dans la régulation de la vasomotricité du fait de la présence des terminaisons nerveuses qui libèrent différents neurotransmetteurs qui agissent sur les CMLV de la média. Elle synthétise, grâce aux fibroblastes, des composés de la MEC. L'adventice des grosses artères contient également de petits vaisseaux sanguins appelés vasa vasorum dont le rôle est de nourrir la média, qui est si épaisse que la diffusion des nutriments, gaz et signaux venant de la lumière vasculaire ne sont pas suffisants pour la nourrir. Elle ne présente pas de structure bordante en limite externe, contrairement à la média (Pugsley and Tabrizchi 2000, Kielty, Stephan et al. 2007, Mulligan-Kehoe 2010, Majesky, Dong et al. 2011).

1.1.4 Les différents vaisseaux sanguins des mammifères

La structure des différents vaisseaux varie tout au long de l'arbre artériel : on observe des changements de diamètre et de composition des vaisseaux (Figure 2). Ceci est en relation directe avec d'une part la fonction de chacun de ces vaisseaux et, d'autre part, la pression sanguine présente au niveau de chaque vaisseau.

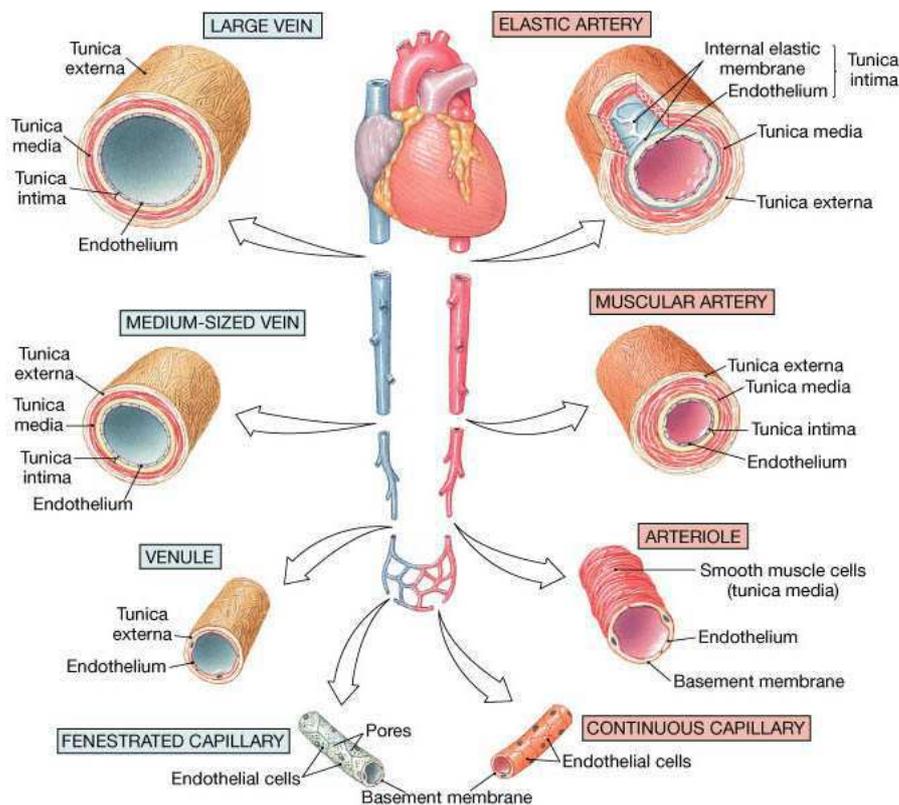


Figure 2 : Schéma des différents types de vaisseaux sanguins montrant leurs différences de diamètre et de structure. (Frederic H. Martini 2004).

Les artères de gros calibre (> 10 mm chez l'Homme) -dites artères élastiques- se distendent à chaque systole en emmagasinant de l'énergie sous l'action de l'arrivée de l'important volume de sang sous pression éjecté par le cœur. Elles retournent ensuite lentement à leur diamètre d'origine pendant la diastole en restituant l'énergie stockée, c'est-à-dire en appliquant une pression sur le sang qui continue alors à circuler (effet Windkessel). Ceci permet progressivement, tout au long de l'arbre des artères élastiques, de convertir un flux sanguin discontinu dans la partie proximale de l'aorte en flux continu au niveau des artérioles et des capillaires (Figure 3). En effet, ces artères, appelées aussi artères élastiques, sont composées surtout de fibres élastiques (40% de la composition totale de la paroi vasculaire, jusqu'à 70% au début de l'aorte ascendante), qui permet à ces vaisseaux, d'avoir des propriétés élastiques. Ainsi, alors que la pression ventriculaire diastolique chute très bas, à seulement quelques mmHg, l'élasticité des grosses artères prévient une chute trop importante de la pression et du débit sanguin artériels en diastole. En outre, la présence de fibres de collagènes (35% de la média des gros artères) permet de

limiter la distensibilité du vaisseau à forte pression et de prévenir toute hyper-extension qui endommagerait la paroi artérielle (Farhi LE et al. 1990, Fink GD.2005, Mellander S. 1970).

Les artères musculaires les plus grosses (diamètre compris entre 1 et 10 mm chez l'Homme) rendent possible la distribution du sang vers les différents organes de par leur forte capacité de contractilité. Ces artères possèdent plutôt des propriétés contractiles qu'élastiques du fait de la proportion importante de cellules musculaires lisses (CMLV) dans leur paroi (60% en composition de CMLV pour 10 à 20% de fibres élastiques). Elles permettent d'augmenter ou de diminuer le flux sanguin au niveau d'un membre ou d'une partie du corps. Les CMLV, en se contractant et se dilatant, permettent aux artères de s'adapter aux différentes conditions physiologiques et de réguler les débits sanguins régionaux (Fink GD.2005, Farhi LE et al. 1990, Mellander S. 1970).

Les artères de résistance, composées par les artères musculaires plus petites et les artérioles, ont un plus faible diamètre (< 300 μm chez l'Homme). Elles offrent une plus grande résistance à l'écoulement du sang, en raison de leur faible rayon, la résistance étant inversement proportionnelle à la puissance 4 du rayon ($R=8\eta l/\pi r^4$, r étant le rayon du vaisseau, η la viscosité du sang et L la longueur du vaisseau). En faisant varier leur rayon (vasodilatation ou vasoconstriction), ces artères peuvent augmenter ou diminuer le flux sanguin pour accommoder une demande locale. En effet, le débit obéit à la loi de Poiseuille : $Q=\Delta P/R$, Q étant le débit volumique, ΔP la différence de pression en amont et en aval du vaisseau, et R la résistance. Le débit est alors directement fonction du rayon du vaisseau : une dilatation locale des artères de résistance permet d'augmenter l'irrigation du tissu alors qu'une constriction la fait baisser (Fink GD.2005; Farhi LE et al. 1990).

Plus on avance vers la partie distale de l'arbre vasculaire, plus celui-ci est ramifié, pour atteindre un maximum de ramifications au niveau des capillaires, où la pression est d'environ 20 mmHg. Par ailleurs, au cours de son passage dans les artérioles, la pression sanguine finit de perdre sa pulsativité, abolissant ainsi les variations de débit et de pression. La présence des ramifications capillaires permettent de réduire encore plus la pression sanguine, ce qui permet d'irriguer plus de cellules, et de faciliter ainsi les échanges de gaz, de métabolites et de molécules de signalisation entre le sang et le tissu. La structure des capillaires est bien adaptée à cette fonction d'échange : en effet, leur paroi est constituée d'une seule couche de cellules qui est dans certains cas fenestrée voire même discontinue. La paroi des capillaires est donc très facile à traverser (Mellander 1970, Plante 2002, Fink 2005).

Passés les capillaires, les vaisseaux convergent en augmentant progressivement leur diamètre. Les veinules et les petites veines permettent le retour du sang de la périphérie vers le cœur. Les veines sont aussi appelées vaisseaux de capacitance : c'est à ce niveau que se trouve le volume le plus important de sang. En effet, elles contiennent environ les 2/3 du sang circulant. Ceci est possible grâce à une fine paroi vasculaire facilement étirable. Les veines possèdent aussi assez de cellules musculaires lisses pour présenter un tonus, ce qui leur permet de réguler le volume sanguin et la précharge (c'est à dire les conditions de charge/remplissage du ventricule droit en télédiastole) (Schmitt, Blackman et al. 2002) (Fink 2005).

Le sang appauvri en oxygène par la consommation des tissus arrive alors au cœur droit par deux grosses veines : la veine cave supérieure, qui est issue des régions supérieures, et la veine cave inférieure, issue des régions inférieures de l'organisme. Il rejoint alors la circulation pulmonaire via l'artère pulmonaire,

qui à l'inverse des artères de la circulation systémique, transporte un sang pauvre en oxygène. Arrivé dans les poumons, le sang pauvre en oxygène est réoxygéné au niveau des alvéoles et repart par les veines pulmonaires pour rejoindre l'oreillette gauche, d'où il reprend son cycle dans la circulation systémique. Les veines pulmonaires véhiculent donc du sang oxygéné à l'inverse des veines de la circulation systémique (Farhi and Sheehan 1990, Baile 1996).

Normalement, la quantité de sang pompée dans les circuits pulmonaires et systémiques sont égaux, ce qui revient à dire que le cœur droit pompe la même quantité de sang que le cœur gauche. C'est seulement quand le débit sanguin subit des variations que ces volumes diffèrent l'un de l'autre, et ceci de façon momentanée (Baile 1996, Fink 2005).

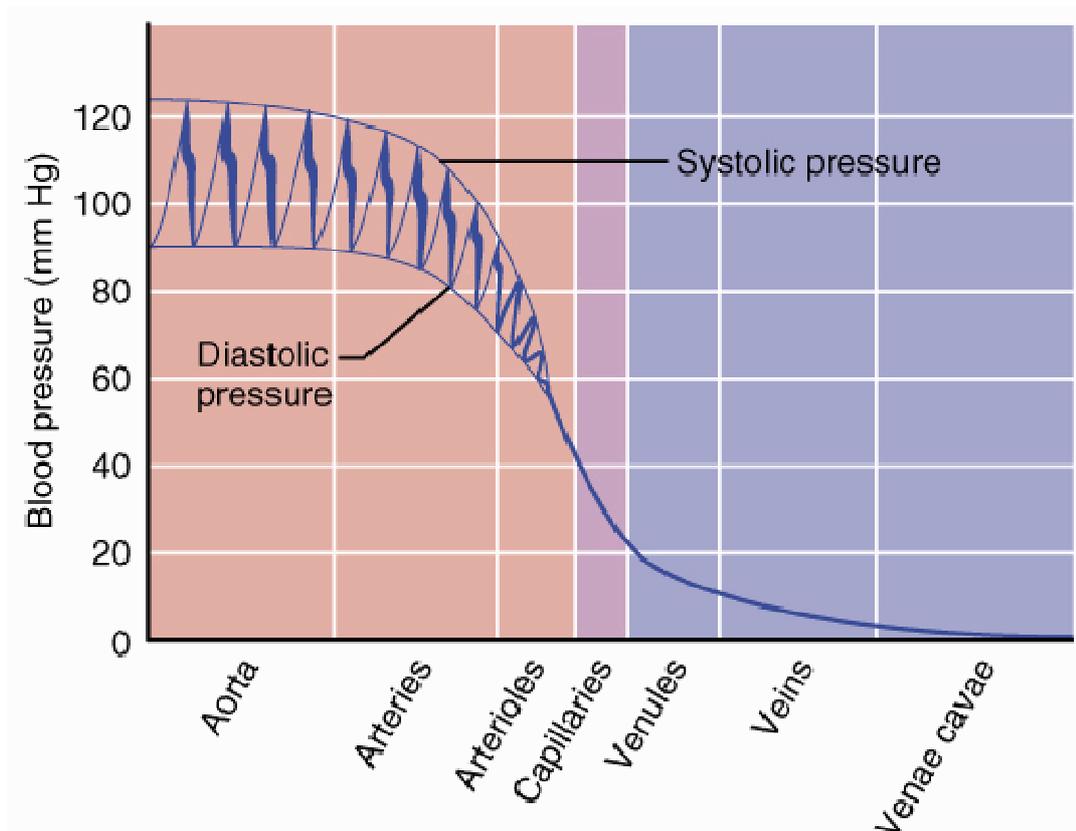


Figure 3: Variations de pression sanguine dans les vaisseaux sanguins. Dans l'aorte et les artères musculaires proximales, les pressions diastoliques et systoliques sont progressivement lissées pour obtenir une pression et un débit constants dans les vaisseaux les plus distaux (Frederic H. Martini 2004).

1.1.5 Les artères :

Comme indiqué plus haut, la fonction essentielle des artères -surtout élastiques- est d'amortir les variations de pression et de débit artériels pulsés par le cœur et d'assurer un débit sanguin continu. Ce débit sanguin continu est essentiel pour que les cellules de chaque organe puissent être irriguées correctement.

1.1.5.1 Structure des artères :

La structure des artères répond au modèle cité plus haut, avec une intima, une média et une adventice. Au niveau de l'intima, les cellules endothéliales sont très sensibles aux contraintes mécaniques, notamment les contraintes de cisaillement imposées par le flux sanguin, qui exerce un frottement sur l'endothélium proportionnel à la vitesse sanguine, à la viscosité sanguine et inversement proportionnelle au calibre artériel. Ces forces peuvent même modifier la structure des cellules endothéliales. Ainsi, après quelques heures d'applications de forces de cisaillement sur des cellules endothéliales en culture, ces cellules changent de forme, passant de polygonales à allongées, et elles s'orientent dans le sens du flux circulant (Davies 1995, LACOLLEY, BABUTY et al. 2008).

La composition de la média dépend du type de l'artère; ainsi, dans les artères élastiques, prédominent les fibres élastiques alors que dans les artères musculaires, la proportion des CMLV est supérieure à celle des fibres élastiques. Dans ce deuxième type d'artères, les CMLV sont ainsi arrangées de façon concentrique et sont entourées de fibres élastiques dispersées qui ne sont pas ainsi organisées en lames épaisses. L'épaisseur de la média des artères musculaires diminue de l'artère vers l'artériole qui est constituée d'une seule couche de myocytes (Shadwick 1999, Wagenseil and Mecham 2009).

L'adventice, elle, est formée de fibroblastes entourés par une MEC abondante et riche en collagènes, principalement du collagène de type I. Chez le rat, elle contient également des fibres élastiques. On y trouve aussi quelques CMLV, adipocytes et péricytes. L'adventice des grosses artères contient également de petits vaisseaux sanguins appelés vasa vasorum dont le rôle est de nourrir la média, si épaisse que les nutriments en provenance de la lumière artérielle diffusent insuffisamment. Elle ne présente pas de structure bordante en limite externe, contrairement à la média (Pugsley and Tabrizchi 2000, Kielty, Stephan et al. 2007, Mulligan-Kehoe 2010, Majesky, Dong et al. 2011).

1.1.5.2 Fonction principale des artères- Rôle mécanique

Le cœur pompe le sang pendant la systole et se remplit de sang pendant la diastole. Il éjecte ainsi un flux discontinu du sang dans l'arbre vasculaire. Les grosses artères les plus proches du cœur, reçoivent alors ce flux discontinu de sang et essayent de le transformer en flux continu vers les organes. C'est la fonction principale des artères. Ainsi, les grosses fluctuations de pression sanguine à la sortie du ventricule gauche pendant le cycle cardiaque s'atténuent fortement dans l'aorte ainsi que dans les artères musculaires, et disparaît dans les artérioles et les capillaires qui se trouvent à l'extrémité du réseau vasculaire. Le phénomène mécanico-physiologique responsable de ce lissage du flux sanguin est connu sous le nom d'effet de Windkessel. Il a lieu principalement dans les artères élastiques proches du cœur très riches en protéines élastiques, qui sont à l'origine de cette fonction (Wagenseil and Mecham 2009).

1.1.5.3 Relation structure fonction des composants artériels

Ce rôle mécanique des artères n'est rendu possible que par leur structure adaptée. La média et l'adventice sont les responsables directs des propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins. Or l'intima possède un

rôle primordial dans cette action. Les cellules endothéliales de l'intima sont au contact direct du flux sanguin –qui leur impose les contraintes de cisaillement et les messages circulants, comme les hormones. En réponse, ces cellules secrètent des vasoconstricteurs et vasodilatateurs qui agissent sur les cellules musculaires en modifiant leur état contractile (LACOLLEY, BABUTY et al. 2008). Leur action est plus visible au niveau des artères musculaires où les cellules musculaires lisses contrôlent fortement le diamètre artériel et créent une résistance au passage du sang.

Dans les grosses artères élastiques, les cellules musculaires lisses participent peu aux propriétés mécaniques des vaisseaux sanguins : la distensibilité des grosses artères est peu touchée par un traitement par le KCN qui tue les cellules vasculaires (Faury 2001, Faury, Robert et al. 2003). C'est surtout la structure matricielle de la paroi, en particulier des lames élastiques de la média, qui rentre en jeu dans ce rôle mécanique. Il faut noter à ce sujet que plus la tension subie par un vaisseau sanguin est grande (tension = pression sanguine x rayon du vaisseau), plus le nombre de lames élastiques est élevé.

Les fibres élastiques, composant principal de ces lames, y sont l'acteur mécanique principal. Les composants des fibres élastiques -l'élastine surtout- mais aussi partiellement les microfibrilles (Lillie, David et al. 1998) rentrent en jeu. L'élastine est une protéine très extensible (+ de 100% d'extension possible), elle est présente en très grande quantité dans les artères élastiques (plus de 50% du poids sec dans l'aorte proximale) et constitue le principal composant des lames élastiques dans les vaisseaux sanguins. Par contre, le collagène, composant principal de l'adventice, est, contrairement à l'élastine, très peu extensible (10% d'extension au maximum) et permet de limiter l'extensibilité des vaisseaux sanguins et contribue ainsi à la protection contre la rupture de la paroi vasculaire. Les fibres de collagènes sont disposées de manière non organisée dans la média et l'adventice des vaisseaux à faible pression. A proximité de la pression sanguine physiologique, ces fibres s'alignent circonférenciellement. A des pressions sanguines plus élevées, plus de fibres de collagène sont recrutées et contribuent ainsi à la protection contre la rupture de la paroi artérielle en empêchant une sur-extension et l'endommagement du vaisseau.

Le rapport élastine/collagène est un indicateur de l'élasticité d'un vaisseau sanguin. De manière générale, plus ce rapport est élevé, plus le vaisseau est distensible sous l'effet de la pression sanguine. La contribution de l'élastine et du collagène dans l'élasticité non linéaire des artères a été mise en évidence par Roach et Burton (Roach and Burton 1957) : en digérant sélectivement l'un ou l'autre de ces deux éléments dans les artères humaines, ces auteurs ont montré que le niveau de rigidité initial (à faible extension) de la paroi artérielle représente l'élasticité de l'élastine, alors que la rigidité plus forte pour des extensions plus élevées représente la contribution des fibres de collagènes qui se tendent progressivement et limitent l'extension du vaisseau (Mariko, Pezet et al. 2011).

1.2 Les composants vasculaires

Les vaisseaux sanguins ne sont pas des tubulures inertes servant uniquement de conduits permettant d'acheminer le sang, donc les nutriments et l'oxygène, aux différents tissus de l'organisme. Il s'agit de structures complexes, composées de cellules entourées de matrice extracellulaire (MEC) formées de macromolécules diverses. Les cellules sont intégrées dans la matrice extracellulaire, avec qui elles interagissent.

1.2.1 Les cellules vasculaires

Les cellules « normales » de la paroi vasculaire sont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les fibroblastes, intégrés respectivement dans les couches intimale, médiale et adventicielle. Chaque type cellulaire présente un phénotype propre lui permettant d'exercer une fonction spécifique dans le vaisseau. Dans des conditions pathologiques, d'autres cellules, comme des cellules inflammatoires circulantes, peuvent s'infiltrer dans la paroi vasculaire. On se limitera dans les paragraphes suivants à la description des cellules endothéliales, des musculaires lisses et des fibroblastes.

1.2.1.1 Cellules endothéliales

1.2.1.1.1 Histologie

Les cellules endothéliales (CE) sont des cellules polygonales aplaties d'origine mésodermique. Leurs membranes latérales forment des interdigitations complexes avec la membrane des CE voisines pour former une assise de cellules jointives. Elles couvrent la face luminale des parois vasculaires dans la totalité du système circulatoire. Elles forment une monocouche semi-perméable délimitant la lumière du vaisseau, l'endothélium, qui entre en contact direct avec le sang. Ces cellules sont orientées dans le sens de l'écoulement sanguin.

1.2.1.1.2 Rôles

Le flux sanguin exerce sur la CE une force de friction tangentielle qui applique une contrainte de cisaillement à ces cellules, ce qui stimule la sécrétion par la CE de facteurs impliqués dans l'inhibition de la coagulation, la migration des leucocytes et la prolifération des CMLV (Michiels 2003), la vasoconstriction et la vasodilatation,... (LACOLLEY, BABUTY et al. 2008)

L'endothélium, par sa position de barrière entre le sang et les couches internes du vaisseau sanguin, entre ainsi en jeu dans plusieurs fonctions vasculaires (Tableau 1, Figure 4) (Abdu, Elhadd et al. 2001) :

- Régir les échanges sang-tissu
- Initier l'angiogénèse
- Réguler l'hémostase
- Sécréter des substances vasoactives (NO, PGI₂, l'endothéline...).

Outre ces différents rôles physiologiques, les CE synthétisent aussi plusieurs constituants de la matrice extracellulaire comme les collagènes III, IV et VI, l'élastine, la laminine, la fibronectine, les glycosaminoglycanes sulfatés et des métalloprotéases. Les CE peuvent aussi synthétiser des cytokines,

des facteurs de croissance et autres composés (Gerritsen, Shen et al. 1996) et jouent un rôle de défense contre les pathogènes. Finalement, ces cellules contiennent aussi des récepteurs spécifiques pour les neurotransmetteurs et les hormones (Khimji and Rockey 2010).

Endothelial function	Mediator ^a	Test of function
Vasoregulation	NO, EDHF, PGI ₂ , ET-1, Ang II and TXA ₂	Flow-mediated endothelium-dependent dilation of brachial artery Response to intra-arterial acetylcholine infusion with and without L-NMMA Impedance plethysmography
Coagulation	PGI ₂ , TXA ₂ , vWF, fibrinogen, thrombomodulin and TF	Measurement of plasma fibrinogen, vWF and thrombomodulin levels
Fibrinolysis	t-PA and PAI-1	Measurement of t-PA activity and PAI-1 level
Inflammation	CRP, E-selectin, fibrinogen ICAM-1 and IL-6	Measurement of plasma or serum levels of CRP, E-selectin, fibrinogen ICAM-1 and IL-6
Angiogenesis	VEGF, PDGF and TGF-β	Measurement of VEGF and PDGF level/activity

^aAbbreviations: Ang II, angiotensin II; CRP, C-reactive protein; EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor; ET-1, Endothelin-1; ICAM-1, Intercellular adhesion molecule-1; IL-6, interleukin 6; L-NMMA, N-monomethyl L-arginine; NO, Nitric oxide; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; PGI₂, prostacyclin; PDGF, platelet derived growth factor; TGF-β, transforming growth factor β; t-PA, tissue plasminogen activator; TF, tissue factor; TXA₂, thromboxane A₂; VEGF, vascular endothelial growth factor; vWF, von Willebrand factor.

Tableau 1 : Récapitulatif des principales fonctions régies par l'endothélium (Abdu, Elhadd et al. 2001)

(a) Régir les échanges sang-tissu : perméabilité vasculaire

En tant que principale barrière entre le sang et les tissus, la CE joue un rôle fondamental dans la régulation de l'échange entre le sang et les cellules de la paroi. Les cellules endothéliales sont recouvertes de glycocalyx, qui est une couche de biopolymères glucidiques chargés négativement (le hyaluronane, l'héparane sulfate, protéoglycanes) qui limite le passage des grosses molécules, dont les lipoprotéines plasmatiques. Mais, il existe des espaces intercellulaires (15 à 0 nm) permettant le passage de l'eau et des petites molécules hydrosolubles comme le glucose ou les acides aminés, alors que les grosses molécules lipidiques pourraient, elles, s'incorporer avec la bicouche lipidique pour pouvoir diffuser dans les cellules de la paroi vasculaire (Scow, Blanchette-Mackie et al. 1976). Les plus grandes molécules passent depuis le sang vers le tissu vasculaire soit via des vésicules de transport de la CE, soit par des points de passage existant au niveau des jonctions intercellulaires. Ces jonctions endothéliales sont des complexes protéiques membranaires reliés aux filaments d'actine du cytosquelette et assurant la liaison entre les cellules. On observe 3 types de jonctions dans les CE : les jonctions serrées ("tight junctions"), les jonctions adhérentes ("adherens junctions") et les jonctions communicantes ("gap junctions") (Dejana, Corada et al. 1995). Les jonctions serrées permettent dans les conditions normales le passage des simples ions. Les jonctions adhérentes sont des structures dynamiques déterminantes dans la perméabilité de l'endothélium. L'endothélium discontinu qu'on trouve au niveau des capillaires sanguins est sujet à des modulations plus complexes que les endothéliums continus. En effet, l'endothélium est en continuelle interaction avec les facteurs humoraux et cellulaires à l'origine du passage de cellules à travers l'endothélium (diapédèse). Dans ce cas, les CE sont capables de changer rapidement l'architecture de leurs jonctions cellulaires pour permettre ou non le passage de composants plasmatiques de grande taille

ou de cellules circulantes. Les jonctions communicantes (gap junction) rendent possible la transmission de signaux vasomoteurs d'une cellule à l'autre grâce à des ions, de petits messagers ou des potentiels membranaires (Aghajanian, Wittchen et al. 2008, Dejana, Orsenigo et al. 2009, Huber 2009).

(b) Rôle dans l'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux pré-existants. Elle peut se dérouler de 2 façons : soit par germination, qui correspond à l'élongation de nouveaux tubes endothéliaux, soit par intussusception qui correspond à une invagination d'un vaisseau sanguin préexistant et sa division en deux (Risau 1997, Ribatti, Vacca et al. 2002). Les CE ont un rôle important dans l'angiogenèse à travers l'action du VEGF ("Vascular Endothelial Growth Factor"). Les angioblastes, possédant le récepteur VEGF-R2, sont stimulés par le VEGF pour se différencier en cellules endothéliales (Ferrara 1999) et se multiplier. Le processus de croissance et de morphogenèse des vaisseaux se déroule en plusieurs étapes : dégradation protéolytique de la membrane basale vasculaire et de la matrice interstitielle, migration et prolifération des CE (Michiels 2003). Il a été montré que l'inactivation du gène du VEGF, chez la souris, implique une létalité embryonnaire précoce suite à l'absence de cellules vasculaires organisées en vaisseaux (Carmeliet, Mackman et al. 1996). Mais de nombreux autres facteurs sont également connus pour leur implication dans la survie des cellules endothéliales, comme les angiopoïétines (Gale and Yancopoulos 1999).

(c) Rôle dans l'hémostase

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes qui concourent à maintenir le sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux, c'est à dire arrêter les hémorragies et empêcher les thromboses. Les cellules endothéliales ont des fonctions multiples dans ce processus (Figure 4):

- A l'état de repos, les CE s'intercalent entre les substances sous-endothéliales procoagulantes (comme le collagène) et le sang, et préviennent par la suite l'activation et la coagulation des plaquettes. A l'état de repos, les cellules endothéliales sont alors anti-thrombotiques.
- En revanche, lorsqu'elles sont activées, elles deviennent prothrombotiques et seront le support des réactions de la cascade de la coagulation.
- Enfin ces cellules synthétisent des substances importantes impliquées dans l'hémostase: facteur von Willebrand (vWF), prostacycline (PGI₂), facteur tissulaire (FT), thrombomoduline, activateur du plasminogène (t-PA) et son inhibiteur (PAI) (de Graaf, Banga et al. 1992, Sadler 1997, Vallet and Wiel 2001).

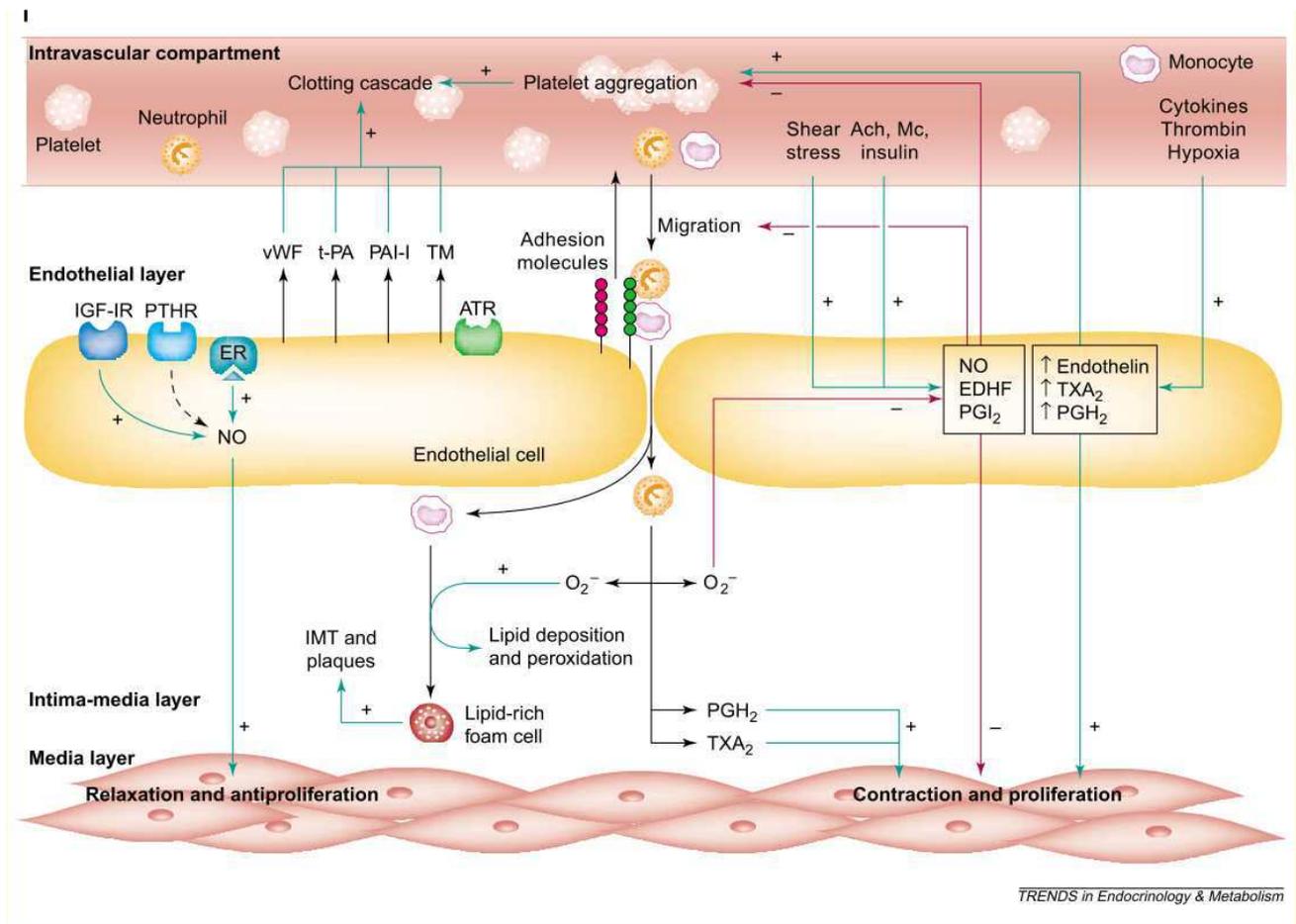


Figure 4 : Fonctions endothéliales diverses régies par les molécules sécrétées par les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales réagissent avec les composants du sang en sécrétant des facteurs intervenant, entre-autres actions, dans le mécanisme de coagulation, et communiquent avec les CMLV sous-jacentes en sécrétant des facteurs vasoconstricteurs et vasorelaxants, et en régulant la vitesse de prolifération des CMLV (Abdu, Elhadd et al. 2001).

(d) La synthèse de molécules vasoactives

Les cellules endothéliales sécrètent des molécules vasoconstrictrices et des molécules vasodilatatrices. L'équilibre entre ces molécules à n'importe quel moment t permet de déterminer le tonus du vaisseau à ce moment t (Figure 4).

i. Le NO

Furchgott et Zawadzki découvrirent en 1980 un facteur responsable de la réponse vasorelaxante à l'acétylcholine. Ils le nommèrent EDRF (endothelium derived relaxing factor) qui fut identifié plus tard comme étant le monoxyde d'azote- NO, radical libre gazeux, qui s'est avéré être le médiateur relaxant produit par les CE en réponse à différentes substances comme la bradykinine, l'acétylcholine, l'histamine (Furchgott and Zawadzki 1980, Radomski, Palmer et al. 1987). Dans les milieux biologiques, le NO diffuse rapidement dans un rayon d'une centaine de micromètres pour y activer des cibles moléculaires. Il

possède une demi-vie très brève, ce qui lui permet d'avoir des effets rapides mais transitoires (Moncada, Palmer et al. 1991). Une fois secrété par les CE, le NO diffuse dans la média, et stimule la guanylate cyclase des CMLV, impliquant par la suite l'augmentation du taux de GMP cyclique intracellulaire (GMPC), la relaxation des CMLV et la vasodilatation (Denninger and Marletta 1999).

Les cellules endothéliales possèdent l'équipement enzymatique nécessaire à la transformation réciproque de la L-citrulline en L-arginine : le NO est synthétisé par l'action de la NO synthase (NOS) sur l'oxygène et la L-arginine, qui est convertie en citrulline. La synthèse de NO dépend aussi de plusieurs co-facteurs dont la tétrahydrobioptérine et est hautement régulée par le calcium libre intracellulaire et la calmoduline.

On connaît actuellement trois isoformes de NOS : La NOS I ou NOS neuronale, la NOS II ou NOS inducible, car exprimée après induction par des cytokines proinflammatoires, et la NOS III ou NOS endothéliale ou eNOS (Nathan 1992). La NOS, enzyme dépendante du calcium, est stimulée par des agonistes ou par les forces de cisaillement et est activée par l'augmentation de la concentration du calcium libre intracellulaire ($[Ca^{2+}]_i$). Du fait de la présence des forces de cisaillement continues sur les cellules endothéliales, le NO est libéré de manière continue par les CE au niveau des vaisseaux sanguins ce qui est à l'origine d'une vasodilatation dite dépendante du flux (Dimmeler, Fleming et al. 1999, LACOLLEY, BABUTY et al. 2008).

ii. La prostacycline:

Le NO n'est pas le seul médiateur d'origine endothéliale à moduler l'effet des vasoconstricteurs, l'endothélium peut aussi libérer la prostacycline (PGI₂) qui relaxe le muscle lisse vasculaire sous-jacent par l'intermédiaire de l'AMPC (adénosine monophosphate cyclique)(Langille 1993). La PGI₂ est le produit de l'action de la prostacycline synthase sur la prostaglandine H₂, elle-même le résultat de l'action d'une cyclo-oxygénase et d'une peroxydase sur l'acide arachidonique.

iii. L'EDHF

Enfin, l'endothélium peut aussi induire une vasodilatation grâce au facteur hyperpolarisant endothélial (EDHF) dont la nature n'est pas encore totalement élucidée. Comme son nom l'indique, EDHF diffuse et active des canaux potassiques des cellules musculaires lisses sous jacentes et produit ainsi une hyperpolarisation au niveau de la cellule musculaire lisse vasculaire ce qui empêche l'entrée du calcium dans la cellule et donc bloque la contraction (Palade, Simionescu et al. 1979, Garland, Hiley et al. 2011).

iv. Les endothélines

Les endothélines sont des peptides de 21 acides aminés contenant deux ponts disulfures. Trois isoformes d'endothéline existent : l'endothéline 1 (ET-1), ET-2 et ET-3. L'endothéline est synthétisée par les cellules endothéliales sous forme de préproendothéline. La dégradation de ce peptide par la furine produit la big-endothéline qui est finalement convertie, de façon enzymatique par une enzyme de conversion des endothélines (ECE), en endothéline active. Le site de synthèse principal des endothélines est l'endothélium, elles sont synthétisées et libérées par stimuli chimiques, mécaniques et autres (angiotensine, thrombine, hypoxie...). Les endothélines agissent en activant deux récepteurs spécifiques, l'ET-A et l'ET-B. L'activation de l'ET-A et de l'ET-B implique l'activation de la phospholipase-C, qui transforme le PIP₂ membranaire en IP₃ et DAG (LACOLLEY, BABUTY et al. 2008). Les récepteurs des

endothélines sont exprimés par plusieurs types cellulaires. Dans le vaisseau sanguin, ils sont exprimés par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Dans les cellules musculaires, l'activation des récepteurs ET-A et ET-B déclenche la contraction de ces cellules et contribue à accroître ainsi la pression artérielle. Cependant, dans les cellules endothéliales, l'activation des récepteurs ET-B présents permet de libérer du NO dans le milieu vasculaire ce qui va provoquer une diminution transitoire de la pression artérielle (Figure 5).

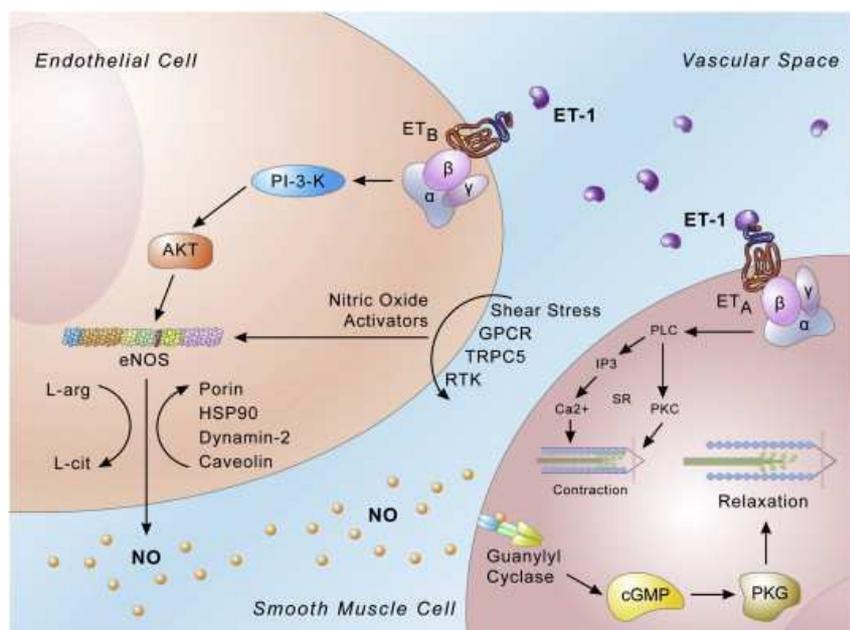


Figure 5: Rôle de l'endothéline dans la vasoréactivité vasculaire et la signalisation au niveau des CE et des CMLV vasculaires : au niveau des CMLV, la liaison de l'ET-1 sur son récepteur ET_A implique la contraction musculaire. Au niveau des CE, sa fixation au niveau de l'ET_B implique la production du NO, un vasodilatateur qui diffuse au niveau des CMLV pour les relâcher (Khimji and Rockey 2010)

Les CEs sécrètent aussi, d'autres facteurs vasoconstricteurs : comme le thromboxane A₂ synthétisé à partir de l'acide arachidonique, et la prostaglandine H₂, ainsi que des anions superoxyde et des composants du système rénine-angiotensine.

Physiologiquement, il existe un équilibre permanent entre les facteurs relaxants et les contractants. A l'état normal, il existe une vasodilatation vasculaire permanente par action des facteurs relaxants endothéliaux qui s'opposent à l'action des facteurs contractants (Arnal, Dinh-Xuan et al. 1999)

1.2.1.2 Cellules musculaires lisses vasculaires

1.2.1.2.1 Histologie

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) sont des cellules fusiformes qui ont une longueur comprise entre 20 et 200µm et un diamètre compris entre 5 et 10µm. Contrairement aux cellules du muscle squelettique, elles sont mononuclées. Ces cellules sont majoritairement disposées de façon perpendiculaire à la direction du flux sanguin, c'est-à-dire avec leur grand axe orienté circonférentiellement.

Contrairement aux cellules endothéliales, toutes d'origine mésodermiques, différentes origines embryonnaires existent pour les CMLV, en fonction de leur position anatomique. Dans la tête, le cou et la crosse aortique, les CMLV sont essentiellement dérivées des crêtes neurales. Les CMLV des artères

coronaires sont originaires d'un organe embryonnaire transitoire, le proépicarde, alors que dans tout le reste de l'organisme, les CMLV sont d'origine mésodermique (Landerholm, Dong et al. 1999, Carmeliet 2000, Armulik, Abramsson et al. 2005).

Dans les artères matures non pathologiques, les CMLV sont localisées dans la média et sont souvent organisées en feuillets superposés et parallèles. Les CMLV sont entourées par une membrane basale incomplète (Thyberg, Blomgren et al. 1997), des fibrilles de collagène et des fibres élastiques. Outre les organites habituels tels que les mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticulum sarcoplasmique, le cytoplasme contient principalement l'appareil contractile composé de filaments d'actine, de myosine et de desmine, et orienté dans le sens du grand axe de la cellule. Dans les CMLV ayant acquis leur phénotype contractile, les filaments d'actine et de myosine sont organisés en pseudo-sarcomères, moins structurés que les sarcomères du myocyte cardiaque. Les filaments de myosine s'intercalent entre les filaments d'actine, mais les CMLV n'ont pas de ligne Z. On trouve aussi des filaments intermédiaires (desmine et vimentine) qui relient les parties denses pour que la cellule se contracte uniformément (Somlyo and Somlyo 1976, Horowitz, Menice et al. 1996).

1.2.1.2.2 Rôles des CMLV

(a) Phénotype contractile :

Les CMLV, par leur phénotype contractile, jouent un rôle essentiel dans l'ajustement du calibre vasculaire –donc du flux sanguin- à différentes situations normales et pathologiques de la paroi artérielle (LACOLLEY, BABUTY et al. 2008). L'état contractile des CMLV est le résultat d'une haute différenciation acquise par les CMLV qui leur permet d'exprimer tout un ensemble de protéines entrant en jeu dans le mécanisme de contraction de ces cellules. Dans cet état de différenciation, les cellules contractiles sont insensibles aux facteurs mitotiques et rentrent dans un état quiescent. Les récepteurs à l'ET-1, les récepteurs α -adrénergiques, les récepteurs VI de la vasopressine, les récepteurs muscariniques de l'acétylcholine, les récepteurs de la thrombine et les récepteurs du thromboxane activent alors la voie des phosphatidylinositols qui implique une augmentation du niveau de calcium intracellulaire (discutée dans le chapitre suivant), étape nécessaire à la contraction des CMLV. En revanche, la contrainte mécanique appliquée sur des CMLV implique la phosphorylation du PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor) et par la suite l'activation des intégrines membranaires, des canaux cationiques et des protéines G (Shaw and Xu 2003). Le NO, quant à lui, active la guanylate cyclase soluble (Kukovetz, Holzmann et al. 1987). Tous ces facteurs vasoactifs impliquent l'activation des canaux calciques membranaires ou réticulaires, voies qui seront détaillées dans le chapitre suivant. La libération du calcium intracellulaire permet l'interaction entre l'actine et la myosine et par la suite la contraction musculaire (Figure 6) (Horowitz, Menice et al. 1996). A l'inverse, l'activation de la voie GMPc aboutit à la baisse du niveau de calcium libre intracellulaire et donc à la relaxation (Lincoln, Dey et al. 2001).

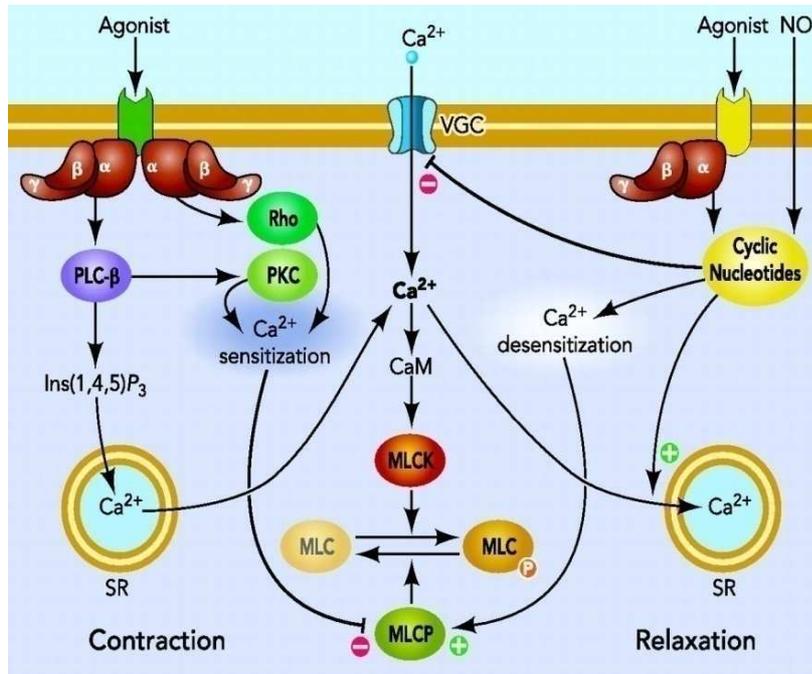


Figure 6 : Mécanismes moléculaires envisagés lors de la contraction et du relâchement des cellules musculaires lisses : la liaison d'un agoniste sur les récepteurs des CMLV induit la variation du niveau de calcium cytosolique et par la suite la variation du niveau de calmoduline activée qui phosphoryle normalement la MLC (myosine light chain) impliquée directement dans le mécanisme de contraction musculaire (Puetz, Lubomirov et al. 2009)

(b) Phénotypes prolifératif et sécrétoire

Le phénotype contractile est le phénotype acquis par défaut par les CMLV. Cependant, sous l'influence de situations particulières le plus souvent pathologiques, en réponse à des agressions, mais aussi dans certains situations physiologiques normales, elles se différencient et acquièrent un phénotype prolifératif et synthétique/sécrétoire, ceci grâce à un complexe système de récepteurs membranaires reliés aux fonctions prolifératives et contractiles. Alors que le phénotype contractile est celui caractérisant une artère bien différenciée, mature et/ou saine, le phénotype synthétique a été observé *in vivo* dans des artères pathologiques et au cours de l'angiogenèse (Campbell and Campbell 1990, Thyberg, Blomgren et al. 1995, Hao, Gabbiani et al. 2003). Le passage d'un état à l'autre est réglé par des signaux mécaniques mais aussi hormonaux et nerveux, qui activent la voie des phosphatidylinositols ou la voie de la GMPc (Figure 7) (Michel, De Roux et al. 1990, Llorens, Perez et al. 2002).

Il s'en suit, après le passage au phénotype synthétique, une perte de l'activité contractile des CMLV par modification de l'appareil contractile qui se réorganise, et les CMLV prennent alors l'apparence de cellules fibroblastiques. De plus, le système synthétique de la cellule représenté par le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi se développe (Thyberg, Blomgren et al. 1995, Bochaton-Piallat and Gabbiani 2005, Matchkov, Kudryavtseva et al. 2012). Suite à la modification structurale des CMLV, celles-ci réacquièrent des propriétés angiogéniques -de prolifération et de migration- qui étaient perdues lorsque celles-ci étaient dans leur état contractile. Ces propriétés sont de plus soutenues par les changements environnementaux de la cellule, à savoir une synthèse accrue de la MEC.

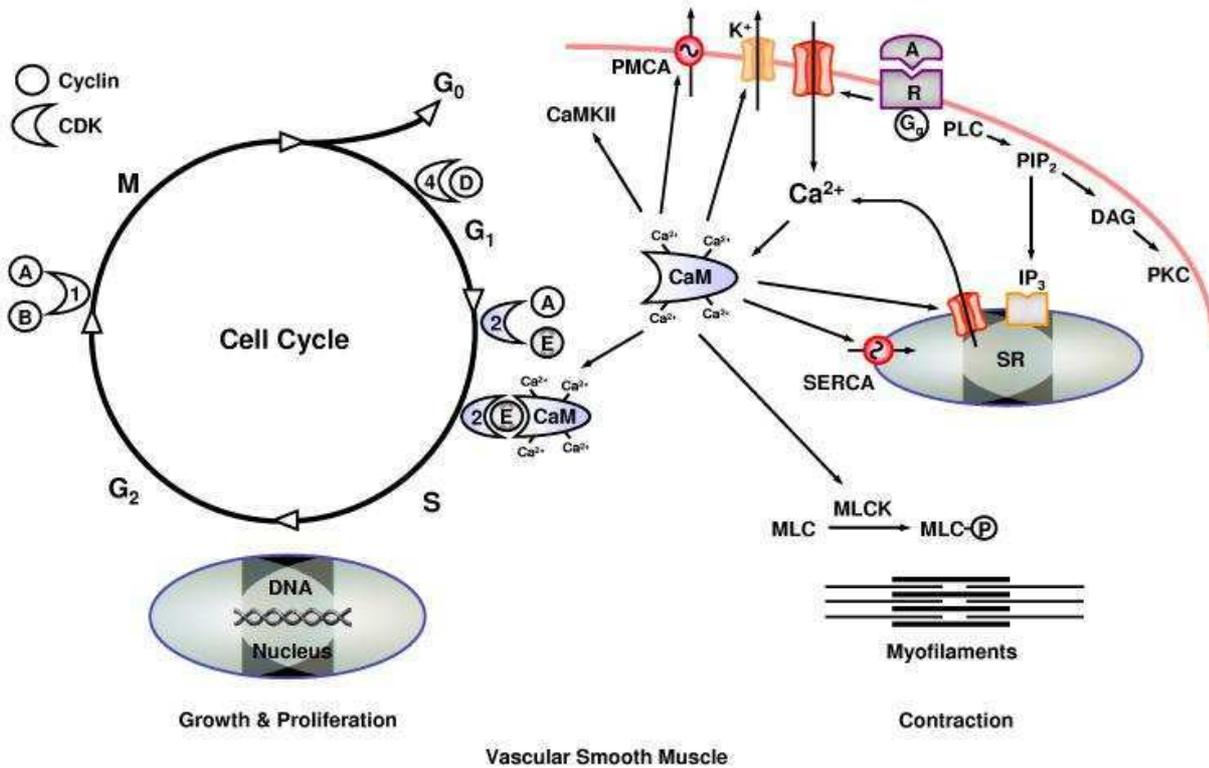


Figure 7 : Mécanisme de chevauchement entre les deux phénotypes contractiles et prolifératif des CMLV. En conditions normales, la liaison ligand (A) - récepteur (B) implique la relargage du calcium, qui se lie alors à la calmoduline et implique par la suite la contraction musculaire. Sous certaines conditions, les CMLV se transforment en acquérant un phénotype indifférencié, et entrent en cycle cellulaire. Dans ce cas, la liaison calmodulin-cyclinE stimule la transition G/S des cellules musculaires (Koledova and Khalil 2006)

1.2.1.3 Les fibroblastes

Les fibroblastes sont principalement localisés à la périphérie des vaisseaux, au niveau de l'adventice. Les fibroblastes sont les cellules caractéristiques du tissu conjonctif. Ce sont des cellules d'origine mésenchymateuse, fusiformes ou étoilées possédant de nombreux prolongements cytoplasmiques. Le fibroblaste possède un noyau ovale ou allongé avec un ou deux nucléoles. Dans le cytoplasme, l'appareil de Golgi est prépondérant et de multiples vésicules de sécrétion sont présentes (Enzerink and Vaheri 2011). La fonction principale des fibroblastes est la synthèse des glycoprotéines et des protéines de la MEC de l'adventice, en particulier les procollagènes, précurseurs du collagène. Ils peuvent aussi synthétiser et sécréter la tropoélastine (Sauvage, Hinglais et al. 1998), des enzymes qui dégradent la MEC et des facteurs de croissance qui stimulent la prolifération cellulaire en particulier le FGF (Fibroblast Growth Factor). Les fibroblastes sont alors responsables du dépôt, du maintien, de la dégradation et du réarrangement de la MEC dans la paroi vasculaire et jouent un rôle important dans les processus de réparation tissulaire ou dans l'entretien des réactions inflammatoires. Ils n'ont pas de fonction

vasomotrice en tant que telle. Pourtant, l'adventice joue un rôle dans la régulation de la vasomotricité par la libération des neurotransmetteurs via les terminaisons nerveuses présentes dans cette tunique du vaisseau (Chang, Chi et al. 2002, Enzerink and Vaheri 2011).

Les fibroblastes passent par différents états d'activation et de différenciation. Ainsi, les fibrocytes, qui ont une faible activité synthétique, se transforment en fibroblastes après stimulation. Sous tension mécanique, les fibroblastes se transforment en proto-myofibroblastes et en myofibroblastes capables de se contracter et de produire une tension mécanique sur les tissus qui les contiennent. C'est le cas dans les tissus en cours de cicatrisation (Botney, Parks et al. 1992). Les fibroblastes expriment des fibres d' α -actine, de la fibronectine et des sites d'adhésion focale (Chang, Chi et al. 2002, McAnulty 2007, Enzerink and Vaheri 2011).

1.2.2 La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un assemblage de macromolécules, de nature protéique et glucidique, qui lient entre elles des cellules homologues ou hétérologues et les organisent en tissu (Jacob 2006). Elle confère à la paroi vasculaire ses propriétés structurales et sert d'ancrage aux cellules de la paroi vasculaire. La MEC protège aussi les cellules, interagit avec elles et joue un important rôle dans leurs modifications et leurs changements phénotypiques en lui fournissant des signaux spécifiques. Ces signaux cellulaires sont divers, il s'agit des molécules de la MEC elles-mêmes, des facteurs de croissance stockés à l'intérieur de la MEC, des neurotransmetteurs, et des molécules paracrines secrétées par les cellules avoisinantes. L'interaction entre les cellules et la MEC est importante dans la régulation des processus de développement qui interviennent pendant l'embryogenèse, le développement post-natal, et lors des réponses aux agressions (Kelleher, McLean et al. 2004). Les composants matriciels sont dégradés par des enzymes protéolytiques secrétées localement par la cellule. La plupart de ces protéases appartiennent à l'une des deux classes suivantes : les métalloprotéases matricielles (MMP) et les sérine-protéases.

Alors que les fibres élastiques, majoritairement dans la média, confère à l'artère son élasticité, les collagènes, majoritairement dans l'adventice, sont responsables des propriétés de résistance des vaisseaux (Rosenbloom, Abrams et al. 1993). Ce sont les deux composants principaux de la MEC, mais d'autres composants sont aussi présents.

1.2.2.1 Les fibres élastiques

Les fibres élastiques sont abondantes dans les tissus extensibles et soumis à des contraintes mécaniques, comme la peau, les artères, les poumons et les ligaments. Dans les vaisseaux sanguins, elles représentent 2 à 4% du poids de tissu sec des artérioles, de 30 à 50% de l'aorte, et jusqu'à 70% au début de l'aorte ascendante. Les fibres élastiques confèrent aux tissus, les artères dans notre cas, des propriétés dynamiques leur permettant de capter, de supporter et de résister au stress mécanique cyclique continu dû à l'onde de pression sanguine. Dans la paroi vasculaire, elles forment des lamelles concentriques séparées par des couches de CMLV. Elles sont composées d'une partie centrale constituée exclusivement d'élastine, représentant 90 % de la fibre élastique mature, et d'un ensemble de microfibrilles entourant

l'élastine (Figure 8). Ces microfibrilles sont composées principalement de molécules de fibrillines associées à de nombreuses autres molécules, comme les lysyl oxydase, des glycoprotéines de structure et des protéoglycanes.

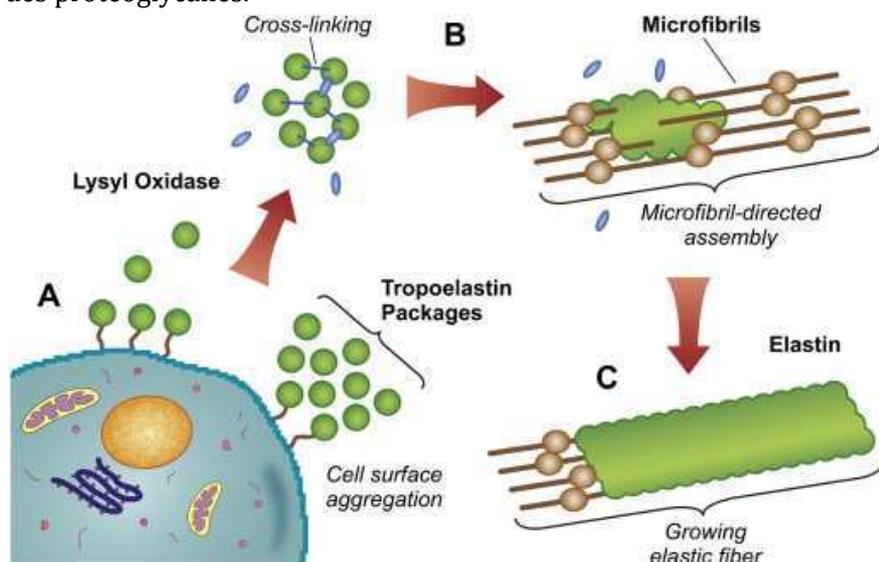


Figure 8 : Formation des fibres élastiques : les molécules de tropoélastine synthétisées par la cellule se lient par des liaisons croisées et se déposent sur les filaments de microfibrilles (Moore and Thibeault 2012).

1.2.2.1.1 L'élastine

L'élastine est le composant majeur des fibres élastiques, celles-ci sont contenant 90% d'élastine et 10% de microfibrilles. L'élastine est une protéine très extensible, qui peut s'étirer jusqu'à au moins 150% de sa longueur au repos avant sa rupture. C'est une protéine insoluble et très résistante aux agents chimiques. Toutefois, certaines enzymes comme les élastases (métalloprotéases, papaïnes, sérines) sont capables d'hydrolyser plus ou moins spécifiquement l'élastine (Bode, Meyer et al. 1989). Son élasticité – c'est-à-dire sa capacité à se distendre sous l'effet d'une force et à revenir à sa dimension initiale lorsque la force ne s'applique plus- est due à son caractère hydrophobe procuré par la présence de nombreux résidus apolaires. De nombreuses études ont permis de révéler les structures primaire et secondaire du monomère précurseur de l'élastine, l'organisation et les changements de conformation du polymère ponté qu'est l'élastine mature, et ont donné lieu à plusieurs modèles concernant l'élasticité de l'élastine (Figure 9) (Vrhovski and Weiss 1998).

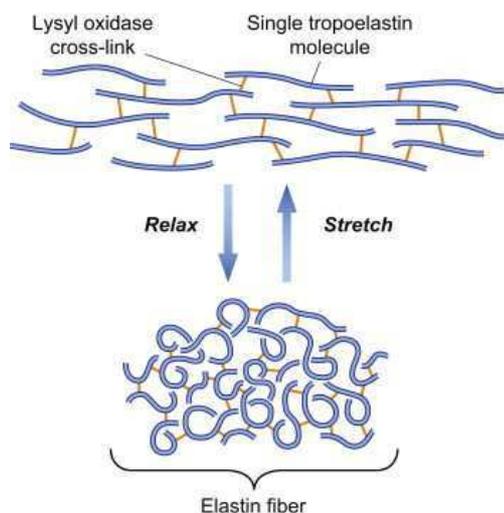


Figure 9 : L'élasticité des fibres élastiques est due à un changement conformationnel des fibres élastiques d'un état relâché à un état étiré (Moore and Thibeault 2012).

(a) Gène et structure de la tropoélastine

Le monomère précurseur de l'élastine est la tropoélastine. Le gène de l'élastine est situé sur le chromosome 7 locus 7q11.23 du génome humain (Fazio, Mattei et al. 1991), et le chromosome 5G1-G2 chez la souris (de Luis, Valero et al. 2000). Il est présent en un seul exemplaire par génome, toutefois, un épissage alternatif des ARNm issus de la transcription du gène lui permet d'avoir une diversité de formes exprimées entre les différents types cellulaires et les différentes situations pathologiques (Bashir, Indik et al. 1989). En outre, l'élastine synthétisée sous forme de tropoélastine, son précurseur, n'est pas encore organisée lors de la sécrétion en fibres élastiques fonctionnelles. Le gène de l'élastine humaine possède 34 exons alors que celui de l'espèce bovine en possède 36, avec 2 exons terminaux en plus, les exons n° 34 et 35 (Vrhovski and Weiss 1998). Malgré les variations entre les espèces, l'exon 36 reste particulièrement bien conservé pour un bon nombre d'espèces (> 70%). Chez l'homme, l'exon 26A est rarement exprimé sauf dans certaines maladies telles que dans l'intima au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire où on observe une énorme synthèse d'élastine par les cellules de l'intima (Liptay, Bauer et al. 1991, Bisaccia, Castiglione-Morelli et al. 1998, Ostuni, Lograno et al. 2002, Tamburro, Bochicchio et al. 2003).

Les molécules de tropoélastine (TE) sont généralement constituées de 750 à 870 acides aminés, avec un poids moléculaire avoisinant les 68kDa. Sa structure primaire complète a été déterminée chez l'Homme et dans d'autres espèces (Vrhovski and Weiss 1998, Debelle and Tamburro 1999). La séquence primaire de la tropoélastine est formée par une alternance de domaines hydrophiles riches en glycine, valine et proline et de domaines hydrophobes riches en résidus alanine et lysine. En fait, cette séquence contient environ 30% de glycine (G), 35 % de proline (P), valine (V), leucine (L) et isoleucine (I) et 20 % d'alanine (A). Les résidus polaires tels que la lysine (K), l'acide aspartique (D), l'acide glutamique (E), l'arginine (R) sont présents en moindre quantité (Indik, Yeh et al. 1987, Raju and Anwar 1987). Les domaines hydrophobes sont formés par une répétition de courts motifs de 3 à 6 acides aminés hydrophobes tels que les séquences GVGVP, GGVP et VGVAPG, alors que les domaines hydrophiles, constituant les régions de

réticulation de la molécule, sont constitués généralement de résidus lysine séparés par deux ou trois résidus alanine tels que AAKAAKAA (Indik, Yeh et al. 1989, Indik, Abrams et al. 1990) (Figure 10).

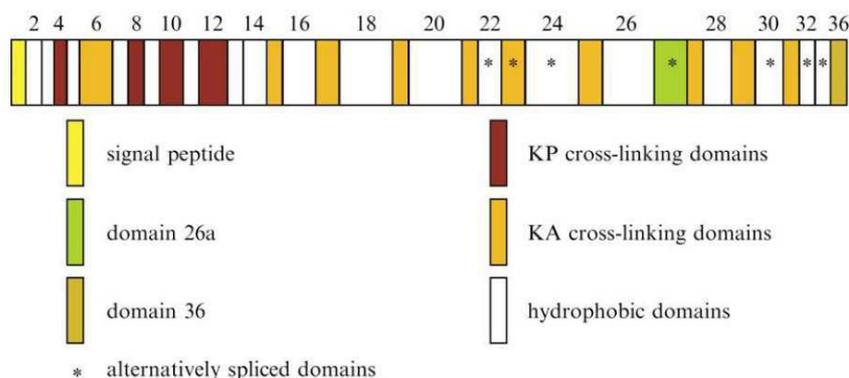


Figure 10 : Les différents domaines de la molécule de la tropoélastine (Mithieux and Weiss 2005).

Malgré sa faible présence, la lysine possède un rôle fonctionnel important au sein de la molécule de la TE : elle permet la formation de liaisons croisées entre les molécules de la TE, qui permettent la formation du polymère d'élastine mature/fibreuse, et d'acquérir ainsi sa fonction élastique. La formation des liaisons croisées passe par une désamination oxydative de la lysine suivie d'une condensation des résidus lysine proches pour former des ponts de réticulations et des liaisons croisées tétrafonctionnelles : il s'agit de la desmosine et l'isodesmosine, deux structures bien spécifiques de l'élastine formées à partir de quatre résidus lysine liés ensemble (Partridge, Elsdén et al. 1964).

(b) Synthèse et sécrétion de la tropoélastine

La synthèse de l'élastine est placée sous le contrôle de plusieurs facteurs environnementaux. L'IGF, le TGF- β et certains ions trivalents, augmentent la synthèse de la TE alors que le b-FGF, le TNF- α , l'AMPc, la vitamine C et la vitamine D diminuent sa synthèse. (Badesch, Lee et al. 1989, Quaglino, Nanney et al. 1990, Hinek, Botney et al. 1991, Kahari, Chen et al. 1992, Kahari, Olsen et al. 1992, Pierce, Kolodziej et al. 1992, Davidson, Zoia et al. 1993, Rosenbloom, Abrams et al. 1993, Wolfe, Rich et al. 1993, Norman, Wysocki et al. 1995, Davidson, LuValle et al. 1997, Debelle and Tamburro 1999, Norman, Moss et al. 2002)).

La synthèse de l'élastine est aussi sous contrôle temporel : elle voit son pic apparaître dans la deuxième moitié de la gestation et à la naissance, et se poursuit en diminuant jusqu'à la fin de l'enfance. Chez la souris, on observe une synthèse de la TE depuis le 14^{ème} jour du développement embryonnaire jusqu'à la fin de la gestation. Un arrêt brutal et transitoire de synthèse est observé dans les 48h suivant la naissance, puis cette synthèse reprend à haut niveau jusqu'au 14^{ème} jour post-natal. Ensuite, une diminution de la synthèse se met en place jusqu'à l'âge adulte, âge à partir duquel elle cesse quasiment. Chez l'Homme, l'expression de la TE débute au deuxième tiers du développement fœtal et se poursuit dans les premières années après la naissance, jusqu'à l'adolescence. Ensuite, la synthèse de la TE est restreinte à des situations physio-pathologiques (Bendeck and Langille 1991, Rosenbloom, Abrams et al. 1993, Davis 1995). La stimulation de la synthèse de TE au cours du développement résulte d'une augmentation de la transcription du gène de la TE (Swee, Parks et al. 1995), alors que la diminution de la synthèse de la TE chez l'adulte est le résultat d'une diminution de la stabilité des ARNm, avec une transcription qui se maintient au même niveau.

Après la transcription du gène de la TE et l'épissage de son ARNm, celui-ci est traduit à la surface du réticulum endoplasmique en une molécule de TE qui est séparée de son peptide signal puis sécrétée à partir de l'appareil de Golgi, via des vésicules sécrétoires, dans l'espace extracellulaire (Damiano, Tsang et al. 1984). La TE est associée à une protéine chaperonne de 67-kDa : il s'agit de l'EBP (elastin binding protein), une protéine possédant une forte affinité pour la TE qui l'escorte depuis le réticulum endoplasmique pour la protéger d'une dégradation par les protéases ou d'une éventuelle auto-coacervation, une agrégation spontanée de plusieurs molécules de tropoélastine (Hinek and Rabinovitch 1994, Hinek 1996). Une fois dans l'espace extracellulaire, l'EBP libère la tropoélastine lui permettant de s'assembler avec d'autres molécules de TE pour se coacerver, première étape dans la formation des fibres élastiques qui sera discutée plus tard. L'EBP ainsi libre va pouvoir : i) soit être recyclée après endocytose pour effectuer à nouveau des missions de navettes de transport/d'exportation d'autres molécules de TE néosynthétisées (Hinek, Keeley et al. 1995), ii) soit s'associer en position périmembranaire avec 2 protéines transmembranaires de 55 et 61kDa correspondant respectivement PPCA (protective protein/cathepsin A) et de Neu-1(neuraminidase-1), pour former le récepteur tri-unitaire de l'élastine (Hinek and Rabinovitch 1994). Ce récepteur, aussi appelé complexe récepteur de l'élastine (ERC) peut également fixer la laminine, d'où son autre dénomination de récepteur de l'élastine-laminine (ELR) (Mecham, Hinek et al. 1989) (Figure 11).

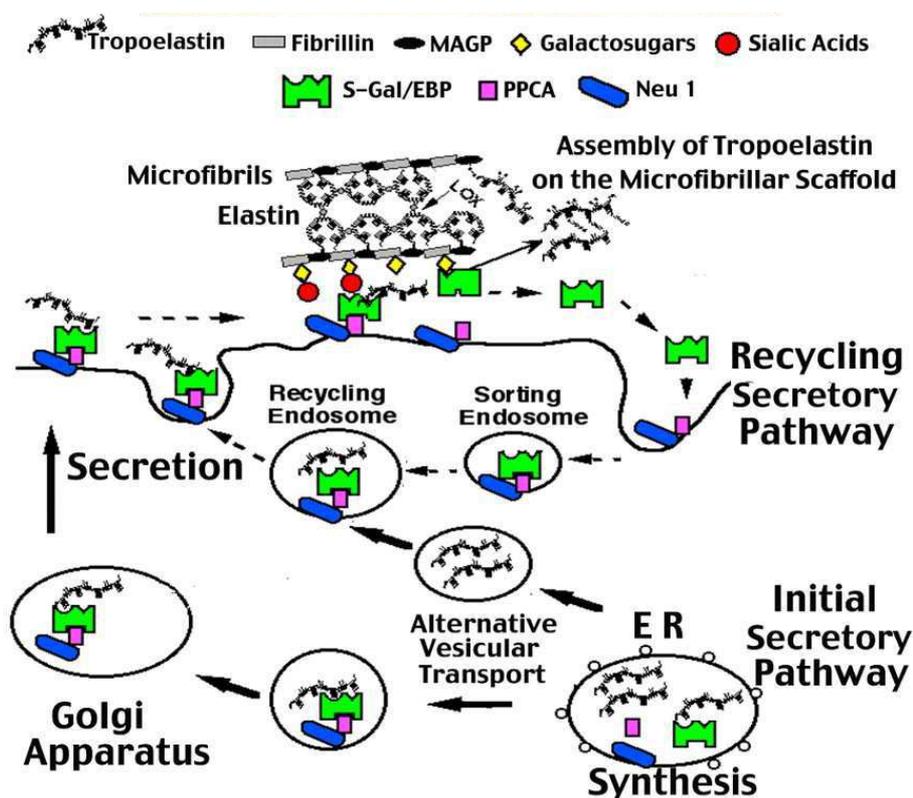


Figure 11 : Les différentes étapes de la synthèse et de la maturation de la tropoélastine. Après synthèse dans le réticulum endoplasmique, les molécules de tropoélastine sont transportées par l'appareil de Golgi ou par des endosomes pour être sécrétées dans l'espace extracellulaire où elles formeront les fibres élastiques *via* un mécanisme complexe décrit plus loin. PPCA, Neu 1: neuraminidase-1, PPCA: protective protein cathepsin A, EBP: elastin binding protein (Hinek 1996).

1.2.2.1.2 Les microfibrilles

Dans les fibres élastiques, les microfibrilles constituent une charpente sur laquelle se déposent les molécules de TE. Alors que l'élastine est apparue chez les vertébrés au cours de l'évolution, les microfibrilles sont des assemblages de protéines très conservées depuis les invertébrés. Dans les espèces dépourvues d'élastine, les microfibrilles sont responsables de l'élasticité des vaisseaux. Chez les vertébrés, les microfibrilles participent avec l'élastine à l'élasticité des vaisseaux. Par ailleurs, dans les zonules des yeux par exemple, l'élastine est absente et les microfibrilles sont les seuls responsables de l'élasticité et aident à maintenir le cristallin en équilibre dynamique (Wallace, Streeten et al. 1991, McConnell, DeMont et al. 1997, Lillie, David et al. 1998, Faury 2001, Wang, Lu et al. 2009). La fibrilline-1 et la fibrilline-2 sont les principaux composants des microfibrilles, mais beaucoup d'autres protéines y sont aussi associées.

(a) Les fibrillines :

Les fibrillines sont codées chez l'Homme par 3 gènes différents codant pour 3 formes différentes de la fibrilline : les fibrilline-1, -2 et -3. Ces gènes sont respectivement situés respectivement sur les chromosomes 15, 5 et 19 chez l'Homme, et sur les chromosomes 2 et 18 chez la souris (le gène de la fibrilline-3 est absent chez la souris), alors que le gène de la fibrilline-3 est absent chez les rongeurs mais est présent chez la vache et la poule (Sakai, Keene et al. 1986, Lee, Godfrey et al. 1991, Pereira, D'Alessio et al. 1993, Zhang, Apfelroth et al. 1994, Kielty, Wess et al. 2002, Corson, Charbonneau et al. 2004, Wagenseil and Mecham 2007).

Chaque fibrilline est exprimée pendant une étape précise de la vie. La fibrilline-3 voit son expression limitée aux étapes précoces du développement fœtal. La fibrilline-2 est exprimée pendant les stades embryonnaires alors que l'expression de la fibrilline-1 continue au stade adulte. Les 3 isoformes de fibrilline présentent entre elles une forte homologie en acides aminés (~60%) malgré la présence de leur gène sur des chromosomes différents (Zhang, Hu et al. 1995, Charbonneau, Dzamba et al. 2003, Corson, Charbonneau et al. 2004, Kelleher, McLean et al. 2004, Hubmacher, Tiedemann et al. 2006).

Les fibrillines sont des glycoprotéines de grande taille allant jusqu'à 350 kDa. Elles sont composées d'une répétition de domaines protéiques (Figure 12). Les domaines EGF (Epidermal Growth Factor) sont présents 46 à 47 fois, dont 42 à 43 domaines lient le calcium (domaines cbEGF, pour calcium-binding EGF). Ces domaines permettent à la protéine, en présence de calcium, d'adopter une structure en bâtonnet. A côté des domaines EGF, 7 domaines de liaison du TGF-beta (domaines TB) sont présents dans la molécule de la fibrilline et s'intercalent avec les domaines EGF. Ces domaines présentent 8 résidus cystéine d'où leur appellation domaine 8-cys. Le quatrième domaine TB des trois isoformes de la fibrilline contient le motif Arg-Gly-Asp (RGD) qui est un motif de liaison aux intégrines. Les fibrillines-2 et -3 possèdent un motif RGD supplémentaire situés respectivement sur le troisième domaine TB (TB3) et sur cbEGF 19 (Lee, Knott et al. 2004), (Corson, Charbonneau et al. 2004, Hubmacher, Tiedemann et al. 2006). Du côté N-terminal de la protéine, deux domaines hybrides sont présents. Le domaine hybride est en fait une fusion des domaines EGF et TB. D'autres domaines spécifiques de chaque isoforme sont encore présents, comme le domaine riche en proline dans la fibrilline-1, celui riche en glycine de la fibrilline-2 et

celui riche à la fois en proline et en glycine de la fibrilline-3 (Neptune, Frischmeyer et al. 2003, Chaudhry, Cain et al. 2007).

Après la transcription du gène de la fibrilline, l'ARNm fibrilline est traduit en une profibrilline de 350 kDa au niveau du réticulum endoplasmique (RER) qui subira des modifications au niveau du RER et de l'appareil de Golgi. Elle subit aussi une maturation par clivage via la famille de la convertase furine/PACE du côté C-terminal, au niveau du site RGRKRR, pour aboutir à une fibrilline de 330kDa. Une fois mature, la fibrilline est excrétée dans l'espace extracellulaire, où elle va s'assembler et s'associer à d'autres molécules pour former les microfibrilles (Ritty, Broekelmann et al. 1999, Reinhardt, Ono et al. 2000).

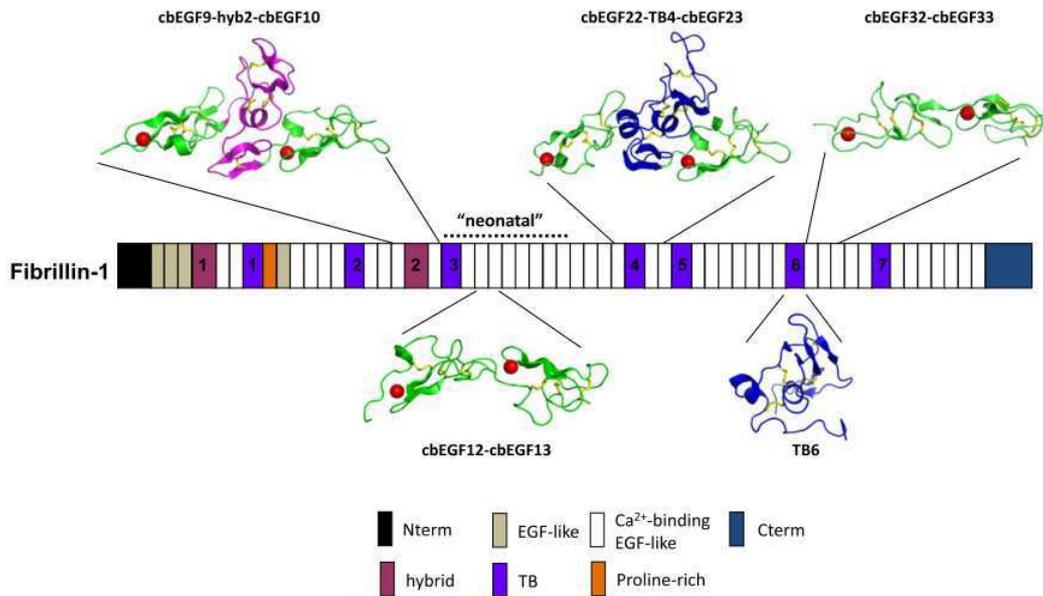


Figure 12: Les différents domaines de la molécule de Fibrilline-1 (Jensen, Robertson et al. 2012).

(b) Les autres composants des microfibrilles

Les microfibrilles ont un aspect structural en collier de perle, dû à l'organisation particulière de ses différents constituants. Outre les fibrillines, d'autres protéines sont associées aux microfibrilles et aux fibres élastiques (Figure 13) :

Les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGP) sont de petites protéines localisées sur les microfibrilles. On en trouve 2 isoformes au niveau de la MEC, la MAGP-1 et la MAGP-2. Elles interviendraient dans l'assemblage des microfibrilles et durant la coactivation de l'élastine (Stenina 2003), (Girardot, Monnier et al. 2004)

Les Emilines (elastin microfibril interface located protein) sont des glycoprotéines distribuées à l'interface entre l'élastine et les microfibrilles, où elles jouent un rôle important au niveau vasculaire (Grote 2003) (Colombatti et al., 1985, 2000). Elles sont impliquées dans l'élastogénèse, dans la maintenance de la morphologie des cellules vasculaires et dans le contrôle de l'homéostasie vasculaire (Zanetti et al. 2004, Lorenzon et al., 2011). En particulier, au niveau de la média, les molécules d'émiline-1

représentent des sites d'interaction entre les fibres élastiques et les cellules musculaires lisses vasculaires (Daga-Gordini et al.,1987). De même, les émilines sont capables d'interaction avec des protéines essentielles de la MEC comme le proTGF- β 1 -intervenant dans sa maturation- et le récepteur du VEGF, en réduisant son activité (Lorenzon et al.,2011 ; Zacchigna et al., 2006).

Les Fibulines interagissent au niveau de la liaison entre les fibres élastiques et les cellules. En effet, ces protéines possèdent des motifs RGD se liant aux intégrines. Elles possèdent aussi un domaine EGF-like permettant la liaison avec l'élastine. Parmi les 5 membres de la famille des fibulines, 3 sont associées aux fibres élastiques : fibuline-1, -2 et -5 (Stenina 2003).

Les protéines de la famille des "latent TGF- β -binding proteins" (LTBPs) sont colocalisées et associées aux microfibrilles. Ce sont des protéines qui fixent le TGF- β , elles possèdent le domaine de liaison TB et font ainsi partie de la superfamille des fibrillines, qui sont les seules protéines possédant le domaine TB (Sinha, Nevett et al. 1998, Oklu and Hesketh 2000, Sinha, Heagerty et al. 2002).

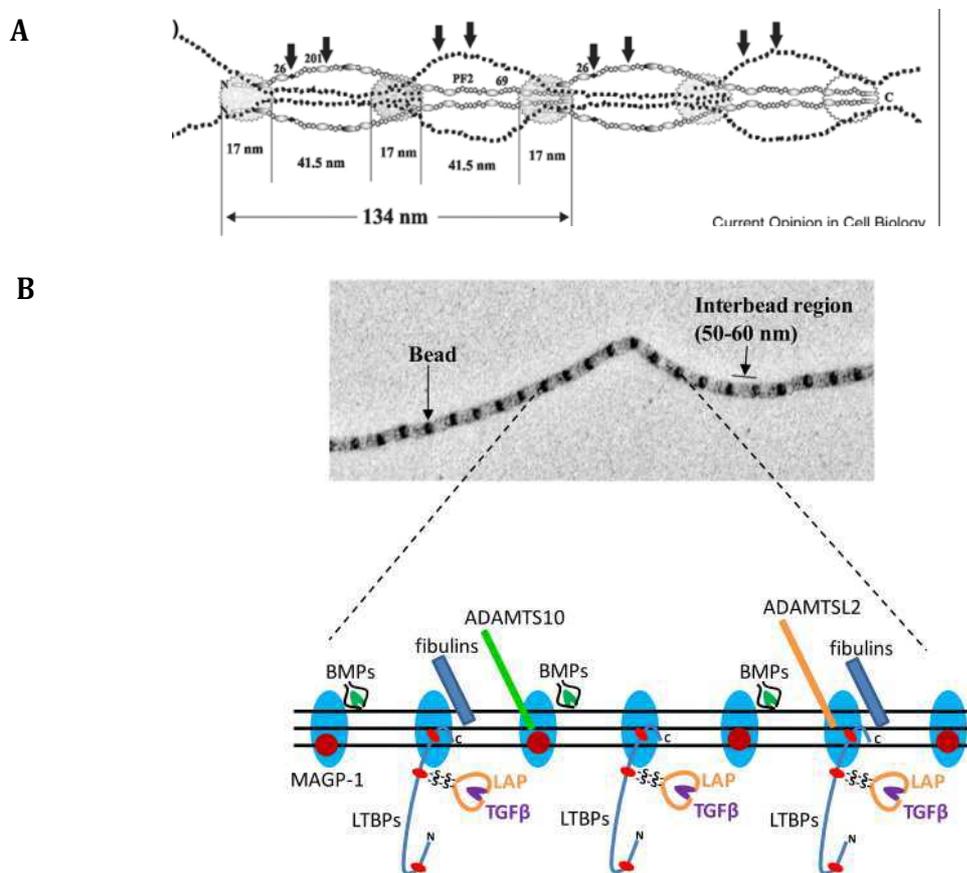


Figure 13: Structure des microfibrilles sous microscopie électronique, les molécules des fibrillines sont associées à des molécules sur des domaines précis de façon à former des microfibrilles correctement arrangées. A : Modèle proposé de la structure des microfibrilles B : Visualisation sous microscopie électronique des microfibrilles et schéma explicatif du modèle des microfibrilles. BMP : bone morphogenetic microfibrils, LAP : latency-associated propeptide, ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs, une famille des peptidases. Adapté de (Vakonakis and Campbell 2007, Jensen, Robertson et al. 2012).

1.2.2.1.3 Formation des fibres élastiques

La formation des fibres élastiques se déroule en plusieurs étapes : la formation des microfibrilles, puis la coacervation et la fixation des molécules de TE et enfin la maturation des fibres élastiques.

Les fibrillines, une fois matures et excrétées dans l'espace extracellulaire, vont s'assembler pour former des microfibrilles tout en s'associant aux autres protéines. Cet assemblage se déroule à proximité de la cellule. Il se déroule en plusieurs étapes: l'auto-assemblage des fibrillines, la formation de liaisons croisées et la maturation des microfibrilles. Les molécules de fibrilline-1 vont tout d'abord s'associer entre elles, via l'interaction avec les intégrines cellulaires et les héparanes sulfates, en établissant des liaisons Nter-Cter, encore appelées interactions tête à queue ou head to tail. Il s'en suit la formation des polymères de fibrillines (Pfaff, Reinhardt et al. 1996, Sakamoto, Broekelmann et al. 1996, Bax, Bernard et al. 2003, Cain, Baldock et al. 2005, Bax, Mahalingam et al. 2007). Une fois les fibrillines associées, elles établissent ensemble des liaisons croisées dans le but de conférer une stabilité mécanique aux microfibrilles (Figure 14). Deux types de liaisons ont été identifiés : les ponts disulfures entre les cystéines de plusieurs fibrillines, et des liaisons croisées entre les résidus lysine catalysées par des transglutaminases entre les fibrillines, en impliquant les MAGP-1 (Brown-Augsburger, Broekelmann et al. 1994, Thurmond and Trotter 1996, Reinhardt, Gambee et al. 2000). Enfin, s'ensuit la maturation des microfibrilles, qui consiste à associer d'autres molécules au squelette déjà formé des microfibrilles.

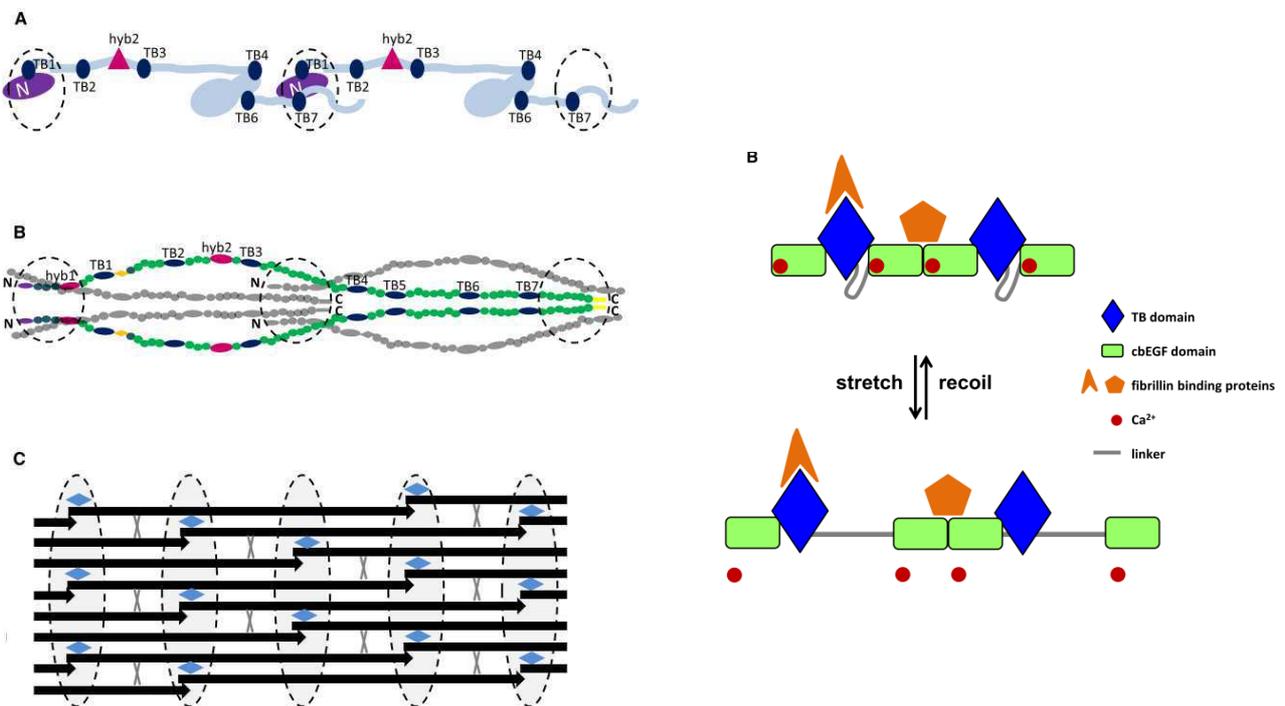


Figure 14: Distensibilité des microfibrilles. Les microfibrilles, suivant les situations, peuvent adopter une forme relâchée ou une forme tendue et assurer ainsi l'élasticité du tissu dans lequel elles se trouvent. Les liaisons croisées établies entre les molécules de fibrilline assurent une stabilité mécanique des microfibrilles lorsque celles-ci se distendent ou se tendent. Adapté de (Jensen, Robertson et al. 2012).

De leur côté, les molécules de TE, une fois secrétées dans l'espace extracellulaire, vont aussi s'associer entre elles avant de rejoindre le squelette des fibres élastiques. Il s'agit de la coacervation de l'élastine : une fois séparée de l'EBP, une molécule de TE va pouvoir s'assembler spontanément avec une TE voisine via une interaction entre les domaines hydrophobes. Après transition du monomère N-ter, les monomères se concentrent, s'alignent et coalescent (se lient) de façon irréversible en une structure fibrillaire, ce qui va optimiser leur polymérisation ultérieure (Narayanan, Page et al. 1978, Hinek and Rabinovitch 1994, Jensen, Vrhovski et al. 2000).

Après la synthèse et l'assemblage des microfibrilles à proximité des cellules ainsi que la synthèse de la tropoélastine et sa coacervation, la tropoélastine est organisée en agrégats pontés (cross-links) par les enzymes de la famille des lysyl oxidases (LOX) qui réalisent des pontages entre les molécules de TE. La lysyl oxydase (LOX) et, les lysyl oxidase-like ou LOXL sont des enzymes qui catalysent les pontages entre les molécules de tropoélastine. Ce sont des amines oxydases exprimées et sécrétées par les CMLV et les fibroblastes. Elles catalysent l'oxydation de résidus lysine. Le groupement amine de la lysine est oxydé en un aldéhyde réactif. L'aldéhyde réactif peut spontanément se condenser avec un autre aldéhyde ou une amine d'une autre protéine pour produire des pontages inter- et intra-peptidiques. (Smith-Mungo and Kagan 1998, Kagan and Li 2003). Les substrats les plus connus de la LOX sont le collagène et l'élastine. Toutefois, d'autres substrats peuvent exister encore. (Kagan, Williams et al. 1984, Kirschmann, Seftor et al. 2002, Kagan and Li 2003, Hayashi, Fong et al. 2004, Payne, Fogelgren et al. 2005). Le mécanisme de pontage médié par LOX et LOXL implique la formation de desmosines et d'isodesmosines qui permettent de lier de façon covalente les molécules de TE entre elles et de former ainsi une structure linéaire stable et insoluble : il s'agit de l'élastine polymérisée ou élastine fibreuse.

Ces agrégats d'élastine ainsi formés restent accrochés à la surface cellulaire le temps que d'autres molécules de TE viennent s'associer à eux, pour être ensuite transférés sur les microfibrilles déjà formées. Cette étape implique plusieurs molécules associées aux microfibrilles comme les fibulines 4 et 5 (Figure 15). Il en résulte une structure complexe formée d'un coeur d'élastine entouré par des microfibrilles sur toute sa longueur. Plusieurs assemblages d'élastine ainsi formés sont liés par les enzymes de la famille LOX pour former finalement les fibres élastiques complètes et fonctionnelles, dites matures (Kozel, Rongish et al. 2006, Wagenseil and Mecham 2007).

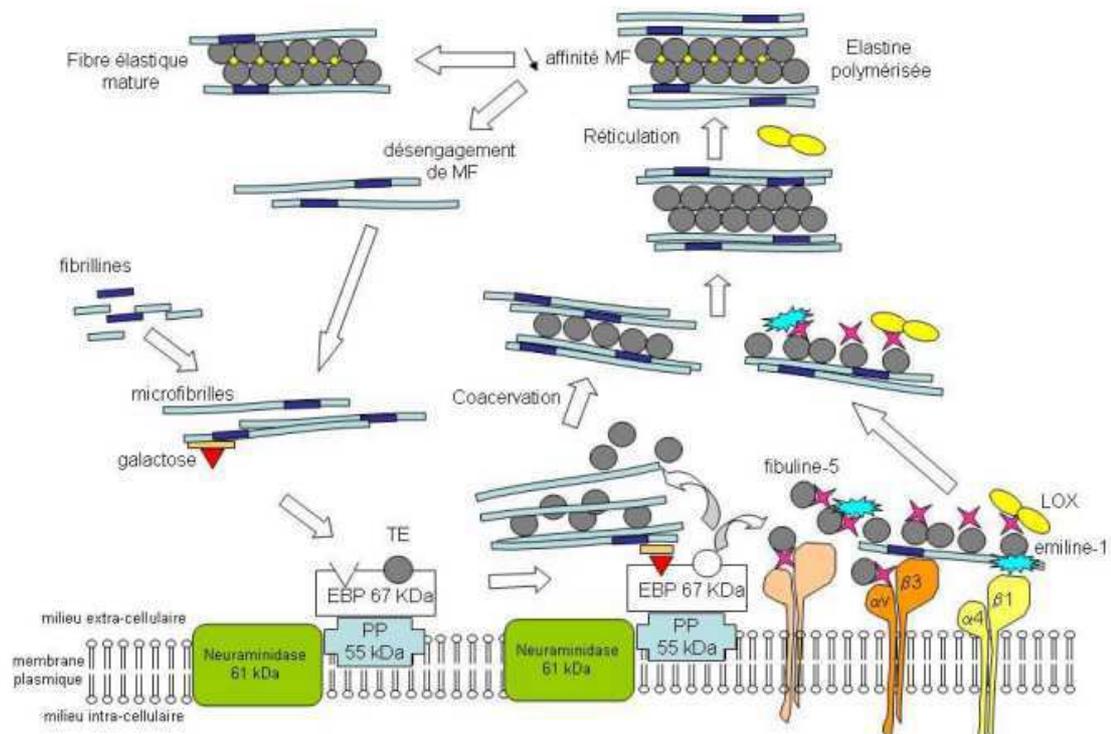


Figure 15: Les différentes étapes de la maturation des fibres élastiques. La tropoélastine (TE) est sécrétée à l'espace extracellulaire associée à une protéine chaperonne EBP, dont elle est dissociée après interaction avec les microfibrilles (MF) et avec d'autres molécules telles que la fibuline-5, la protéine EMILIN-1 et la lysyl oxydase. Les intégrines présentes à la surface cellulaire interviennent aussi dans ce processus d'assemblage. La coacervation (auto-assemblage) des molécules de tropoélastine et leur fixation sur le squelette de MF facilitent leur polymérisation sous l'action de la lysyl oxydase. Les MF sont ensuite progressivement repoussées à l'extérieur des fibres élastiques. Elles se désengagent alors et deviennent disponibles pour des nouvelles molécules de tropoélastine. (Pezet, Mariko et al. 2009).

1.2.2.2 Les autres composants de la matrice extracellulaire

Outre les fibres élastiques, d'autres composants se retrouvent dans la MEC des parois vasculaires (Tableau 2).

1.2.2.2.1 Le collagène

Les fibres de collagène, beaucoup plus rigides que les fibres élastiques, sont impliquées dans la limitation de l'étirement. Elles sont constituées de multiples molécules de collagène. Chaque molécule de collagène est composée de trois chaînes polypeptidiques appelées chaînes- α , identiques ou pas, pour former des structures homo ou hétérotrimériques. Ces molécules de collagène se lient entre elles par des liaisons hydrogènes et des liaisons covalentes. Il existe 27 différents types de collagènes qui sont classés en deux groupes : les collagènes fibrillaires et les collagènes non-fibrillaires. Les collagènes fibrillaires sont les collagènes de type I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII, les collagènes V, XI, XXIV et XXVII étant moins abondants que les trois autres types. Dans ces collagènes, les triples hélices s'agencent de façon parallèle,

et s'associent entre elles pour former des fibrilles hétérotypiques, c'est à dire composées de plusieurs types de collagène. Au niveau vasculaire, on retrouve surtout les collagènes de types I, III et V associés dans la même fibrille (Brodsky and Persikov 2005, Okuyama 2008, Shoulders and Raines 2009)

Dans les collagènes non-fibrillaires, les triples hélices ne s'associent pas de façon parallèle et décalée. Ils sont nombreux mais les collagènes de type XII, XIV, IV, VI et VIII sont les seuls présents au niveau vasculaire. En particulier, les collagènes de type IV, VI et VIII se trouvent dans la MEC synthétisée par les cellules endothéliales. Ces collagènes ne forment pas de fibrilles mais des feuillets ou des réseaux (van der Rest and Garrone 1991, Birk, Burstein et al. 2005, Canty and Kadler 2005).

1.2.2.2 Les glycoprotéines

Les principales glycoprotéines de structure de la MEC vasculaire, sont les fibronectines, les laminines, les thrombospondines, l'entactine/nidogène, les ténascines et l'ostéopontine. Elles sont capables de s'auto-associer et de s'associer aux autres protéines de la MEC, et d'interagir avec les cellules par l'intermédiaire des intégrines. Ces protéines semblent être impliquées dans la régulation du remodelage tissulaire, de la morphogénèse et de la croissance des vaisseaux (Yamada 1983).

La fibronectine (FN) associée à la MEC est un polymère insoluble synthétisé par la plupart des cellules mésenchymateuses comme les CMLV et les fibroblastes. Elle est capable d'interagir avec la transglutaminase plasmatique/facteur XIIIa, la fibrine, l'héparine et les collagènes et porte la séquence RGD (Arg-Gly-Asp) capable d'interagir avec les intégrines. La quantité de fibronectine augmente dans la paroi artérielle dans le cas de l'hypertension artérielle (Singh, Carraher et al. 2010, Labat-Robert 2012). **La vitronectine** est une glycoprotéine de 75 kDa à la fois présente dans le plasma sanguin et dans la MEC de nombreux tissus, en particulier les tissus lésés (Dvorak, Detmar et al. 1995, Schvartz, Seger et al. 1999). Elle peut adopter deux conformations, une fermée dans le plasma sanguin, et une étendue dans la MEC. Elle contient la séquence RGD qui peut se lier à plusieurs intégrines, et fournit ainsi un support à l'étalement et à la migration cellulaire (Stefansson, Lawrence et al. 1996, Andreasen, Kjoller et al. 1997, Kjoller, Kanse et al. 1997). Elle est aussi capable de lier, en compétition sur un même site de liaison, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type I (PAI-1), la vitronectine dans ses 2 conformations et le récepteur de l'activateur de plasminogène du type urokinase (uPAR), qui se lie à la vitronectine seulement dans sa conformation étendue. Par ces capacités d'interaction, la vitronectine participe à la régulation de la coagulation (Felding-Habermann and Cheresch 1993, Deng, Curriden et al. 1996).

Les laminines sont les composants non collagéniques majoritaires et ubiquitaires des lames basales où elles sont assemblées en polymères et interagissent avec différentes protéines de la MEC telles que le collagène IV, le nidogène-1, l'héparane-sulfate. Elles interagissent également avec les cellules via les intégrines (Belkin and Stepp 2000) ou l'EBP (Privitera, Prody et al. 1998). Elles jouent un rôle essentiel dans le remodelage vasculaire à travers la formation de la lame basale et la régulation de la fonction de la cellule endothéliale (Grant, Tashiro et al. 1989).

Le **perlécane** est exprimé dans toutes les membranes basales. Il se lie à des facteurs de croissance et interagit avec diverses protéines de la MEC et des molécules d'adhésion cellulaires. Il est crucial pour le maintien de l'intégrité des lames basales (Knox and Whitelock 2006).

Les **thrombospondines (TSP)** sont produites par les plaquettes et interagissent avec de nombreuses protéines du plasma, comme le fibrinogène et le plasminogène, avec des protéines de la MEC, ainsi qu'avec la forme latente du TGF- β qu'elles peuvent activer (Crawford, Stellmach et al. 1998). Elles agissent plutôt comme des modulateurs des interactions des cellules avec la MEC.

Les **nidogènes** sont des composants ubiquitaires des membranes basales et servent de lien entre la laminine-1 et le collagène IV. Ces molécules jouent aussi un rôle majeur durant l'embryogenèse.

Les **ténascines** sont des régulateurs de l'interaction cellules-matrice, du métabolisme cellulaire et de la transition épithélium/mésenchyme (Ho, Bose et al. 2008, Midwood, Hussenet et al. 2011).

L'**ostéopontine** interagit avec les intégrines. Elle intervient dans les mécanismes de survie cellulaire, de prolifération, de réparation tissulaire, en particulier de l'endothélium, et l'angiogenèse (Bayless, Meininger et al. 1998, Denda, Muller et al. 1998).

1.2.2.3 Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG) sont formées d'une chaîne polypeptidique sur laquelle sont attachés un ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAG) (Ruoslahti 1988). La chaîne polypeptidique, de taille allant de 11 à 220kDa, est fabriquée par les ribosomes liés à la membrane du réticulum endoplasmique, puis les chaînes polysaccharidiques sont principalement assemblées dans l'appareil de Golgi, 1 à 100 GAG peuvent se fixer sur la protéine porteuse.

Les PG sont identifiés par le type prédominant de GAG qu'ils portent : chondroïtine-sulfate, dermatane-sulfate, héparane-sulfate, kératane-sulfate. Dans les vaisseaux sanguins, les PG sont fortement impliqués dans le développement vasculaire à travers plusieurs mécanismes comme l'adhésion des cellules vasculaires, la liaison des cytokines et le contrôle de la coagulation (Iozzo and San Antonio 2001). Les GAG sont chargés très négativement et ils peuvent fixer de nombreuses molécules d'eau, cette hydratation permettant au tissu vasculaire, en captant et en libérant des molécules d'eau, de s'adapter aux changements de pression dans la MEC (Prydz and Dalen 2000). Plusieurs molécules de la MEC telles que la fibronectine, les collagènes, la laminine possèdent des sites de liaison de forte affinité avec les GAGs (Koda and Bernfield 1984, Martin and Timpl 1987, Ruoslahti 1988). Les facteurs de croissance tels que l'EGF, le FGF, le VEGF, et le TGF- β 1 possèdent des sites de liaison de forte affinité pour les protéoglycanes à héparane-sulfate, et régulent ainsi le développement vasculaire (Higashiyama, Abraham et al. 1991, Yayon, Klagsbrun et al. 1991, Gitay-Goren, Soker et al. 1992, Lyon, Rushton et al. 1997). Enfin, il a été montré que plusieurs protéoglycanes interagissent avec les microfibrilles et les fibres élastiques. Les SLRPs (small leucine-rich repeat proteoglycans), la décorine et le biglycane et le versicane sont des protéoglycanes associés aux microfibrilles et au noyau d'élastine des fibres élastiques, qui participent à la formation des fibres élastiques (Reinboth, Hanssen et al. 2002).

Major classes of ECM Family	Domain structure	ECM Protease	In production	
			Small mol	Bio-pharm
Chondroitin sulfate proteoglycan	IG LINK LINK EGF C-LECTIN SUSHI	ADAMTS MMP		1
Collagen – fibrillar	VWC/TSPN COLLAGEN COLF1	ADAMTS BMP1/TLL MMP PCSK		1
Collagen – FACIT	VWA FN3 TSPN COLLAGEN	MMP		
Collagen – other	type IV basement membrane transmembrane/anchoring multiplexin short chain COLLAGEN TM COLLAGEN COLLAGEN Endostatin COLLAGEN C1Q	ADAM BMP1/TLL MMP PCSK		3
Fibronectin	FN1 +5 FN2 FN2 FN1 +2 FN3 +16 FN1 +2	PCSK		1
Fibrillin	EGF +2 EGF-CA EGF-CA EGF-CA +40	MMP PCSK		
Fibulin	ANATO +2 EGF EGF-CA +7 EGF	MMP		
Glypican	GPC TM			1
Integrin	α P-prop +3 A-DOM β -prop +4 TM β PS1 I-DOM EGF +3 TM		13 (3)	17 (3)
Laminin	α LAMN EGF +4 LAMA EGF +10 LAMA EGF +2 LAMG +4 β LAMN EGF +3 LAMB EGF +8 γ LAMN EGF +4 LAMA EGF +5	BMP1/TLL MMP		
Latent TGF β binding protein	EGF-CA +13 EGF EGF-CA	BMP1/TLL MMP		
Link protein	IG LINK LINK	MMP		
Matrilin	VWA EGF VWA EGF	ADAMTS		
Microfibrillar associated protein	MFAP			
Perlecan	SEA LDLA +3 IG LAMB EGF +2 LAMB EGF EGF LAMB EGF +2 IG +19 LAMG EGF +2 LAMG EGF EGF LAMG	MMP		
Small leucine rich proteoglycan	LRRS LRRT +1 LRRS LRRT +1 LRRS LRRT +1 LRRS LRRT +1	BMP1/TLL		
Syndecan	SDCTM	BMP1/TLL		
Tenascin	EGF +14 FN3 +14 FNC	MMP	1	
Thrombospondin	TSPN VWC TSPI +2 EGF EGF-CA EGF TSPIII +7 TSPC	ADAMTS MMP		
Vitronectin	SO +X +X +X +X	MMP		

Drug Discovery Today

Tableau 2 : Les principales familles de molécules de la MEC autres que l'élastine (Huxley-Jones, Foord et al. 2008).

1.2.2.3 Dégradation de la matrice extracellulaire

La MEC n'est pas statique ; elle subit constamment une dégradation par des protéases. Cette dégradation joue un rôle essentiel dans le remodelage vasculaire, qu'il ait lieu dans les processus physiologiques de néovascularisation, au cours de la croissance, ou dans les pathologies vasculaires comme la croissance tumorale, l'arthrite ou l'hypertension artérielle.

Les protéases sont classées en deux catégories: les exopeptidases et les endopeptidases. Les exopeptidases dégradent les sections terminales de la protéine, alors que les endopeptidases s'attaquent à des régions internes de la protéine. Les endopeptidases sont les principales enzymes dégradant les protéines de la MEC. Elles sont classées en fonction de leur mécanisme de dégradation et de leur site d'activité. On dénombre quatre familles d'endopeptidases (Barrett 1994, Barrett and Rawlings 1995) : les aspartate-endopeptidases, les métalloprotéinases (MMP), les sérine-protéases, les cystéine-protéases mais seules les métallo-, sérine- et cystéine-protéinases peuvent agir sur la MEC. Les produits de dégradation de l'élastine et des collagènes, aussi appelés matrikines, ont des rôles biologiques propres :

ils modulent la prolifération et la migration cellulaire ainsi que la production de protéases (Maquart, Bellon et al. 2005).

1.2.2.3.1 Les sérine-protéases

Les sérine-protéases agissent à travers une triade catalytique formée par un résidu sérine (par son groupement hydroxyle), une histidine et un acide aspartique (Warshel, Naray-Szabo et al. 1989, Barrett 1994). La famille des sérine-protéases comporte des enzymes digestives (trypsine, élastases pancréatiques), des facteurs de coagulation (thrombine, kallikréine), la plasmine -un facteur de fibrinolyse qui, secrétée sous forme de plasminogène, est activée par d'autres sérine-protéases-, et les activateurs du plasminogène de type urokinase (uPA) et tissulaire (tPA). En plus de son rôle dans la fibrinolyse, la plasmine interagit aussi dans la dégradation de la MEC, en particulier dans la dégradation de la fibronectine, de la laminine, de la TSP, et du TGF- β (Liotta, Goldfarb et al. 1981, Bonnefoy and Legrand 2000). Par ailleurs, les éléments du système fibrinolytique (les activateurs du plasminogène, la plasmine) jouent un rôle dans l'activation de certaines pro-métalloprotéinases et sont ainsi impliqués indirectement dans la dégradation de la MEC (Lijnen, Van Hoef et al. 1998, Lijnen 2001).

1.2.2.3.2 Les cystéine-protéases

Les cystéine-protéases possèdent une cystéine dans leur site actif, avec une histidine. Elles sont aussi appelées protéases à thiol en raison de la présence du groupement thiol de la cystéine qui représente le nucléophile actif de l'enzyme (Barrett 1994). Elles sont divisées en deux superfamilles : i) les enzymes reliées à l'enzyme de conversion de l'interleukine β 1 et ii) la superfamille des papaines qui regroupe entre autres les enzymes lysosomales cathepsines B, H, L et S, qui fonctionnent au niveau du lysosome à pH acide. Au niveau de la MEC, les cathepsines présentent un potentiel élevé de dégradation de la MEC, même si à pH neutre ces enzymes sont instables : par exemple, à pH 7,4, la cathepsine K est plus efficace que la MMP-9 pour dégrader l'élastine (Chapman, Kane et al. 1997). Aussi, les cathepsines S et L, qui dégradent le collagène, voient leur expression augmenter dans l'athérosclérose et l'insuffisance cardiaque (Maciewicz and Etherington 1988, Sukhova, Shi et al. 1998, Cheng, Obata et al. 2006).

1.2.2.3.3 Les métallo-protéinases :

Les métalloprotéinases possèdent un cation métallique fortement fixé à la protéine sur une séquence de plusieurs acides aminés. Ce cation métallique intervient directement pour activer une molécule d'eau qui clive la chaîne peptidique du substrat. Les métalloprotéinases sont classées en 5 familles selon la séquence des acides aminés du site catalytique. Pour 4 familles sur 5, la séquence des acides aminés permet la fixation du zinc, c'est la séquence Histidine-Glutamate-X-X-Histidine (HEXXH), dans laquelle les 2 histidines lient le zinc et le glutamate polarise la molécule d'eau sur le zinc (Hooper 1994, Stocker and Bode 1995). Une de ces 5 familles s'avèrent la plus répandue, c'est la famille des metzincines, dont la séquence d'acides aminés est HEXHXXGXXHZ. Ils sont subdivisés en 5 sous-familles selon la nature de l'acide aminé Z : les serralysines (Z est une proline), les pappalysines (Z est une valine), les astacines (Z est un glutamate), les adamalysines (Z est un aspartate), les métalloprotéinases matricielles (Z est une sérine ou une thréonine) (Stocker and Bode 1995, Boldt, Overgaard et al. 2001). Les métalloprotéinases

matricielles (MMPs) sont les plus importantes dans le remodelage de la MEC, leur nature et leur fonction seront développées plus en détail.

Les métalloprotéinases matricielles (MMPs), aussi nommées matrixines, sont des protéases dépendantes du calcium, agissant à pH neutre et capables de dégrader au moins un composant de la MEC. Leur effet protéolytique joue un rôle important dans le remodelage vasculaire, la migration cellulaire, la production des protéines de la MEC et sur les molécules d'adhésion. De plus les MMPs ont des effets spécifiques sur certains types cellulaires, comme les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses qui jouent un rôle dans le remodelage vasculaire.

Toutes les MMPs sont synthétisées comme pré-pro-enzymes. A l'exception des MMPs associées à la membrane (MT-MMPs) et de la MMP-11, les MMPs sont sécrétées sous forme latente et doivent être ensuite activées dans l'environnement extracellulaire pour acquérir leur activité. Les MT-MMPs et la MMP-11 sont activées au niveau de l'appareil de Golgi par la furine et atteignent le compartiment extracellulaire sous forme mature. Les pro-enzymes produites sont formées de plusieurs domaines conservés :

- le pré-domaine N-ter permet de diriger la protéine vers le réticulum endoplasmique,
- le pro-domaine est le domaine clivé lors de l'activation de l'enzyme, il contient 80 à 90 acides aminés dont une séquence de 8 résidus très conservés PRCGVPDV,
- le domaine catalytique renferme le site actif de l'enzyme et présente une séquence hautement conservée : HEXGHxxGxxHS permettant la stabilité de l'ion Zn^{2+} . Les 3 résidus histidine de cette séquence sont en effet liés à l'ion du site actif et sont donc nécessaires à l'activité protéasique de l'enzyme,
- la région charnière, riche en proline, relie le domaine catalytique de l'enzyme à son domaine C-terminal. Elle présente une flexibilité importante permettant le repliement du domaine C-terminal sur le domaine catalytique. Seules les MMP-7 et MMP-26 (les matrilysines) ne possèdent pas ce domaine.
- le domaine C-terminal, ou domaine d'homologie à l'hémopexine, est présent dans toutes les MMPs hormis les matrilysines. Il influence la spécificité de substrats des MMPs, leur liaison aux TIMPs, ainsi qu'à celles de molécules de surface.
- outre ces 5 domaines fondamentaux, les MMPs peuvent posséder des domaines supplémentaires qui leur confèrent leur spécificité, dont le domaine transmembranaire qui est présent dans les MMPs membranaires ou MT-MMPS (membrane-type matrix metalloproteinases) et qui leur donne la spécificité d'être localisés à la surface des cellules. Il est suivi d'une courte queue C-terminale cytoplasmique pour les MMPs-14, -15, -16 et -24. Pour les MMP-17 et -25, il s'agit de la région C-terminale hydrophobe qui joue le rôle de signal d'ancrage membranaire, alors que pour la MMP-23, le signal d'ancrage est situé au niveau N-terminal (Olszynski and Zimowska 2009, Zitka, Kukacka et al. 2010, Siefert and Sarkar 2012).

Dans tous les cas, l'activation des MMPs nécessite la dissociation de la liaison Cys- Zn^{2+} , puis l'élimination du pro-peptide. In vitro, les pro-MMPs sont activées par des protéinases et par des agents non-protéolytiques. In vivo, la plupart des MMPs sont activées par des protéinases tissulaires ou plasmatiques, ou par certaines protéinases bactériennes. Aussi, le système uPA/ plasmine est essentiel dans l'activation de certaines pro-MMPs. De même, l'activation de la pro-MMP2 se fait à la surface cellulaire par la MT1-MMP qui forme un complexe incluant la pro-MMP2, son inhibiteur TIMP2, la MT1-MMP et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Dans ce complexe, la TIMP2 lie via son domaine C-ter le domaine hémopexine de la pro-MMP2 ce qui permet de localiser le zymogène du côté de la MT1-MMP.

A ce jour, 25 MMPs ont été caractérisées chez les vertébrés, dont 21 chez l'Homme (Sternlicht and Werb 2001). Historiquement, les MMPs ont été divisées en différentes classes appelées collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines et métallo-élastases sur la base de leur spécificité de substrats matriciels. Cependant, avec la découverte de nouveaux substrats non-matriciels, une nouvelle classification basée sur la structure de ces protéases a été créée (Egeblad and Werb 2002). Cette classification subdivise les MMPs en huit groupes structuraux distincts : cinq correspondent aux MMPs sécrétées et trois aux MMPs associées à la membrane. Le Tableau 3 regroupe les MMPs par catégories et indique leurs activités essentielles connues à l'heure actuelle.

Proteinases produced by vascular cells	Proteinases produced by inflammatory cells	Inhibitors
MMPs: Collagenases: MMP-1 ^a	MMPs: Collagenases: MMP-1 (MΦ), MMP-8 (PMN), MMP-13 (MΦ)	TIMPs, α2-macroglobulin
Gelatinases: MMP-2, MMP-9 ^a	Gelatinases: MMP-2 (MΦ, lymphocytes), MMP-9 (MΦ, PMN)	
"Elastases": MMP-7	"Elastases": MMP-7 (MΦ), MMP-12 (MΦ)	
Stromelysins: MMP-3 ^a	Stromelysins: MMP-3 (MΦ)	
MT-MMPs: MMP-14		
Serine proteases: SMC elastase	Serine proteases: Leukocyte elastase (PMN) Cathepsin G (PMN)	α1-Antitrypsin, α2-macroglobulin, elafin
Cysteine proteases: Cathepsin S ^a	Cysteine proteases: Cathepsin S (MΦ) Cathepsin K (MΦ)	Cystatin

^a Enzymes not expressed in basal conditions [18].

Tableau 3: Protéinases détectables dans les vaisseaux et les cellules inflammatoires (Jacob 2003).

Une des caractéristiques des MMPs est qu'elles sont inductibles. Des régulations rigoureuses de la production et de l'activité des MMP est cruciale pour l'homéostasie de la MEC. La régulation des MMPs s'effectue à trois niveaux principaux : au niveau transcriptionnel, au niveau de leur activation par clivage protéolytique du pro-domaine et au niveau de leur activité par inhibition de l'enzyme active par les TIMPs (Zitka, Kukacka et al. 2010, Siefert and Sarkar 2012).

Les effecteurs comportent entre autres des facteurs de croissance, des hormones, cytokines et des agents chimiques (les esters de phorbol, ..), des facteurs physiques, des facteurs de transformation oncogénique. D'autre part, l'activité de ces protéines est précisément contrôlée et limitée par des inhibiteurs endogènes. Les suppresseurs de ces gènes comportent le facteur de transformation b, les glucocorticoides et les acides rétinoïques. Par ailleurs, après sécrétion, l'activité des MMPs est largement régulée *in vivo* par des inhibiteurs naturels et spécifiques appelés TIMPs (Tissue Inhibitor of metalloproteinases).

1.2.2.3.4 Les inhibiteurs tissulaires des MMPs : les TIMPs

La régulation de l'enzyme active peut se faire par l'inhibition de l'activité de l'enzyme. La famille des TIMPs constitue une famille d'enzymes capables de réguler l'activité des MMPs. Elles ne sont pas les seules à inhiber les MMPs : l' α 2-macroglobuline, la plasmine, la cathepsine G, l'élastase leucocytaire et les inhibiteurs synthétiques inhibent aussi ces enzymes (Travis and Salvesen 1983).

Les TIMPs permettent de maintenir un équilibre pour prévenir une dégradation excessive de la MEC. Un déséquilibre entre les MMPs et les TIMPs peut causer une augmentation de l'activité des MMPs et causer des modifications de la paroi vasculaire associées aux pathologies vasculaires. Dans le cancer, le rôle des TIMPs est controversé dans les différentes études consacrées à ce sujet, avec une activité tantôt anti-tumorale pour certains TIMPs, tantôt pro-tumorale pour d'autres TIMPs (Henriet, Blavier et al. 1999).

A ce jour, la famille des TIMPs est composée de quatre membres dont les gènes ont été clonés chez l'Homme : TIMP-1, -2, -3 et -4 (Carmichael, Sommer et al. 1986, Stetler-Stevenson, Kruttsch et al. 1989, Apte, Mattei et al. 1994, Greene, Wang et al. 1996). Ils présentent dans leur séquence 12 cystéines conservées formant 6 ponts disulfures, impliqués dans les interactions avec les MMPs (Brew, Dinakarandian et al. 2000). Les TIMPs forment des complexes stoechiométriques non-covalents et de forte affinité avec les MMPs et les pro-MMPs. Les TIMPs sont capables d'inhiber toutes les MMPs, à l'exception de TIMP1 qui n'inhibe pas la MT1-MMP, mais ils ont une préférence pour une MMP spécifique. Par exemple, TIMP-1 inhibe préférentiellement les MMP-9, -1 et -3, alors que TIMP-2 inhibe préférentiellement la MMP-2. TIMP-3, quant à lui, inhibe préférentiellement les MMPs 2, -9, -1 et -3.

1.3 Régulation de la fonction vasculaire : les interactions cellules-matrice dans les vaisseaux sanguins

La matrice extracellulaire a longtemps été considérée comme un support inerte auquel les cellules sont attachées. Les études réalisées depuis ont montré tout à fait le contraire. En fait, la MEC représente un environnement complexe et dynamique. Il existe entre les cellules et la MEC environnante un dialogue permanent via des récepteurs membranaires, en particulier les intégrines. Par l'intermédiaire de ces mécanismes, la MEC délivre aux cellules des signaux contrôlant leur forme, leur migration, leur prolifération, leur différenciation et leur survie (Robert 2011). Cette interaction ne résulte pas seulement en une régulation des fonctions cellulaires internes ; il en résulte aussi une régulation de la sécrétion et des fonctions des molécules de la matrice extracellulaire, de leur orientation et de leur composition.

1.3.1 Rôle de cette interaction

1.3.1.1 Influence de la cellule sur la matrice

L'interaction cellule-matrice permet d'organiser cette dernière. Il a été indiqué plus haut que la matrice extracellulaire est sécrétée par les cellules vasculaires. De même, l'organisation de la matrice sous forme de fibres ou d'autres configurations bien structurées nécessite l'intervention des cellules avoisinantes, comme cela a été décrit pour la formation des fibres élastiques. Egalement, en cas d'agression, de pathologie ou même en situation physiologique, la matrice extracellulaire est souvent réorganisée : des composants sont néoformés par les cellules vasculaires, d'autres sont dégradées par les enzymes de dégradation (MMPs, ...) qui sont elle mêmes régulées par les cellules vasculaires, et la matrice est néo-orientée. C'est le remodelage matriciel, composant du remodelage vasculaire, qui sera discuté dans le chapitre suivant dans ses 2 formes, pathologique et physiologique.

Un mécanisme important relevant de l'interaction cellule –matrice est l'angiogenèse. Au cours de l'angiogenèse, les cellules envoient des signaux à la matrice extracellulaire, impliquant alors sa dégradation par les enzymes, s'en suit alors la migration et la prolifération des cellules endothéliales qui partiront envahir une nouvelle zone pour la formation de nouveaux vaisseaux

En outre, les cellules de la matrice ont un rôle essentiel dans l'orientation de cette dernière. Lorsque des fibroblastes sont cultivés sur un milieu contenant des fibres de collagène non orientées, des liaisons sont établies entre les cellules et les fibres, et ces dernières sont organisées en feuillets serrés. De même, les fibres de fibronectine extracellulaire s'orientent parallèlement aux réseaux d'actine cellulaires, suite à une connexion entre les 2 réseaux au niveau de la membranaire plasmique (Fukamizu 2000, Mudera, Pleass et al. 2000, Sandra, Tienpont et al. 2001, Munoz, Vandenbulcke et al. 2004).

1.3.1.2 Influence de la matrice sur la cellule

Avec l'évolution, les procaryotes ainsi que les eucaryotes ont développé différents mécanismes biochimiques pour définir la direction, l'intensité et la proximité du stimulus extracellulaire. Ce processus est essentiel pour la cellule pour répondre aux conditions environnementales qui déterminent la migration cellulaire, la prolifération et la différenciation (Manes, Mira et al. 2000).

1.3.1.2.1 Rôle dans le maintien d'un état différencié des cellules

Il a été démontré que certaines macromolécules de la matrice extracellulaire jouent un rôle dans la détermination de la forme, de la polarité, de la fonction et de l'état de différenciation cellulaire. Ainsi, les chondrocytes, cultivés sur une matrice artificielle en gel conservent une forme typique arrondie et continuent à sécréter une matrice extracellulaire spécifique, voisine -par sa proportion de collagène II- de celle trouvée dans le cartilage. En revanche, ces mêmes cellules cultivées dans un milieu liquide banal se modifient progressivement, cessent de fabriquer du collagène II et se mettent à synthétiser du collagène I. En fait, la différenciation des cellules est due à l'induction ou la répression de gènes, qui activent la phosphorylation des facteurs de transcription. L'adhésion des cellules à la matrice va provoquer ce changement d'activité génique via les voies de signalisation cellulaire (Streuli 1999, Munoz, Vandenbulcke et al. 2004).

1.3.1.2.2 Rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire

Un exemple type justifiant de ce rôle est celui du renouvellement de l'épithélium. Dans les couches basales de l'épithélium, la multiplication des cellules souches épithéliales permet ce renouvellement. Ce phénomène est à l'origine des multiples cellules épithéliales qui se différencient tout en quittant la partie inférieure de l'épithélium. En effet, le contact direct de la cellule avec la lame basale assure la différenciation de celle-ci ainsi que sa prolifération. Une fois que la cellule quitte ces couches basales, elle perd cette aptitude à se différencier et à se multiplier. Par ailleurs, des cellules animales cultivées *in vitro* dans différentes conditions de culture adoptent différentes propriétés de différenciation. Sans support d'adhésion, des cellules en suspension mises en culture ne se divisent presque jamais. Au contraire, une fois mise en culture sur un support adapté d'adhésion, c'est à dire des composants de la MEC, elles prolifèrent et se différencient et s'étalent sur toute la surface.

Citons enfin l'exemple des cellules cancéreuses, qui présentent une multiplication anarchique et chez qui on observe une perte de la dépendance à l'adhésion à la MEC (Schwartz and Assoian 2001, Munoz, Vandenbulcke et al. 2004).

1.3.1.2.3 Rôle dans la migration cellulaire

La migration cellulaire est un mécanisme fondamental pour de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques des êtres vivants. Qu'elles soient situées durant l'embryogenèse et le développement fœtal, au cours de la néovascularisation, de l'angiogenèse, de la croissance ou de nombreux autres phénomènes, la migration permet aux cellules de se déplacer, de s'installer et d'agir dans les localisations adéquates. Pour migrer, la cellule se déforme, étend des filopodes à ses extrémités qui partiront adhérer plus loin et sur un nouveau substrat (Figure 16). Ce mécanisme est répété plusieurs fois jusqu'à ce que la cellule atteigne sa nouvelle localisation. Le substrat exerce un chimiotactisme qui permet, via des signaux membranaires et intracellulaires, d'acquiescer toutes les déformations et les caractéristiques d'une cellule migrante. La nature du substrat est donc un point fondamental dans la détermination du mécanisme de la migration. Parmi les substrats de la migration les plus courants, citons l'acide hyaluronique, la fibronectine, le collagène de type IV et la laminine. Par exemple, les cellules des crêtes neurales nécessitent la présence de fibres de collagènes, de fibronectine ou de laminine dans la MEC pour effectuer leurs déplacements. Aussi, chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, la mutation d'un gène codant pour un analogue de la laminine interrompt la migration des cellules mésodermiques. Il est aussi à noter que

l'acide hyaluronique est particulièrement abondant dans les tissus embryonnaires où le phénomène de migration est accru (Munoz, Vandenbulcke et al. 2004, Ulrich and Heisenberg 2009, Janik, Litynska et al. 2010).

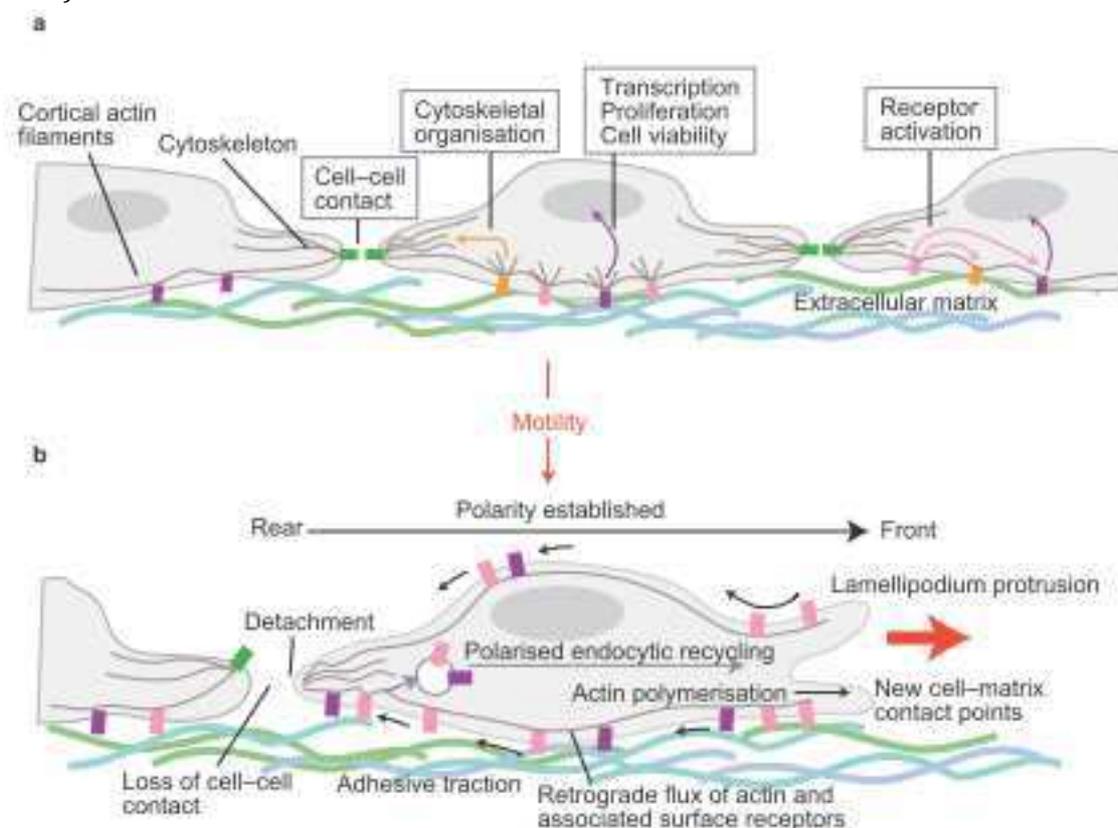


Figure 16: Mécanismes cellulaires mis en jeu lors du phénomène de la migration cellulaire. Des messagers extracellulaires activent leurs récepteurs cellulaires, induisant des modifications intracellulaires avec une désorganisation du cytosquelette, ce qui inhibe les contacts cellule-cellule et facilitant le détachement puis le déplacement cellulaire (Sanderson and Smith 1999).

1.3.1.2.4 Rôle de filtre

Un rôle important particulier à certaines lames basales est celui de filtration moléculaire et cellulaire. Les mécanismes moléculaires permettant les échanges au niveau du glomérule rénal sont un exemple clair de la filtration des macromolécules. Aussi au niveau des épithéliums, l'interface matricielle entre la zone du tissu vascularisée et la zone non-vascularisée, en particulier les héparanes sulfates de la lame basale, joue un rôle important de filtration contrôlant l'échange entre les deux zones. La lame basale est de même une barrière sélective cellulaire. Les fibroblastes du tissu conjonctif ne peuvent pas venir proliférer dans l'épithélium, par exemple. Dans le cas des endothéliums vasculaires, cette barrière peut être sélective car, sous certaines conditions, elle laisse passer des cellules, telles que les macrophages ou les lymphocytes, qui pénètrent ainsi dans les tissus sous-jacents pour y assurer leurs fonctions défensives (Rennke, Patel et al. 1978, Matsiko, Levingstone et al. 2012).

1.3.2 Formation de l'interaction : liaison ligand-récepteur

L'interaction entre la cellule et la matrice extracellulaire débute par une interaction ligand-récepteur. Si le ligand peut être n'importe quel composant de la matrice extracellulaire, ou n'importe quelle protéine présente dans la matrice ou interagissant avec elle, le récepteur appartient souvent à la famille des récepteurs intégrines. Ces récepteurs activent dans la plupart des cas un certain nombre de voies de signalisation intracellulaire, dont des canaux ioniques. Les plus importants de ces canaux sont les canaux calciques entrant en jeu dans de nombreux mécanismes, comme la contraction ou la signalisation intracellulaire. D'autres récepteurs, comme le récepteur de l'élastine-laminine qui sera décrit plus loin, et voies de transduction peuvent aussi entrer en jeu : les récepteurs couplés aux protéines G, les récepteurs enzymatiques ou les récepteurs-canaux ioniques,

1.3.2.1 La famille des Intégrines

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion cellulaire et ont la particularité de transmettre les informations de façon bidirectionnelle : depuis et vers la membrane plasmique. Toutes les intégrines sont composées de 2 sous-unités : la sous-unité α et la sous-unité β . Ces 2 sous-unités sont liées de façon non-covalente (Figure 17). Jusqu'à ce jour, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été identifiées. Leur combinaison permet de former 24 récepteurs différents actuellement identifiés (Arcangeli and Becchetti 2010, Morini and Becchetti 2010, Malinin, Pluskota et al. 2012). Sur les 24 intégrines connues, 16 intégrines sont présentes dans le système vasculaire.

Du point de vue structural, la chaîne α est organisée en 2 domaines : le domaine propulseur (propeller) et le corps, ce dernier étant composé d'une cuisse (thigh), d'un genou (genu) et de deux mollets (calf). La moitié des intégrines contient de plus un domaine d'insertion αI localisé dans le domaine propulseur. Ce domaine permet à l'intégrine l'interaction avec la matrice, il contient un site MIDAS (metal-ion-dependent adhesive site) qui lie des cations métallique divalents et joue ainsi un rôle important dans la liaison du ligand (Arcangeli and Becchetti 2010, Morini and Becchetti 2010, Malinin, Pluskota et al. 2012). Les chaînes β , elles, sont composées par les domaines b-TD qui représente la queue de la sous-unité, les domaines d'homologie avec l'EGF E4, E3, E2 et E1 ainsi que le domaine hybride porteur d'un domaine I-like. Ce dernier n'est autre qu'un analogue du domaine αI permettant l'interaction avec la matrice, surtout quand le domaine αI est absent (Campbell ID, 2011; Arcangeli A 2010) (Figure 17).

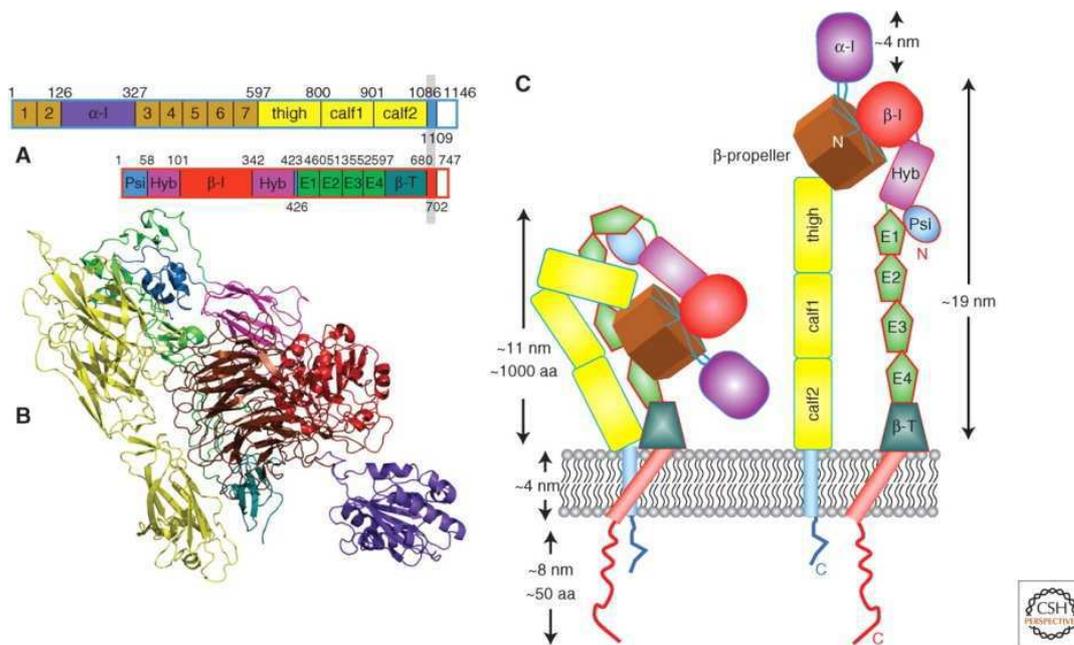


Figure 17: Structure moléculaire de la molécule d'intégrine. La molécule d'intégrine est formée de 2 sous-unités α et β . La sous-unité α est composée d'une « cuisse » (thigh) reliée à deux « mollets » (calf), et d'un domaine propulseur contenant, dans la moitié des intégrines, un domaine d'insertion α I. La sous-unité β est composée par les domaines b-TD, constituant la queue de la molécule, les domaines d'homologie avec l'EGF E4, E3, E2 et E1 et le domaine hybride porteur d'un domaine I-like (Campbell and Humphries 2011).

La majeure partie d'une intégrine est extracellulaire et seule une petite partie est intracellulaire. Le domaine extracellulaire est constitué par une tête globulaire composée par les extrémités N-terminales des deux sous-unités. Il permet la liaison du ligand de façon dépendante du cation (Loftus and Liddington 1997). A l'état de repos, il peut adopter une configuration repliée alors que, sous l'action de signaux intracellulaires, il se déplie exposant ainsi les sites d'interaction avec la MEC (Figures 17 et 18). La portion intracellulaire d'une intégrine est formée par les parties C-terminales des sous-unités α et β . Elle est associée à de nombreuses protéines intracellulaires comme l' α -actine et la FAK (Focal adhesion kinase) (Shattil and Ginsberg 1997). Outre l'actine, les intégrines peuvent se lier à des protéines régulant la motilité du cytosquelette, en particulier la taline au niveau de la chaîne β et la paxilline au niveau de la chaîne α , qui permettent les interactions avec de nombreuses autres protéines : kindline, tensine, vinculine, actinine, etc... (Shattil and Ginsberg 1997, Arcangeli and Becchetti 2010, Morini and Becchetti 2010, Pluskota, Dowling et al. 2011) (Figure 18).

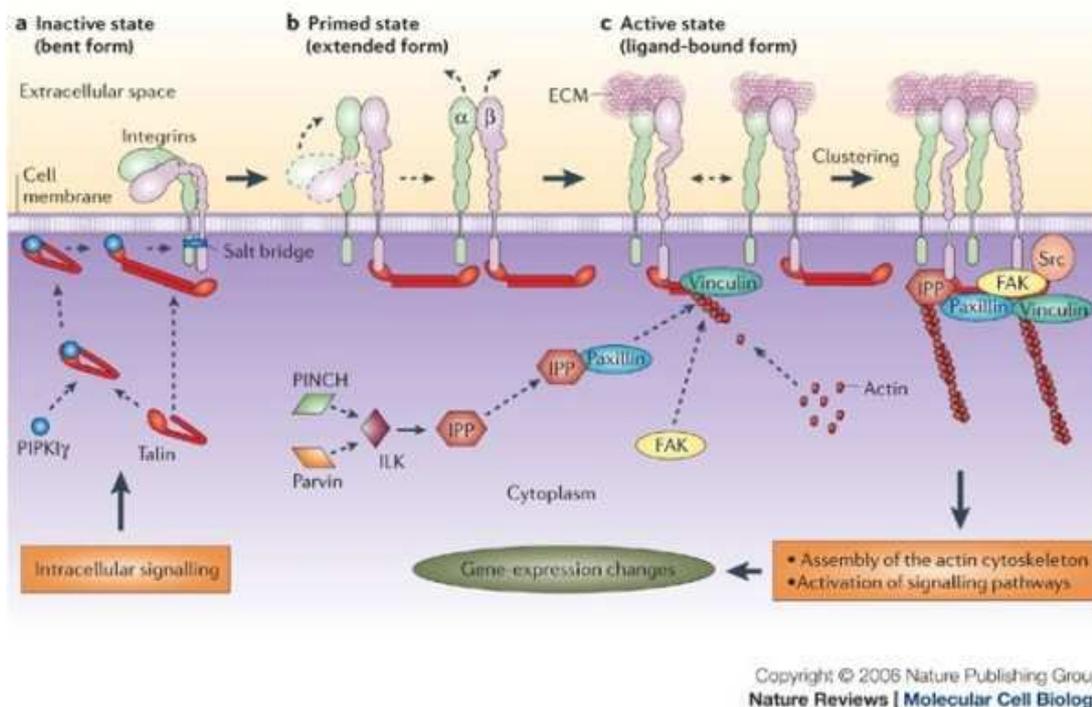


Figure 18: Différentes conformations d'une intégrine et leurs rôles dans la signalisation cellulaire : suivant la conformation de l'intégrine, celle-ci peut être inactive (quand ses 2 extrémités C-ter sont rapprochées), ou induire une signalisation extracellulaire quand ces 2 extrémités sont moins rapprochées, ou comme dans la plupart des cas en impliquant une signalisation intracellulaire quand des messagers extracellulaires activent l'intégrine (Legate, Montanez et al. 2006).

Diverses protéines de la MEC se lient aux intégrines : collagènes, laminines, fibronectine, vitronectine, métalloprotéinases, angiostatine, ..., et permettent aussi bien une adhésion qu'une communication intercellulaire ou cellule-matrice. Cette liaison se fait via plusieurs sites d'interaction au niveau des sous-unités α et β . Un tiers des intégrines possèdent des sites qui interagissent au niveau d'une séquence Arginine-Glycine-Aspartate (RGD) de leur ligand. Cette séquence est présente dans la fibronectine, la vitronectine, la thrombospondine, la laminine, la tenascine, l'entactine, la forme latente du TGF- β et, sous certaines conditions, du collagène (Pierschbacher and Ruoslahti 1984). Cependant, toutes les séquences RGD ne peuvent pas se lier à une intégrine : pour permettre la liaison, il est nécessaire que la séquence soit exposée à la surface de la protéine et cela sous une certaine conformation. De plus, d'autres séquences que RGD peuvent se lier à une intégrine, comme par exemple les séquences Tyr-Gly-Tyr-Tyr-Gly-Asp-Ala-Leu-Arg et Phe-Tyr-Phe-Asp-Leu-Arg impliquées dans la liaison de la laminine-1 et du collagène de type IV à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ (Underwood, Bennett et al. 1995).

1.3.2.2 Les interactions fibres élastiques-cellules : rôle biologiques des fibres élastiques

1.3.2.2.1 Rôle biologique des microfibrilles

(a) Les récepteurs des microfibrilles

In vitro, les microfibrilles interagissent avec plusieurs types cellulaires, dont les cellules vasculaires. Cette interaction se fait principalement par l'intermédiaire des intégrines, qui se lient au motif RGD présent dans plusieurs des protéines composant les microfibrilles, comme les fibrillines, la fibuline-5 et la MAGP-2 (Bax, Bernard et al. 2003). La séquence RGD de la fibrilline-1 et celle de la région médiane de la séquence de la fibrilline-2 se lient aux intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_6$. En plus, la région N-ter de la fibrilline-2 contient une séquence RGD (Dallas, Sivakumar et al. 2005, Hubmacher, Tiedemann et al. 2006, Sivakumar, Czirok et al. 2006, Chen, Millar et al. 2007, Massam-Wu, Chiu et al. 2010). Les intégrines $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$ et $\alpha_v\beta_8$ peuvent aussi participer à la libération et l'activation du TGF- β : en se liant au motif RGD du complexe LAP (Latency Associated Peptide), le TGF- β -initialement inactif sous forme liée au complexe LAP- est libéré et activé (Annes, Chen et al. 2004, Wipff, Rifkin et al. 2007). D'autre part, le motif GxxPG de la fibrilline-1 lui permet de se lier à un autre récepteur -non-intégrine- : l'Elastin Binding Protein (EBP) (Guo, Booms et al. 2006).

(b) Biologie de cette interaction

Les microfibrilles jouent un rôle dans la signalisation cellulaire. Dans les vaisseaux sanguins des souris en développement, les microfibrilles interagissent avec les cellules musculaires lisses vasculaires et les cellules endothéliales après qu'elles ont traversé la lame basale (Davis 1993, Davis 1994). In vitro, les microfibrilles induisent une élévation de la concentration du calcium libre intracellulaire des cellules endothéliales (HUVEC) (Mariko, Ghandour et al. 2010). Différents composants des microfibrilles sont capables d'interagir avec différents types cellulaires pour y exercer des actions (Bax, Bernard et al. 2003). La fibuline-5 est primordiale dans l'adhésion des fibroblastes, par liaison de sa séquence RGD aux intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ and $\alpha_9\beta_1$ (Nakamura, Lozano et al. 2002). En revanche, la fibuline-5 a aussi un effet anti-angiogénique : elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales humaines (HUVEC) et diminue leur pouvoir de développement d'un bourgeon angiogénique sous l'effet du VEGF (Albig and Schiemann 2004). La fibuline-5 a aussi un rôle important dans le développement du carcinome pancréatique, qui est dépendant du motif RGD de la fibuline-5 : en son absence, la croissance tumorale est diminuée (Schluterman, Chapman et al. 2010). D'autre part, sur les cellules musculaires lisses humaines, la fibuline-5 humaine recombinante ne semble présenter aucun effet sur la prolifération ou sur la migration (Lomas, Melody et al. 2007). Aussi, la migration des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) via l'uPA est dépendante de la présence de la fibuline-5 et de son interaction avec la sous-unité β_1 des intégrines (Kapustin, Stepanova et al. 2012).

MAGP-2 interagit avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ via son motif RGD et permet l'étalement des fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes et cellules musculaires lisses. Elle interagit également avec les cellules endothéliales via $\alpha_v\beta_3$ sans induire son étalement, mais joue un rôle pro-angiogénique sur celles-ci en induisant la voie de signalisation par le récepteur Notch (Gibson, Leavesley et al. 1999, Albig, Becenti et al. 2008).

LTBP-1, par son association à l'intégrine β_3 , favorise la migration et est sans effet sur l'adhésion des cellules musculaires lisses (Kanzaki and Otabe 2003). Cependant, LTBP-2 est impliquée dans l'adhérence

des cellules tumorales du mélanome via sa séquence RGD qui se lie à l'intégrine $\beta 1$. LTBP-2 induit la migration des cellules de mélanomes mais joue aussi le rôle de suppresseur de l'angiogenèse en inhibant la migration et l'invasion des cellules du carcinome épidermoïde œsophagien (ESCC) (Vehvilainen, Hyttiainen et al. 2003, Chan, Yee Ko et al. 2011)

Concernant la fibrilline-1, les études sont nombreuses. In vitro, les fragments de la fibrilline-1 contenant le motif RGD interagissent avec les intégrines de plusieurs types cellulaires (citons les intégrines $\alpha\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha\beta 6$) comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes, jouant un rôle dans leur adhésion, leur migration, leur prolifération et induisant une signalisation calcique déclenchée par ces intégrines. Dans les fibroblastes, ces fragments augmentent aussi l'expression des métalloprotéinases MMP-1 et -3. (Pfaff, Reinhardt et al. 1996, Sakamoto, Broekelmann et al. 1996, Bax, Bernard et al. 2003, Booms, Pregla et al. 2005, Bax, Mahalingam et al. 2007, Kinsey, Williamson et al. 2008, Mariko, Ghandour et al. 2010)

Au-delà de l'interaction avec les intégrines, des fragments de fibrilline-1 dépourvus du motif RGD montrent un chimiotactisme pour les macrophages via la séquence GxxPG, séquence de reconnaissance de l'élastin binding protein (EBP). Dans les fibroblastes, ces fragments augmentent la production de MMP-1 (Booms, Ney et al. 2006, Guo, Booms et al. 2006). Au-delà de ses interactions avec les récepteurs cellulaires, la fibrilline-1 peut aussi interagir directement avec certaines protéines. C'est ainsi que les fragments de fibrilline-1 contenant la séquence codée par les exons 44-49 (PF10 et PF11) régulent la biodisponibilité du TGF- β . De même, la partie N-ter de la fibrilline-1 interagit avec le prodomaine des BMP (Bone Morphogenetic Factor) -2, -4 et -7, des facteurs de croissance de la famille des BMPs, et pourrait contrôler ainsi la prolifération cellulaire (Sengle, Charbonneau et al. 2008). In vivo, l'effet de la fibrilline-1 sur la signalisation cellulaire est aussi remarquable. Dans certaines mutations de la fibrilline-1, où cette molécule devient plus susceptible à l'action des protéases, des fragments de la fibrilline-1 libérés activent la production des MMPs (Booms, Tiecke et al. 2000, Reinhardt, Ono et al. 2000). De plus, dans le syndrome de Marfan, syndrome dû à la déficience génétique en fibrilline-1, on observe une production accrue de MMPs et une activation importante du TGF- β (Neptune, Frischmeyer et al. 2003).

1.3.2.2.2 Rôle biologique de l'élastine

(a) Récepteurs de l'élastine

En 1980, Senior et ses collaborateurs ont suggéré la présence d'un récepteur de l'élastine suite à l'observation d'un chimiotactisme de la tropoélastine et de fragments d'élastine pour les globules blancs (Senior, Griffin et al. 1980). Depuis, quatre récepteurs de l'élastine ont été identifiés : le complexe récepteur de l'élastine (elastin receptor complex, ERC), l'intégrine $\alpha\beta 3$, la galectine-3 et un récepteur récemment identifié insensible au lactose dont la nature est inconnue jusqu'à présent (Toupance, Brassart et al. 2012).

i. Le complexe récepteur de l'élastine

Le complexe récepteur de l'élastine (ERC) a été connu depuis longtemps pour posséder comme ligand l'élastine et la laminine, d'où son autre appellation historique de récepteur de l'élastine-laminine (ELR). Ce récepteur est présent sur les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les fibroblastes

(Fulop, Jacob et al. 1998) et sur de nombreux autres types cellulaires (Li, Faury et al. 1998). Il est composé de 3 sous-unités de poids moléculaires différents. Une de ces sous-unités de 67kDa, l'elastin binding protein ou EBP, est péri-membranaire et lie l'élastine. Comme décrit plus haut (chapitre 2), l'EBP, après avoir transporté la tropoélastine depuis le réticulum endoplasmique jusqu'à l'espace extracellulaire, l'EBP est soit recyclée par la cellule pour y rentrer de novo dans un cycle de guidance de la tropoélastine, soit associée au niveau de la membrane plasmique aux 2 autres sous-unités transmembranaires de l'ERC de taille de 61 et de 55kDa (Figure 19). En plus de lier l'élastine, la tropoélastine, les peptides dérivés de l'élastine, la laminine et les microfibrilles, l'ERC est aussi capable de lier, au niveau d'un autre site de liaison, des β -galactosides comme le lactose, ce qui a pour conséquence de réduire son affinité pour l'élastine et qui agit donc comme un bloqueur de ce récepteur (Hinek, Wrenn et al. 1988, Antonicelli, Bellon et al. 2007, Blanchevoye, Floquet et al. 2012).

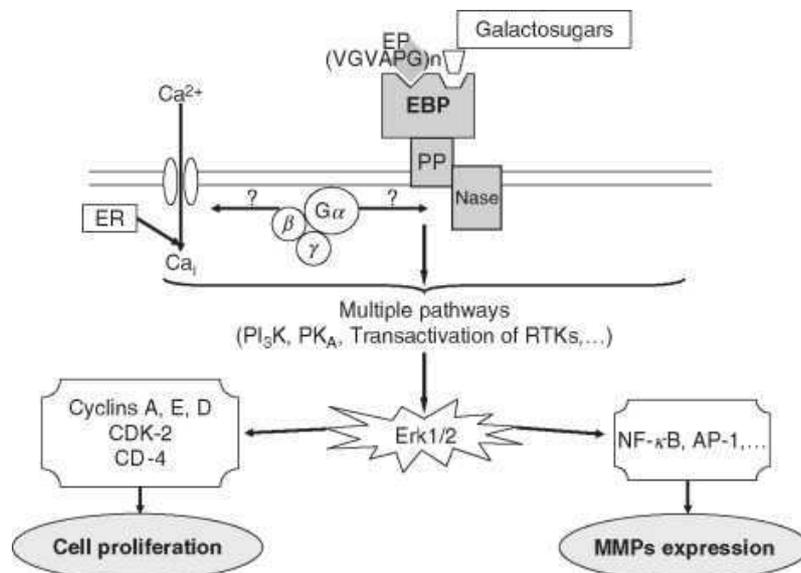


Figure 19: Structure de l'ERC et voies de signalisation déclenchées par son activation. L'ERC est formé par 3 sous-unités : la neuraminidase-1 transmembranaire (Neu1), la protéine protectrice (PP) et l'Elastin-Binding Protein (EBP). Cette dernière possède un site de fixation aux peptides d'élastine et un site galactolectine qui fixe des galactosides. L'activation de ces 2 sites induit l'ouverture des canaux calciques transmembranaires, l'activation de voies de signalisation multiples et, par suite, un contrôle sur l'expression des métalloprotéinases membranaires (MMPs) et le niveau de prolifération cellulaire (Antonicelli, Bellon et al. 2007).

ii. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'ERC fut longtemps considéré comme le seul récepteur de l'élastine avant de découvrir en 2004 un autre récepteur de l'élastine de type intégrine, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Parmi la famille des intégrines, seule celle-ci

semble interagir avec la tropoélastine (Rodgers and Weiss 2004). La tropoélastine ne possédant pas la séquence RGD, la liaison élastine-intégrine est réalisée au niveau de la partie C-ter de la séquence de tropoélastine. Cette interaction permet aux fibroblastes humaines d'adhérer in vivo à l'élastine (Bax, Rodgers et al. 2009). L'intégrine $\alpha\beta3$ joue aussi un rôle dans l'assemblage des fibres élastiques des cellules musculaires lisses en synergie avec l'EBP mais le mécanisme reste incertain (Figure 20). Il s'est avéré aussi que la synergie entre les deux récepteurs $\alpha\beta3$ et ERC est importante pour stimuler l'adhésion, la migration et la viabilité cellulaire : la présence de la séquence C-ter de l'élastine augmente de 2 fois l'assemblage de l'élastine et augmente de 60 fois l'adhésion cellulaire (Patel, Menon et al. 2011, Patel, Vandromme et al. 2012).

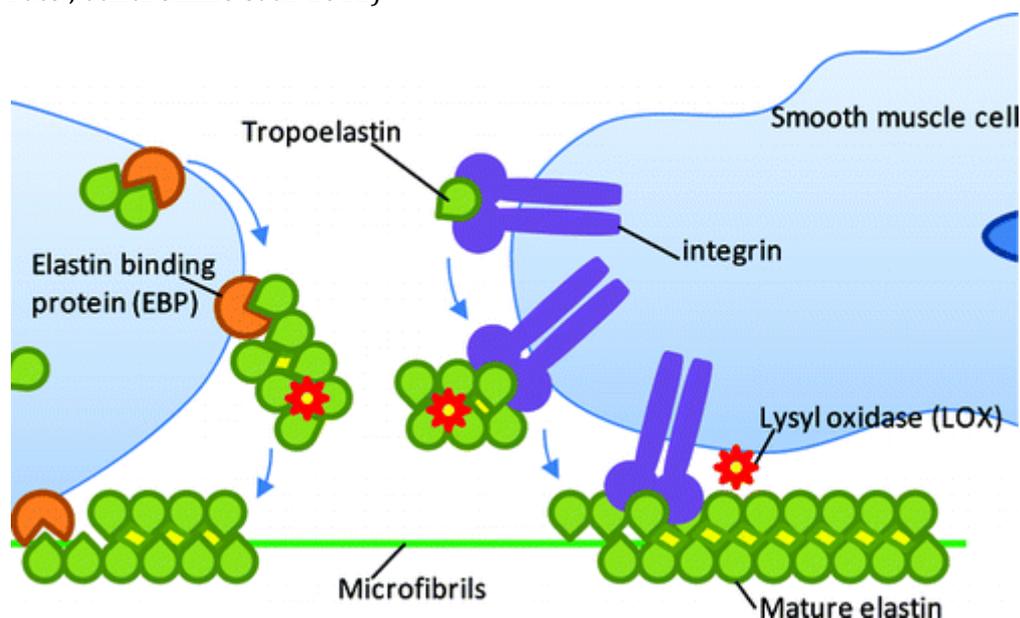


Figure 20: Proposition de mécanisme expliquant la synergie observée entre les récepteurs de l'élastine, ERC et intégrine $\alpha\beta3$, au cours de la maturation des fibres élastiques (Patel, Menon et al. 2011).

iii. La galectine-3

Certaines données de la littérature montrent que la galectine-3 peut interagir avec l'élastine fibreuse et transduire les signaux des peptides d'élastine (Ochieng, Warfield et al. 1999, Pocza, Suli-Vargha et al. 2008). La galectine-3 appartient à la famille des galectines, qui sont des lectines qui lient des β -galactosides (Barondes, Cooper et al. 1994). La galectine-3 est largement exprimée dans les cellules normales et tumorales et est impliquée dans la croissance cellulaire, l'adhérence cellulaire, la différenciation cellulaire et la progression tumorale (Liu, Patterson et al. 2002, Rabinovich, Rubinstein et al. 2002, Takenaka, Fukumori et al. 2004) (Lotan, Belloni et al. 1994; Xu, el-Naggar et al. 1995).

(b) Biologie de l'interaction élastine-cellules

Les peptides d'élastine (kappa-élastine, produit par hydrolyse basique de l'élastine soluble) et la tropoélastine, à des concentrations similaires à celles trouvées dans le sang, induisent une dilatation d'anneaux aortiques de rats dépendante de l'endothélium et du monoxyde d'azote (NO) (Faury, Ristori et

al. 1995). Ces peptides ont aussi montré des effets biologiques passant par l'ERC ou par l'intégrine $\alpha\beta3$ sur plusieurs types cellulaires, comme l'adhésion des cellules aux fibres élastiques, la synthèse et la libération d'élastases, la modulation des flux d'ions transmembranaires, la migration cellulaire et l'apoptose (Tableau 4) (Fulop, Douziech et al. 2001, Patel, Vandromme et al. 2012). De même, des voies indirectes ont été proposées pour cette interaction élastine-cellules, incluant la fibuline-5 qui pourrait interagir avec les intégrines et induire un signal intracellulaire (Nakamura, Lozano et al. 2002, Yanagisawa, Davis et al. 2002).

Dans les cellules endothéliales en culture en absence de facteur de croissance (au bout de 5 jours de culture), les peptides d'élastine augmentent la survie et la migration cellulaire, ainsi que l'expression et l'activation des proMMP2 et proMT1-MMP via la voie PI3K/Akt (Robinet, Fahem et al. 2005). De même, ces peptides d'élastine induisent la production du NO via l'activation de la voie PI3K/Akt/NOS. Le NO produit induit alors la synthèse et l'activation de MT1-MMP par la voie NO/GMPc/Erk1/2 (Fahem, Robinet et al. 2008). La tropoélastine, elle, stimule la synthèse de facteurs d'inflammation et d'hémostase (Tersteeg C, 2012). Enfin, les peptides d'élastine induisent une augmentation du niveau de calcium cytosolique et nucléaire via l'activation de l'ERC et des microfilaments d'actine (Faury G et al. 1998). De manière générale, et en lien avec les voies de signalisation listées ci-dessus, la stimulation par les fragments d'élastine semble principalement participer à 3 types des processus dans les cellules endothéliales : l'attachement des cellules circulantes, la migration et la prolifération, et la régulation du tonus vasculaire (Margadant, Monsuur et al. 2011).

Dans les CMLV, les peptides d'élastine induisent des flux ioniques (calcium, sodium) (Jacob, Fulop et al. 1987), augmentent leur prolifération, diminuent leur migration et réduisent la synthèse de l'élastine sans modifier la synthèse du collagène (Ooyama, Fukuda et al. 1987, Wachi, Seyama et al. 1995, Tersteeg, Roest et al. 2012). L' α -élastine soluble (produite par la dégradation acide de l'élastine), quant à elle, inhibe de manière significative et dose-dépendante la prolifération et la migration des CMLV cultivées sur un gel de collagène de type I (Ito, Ishimaru et al. 1997). De plus, les CMLV maintenues en culture sur un support contenant de l' α -élastine, maintiennent leur phénotype contractile sans dériver vers le phénotype synthétique (Yamamoto and Yamamoto 1993). Les peptides produits par la dégradation de l'élastine ont aussi montré des effets contradictoires : ils se sont montrés à la fois comme activateurs de la prolifération des CMLV via les protéines G, les canaux calciques de type L, les tyrosine kinases et les kinases dépendantes des cyclines (Mochizuki, Brassart et al. 2002), et des inhibiteurs de leur prolifération via le contrôle de l'expression de c-fos (Fulop, Douziech et al. 2001, Spofford and Chilian 2001, Mochizuki, Brassart et al. 2002). Chez les patients atteints de sténose supra-avalvulaire aortique (SVAS) ou du syndrome de Williams-Beuren (SWB), deux syndromes associés à une déficience génétique de l'élastine, par hémizygotie, le taux de prolifération des CMLV est accru et la synthèse d'élastine est diminuée. A contrario, l'apport exogène de tropoélastine, ajoutée sur des CMLV de patients atteints de SVAS pourrait bloquer les voies de transduction de signal d'autres facteurs de croissance et donc diminuer leur taux de prolifération (Urban, Riazi et al. 2002).

Chez les souris invalidées pour le gène de l'élastine (Eln^{-/-}), le taux de prolifération des CMLV est multiplié par deux et la migration induite par des chimioattractants exogènes est augmentée. De plus, ces CMLV n'acquièrent pas le phénotype contractile. Toutes ces caractéristiques des CMLV de souris Eln^{-/-} peuvent être abolies en rajoutant simplement dans le milieu de culture de l'élastine soluble (α -élastine) ou recombinante. Par ailleurs, l'ajout de tropoélastine recombinante à ces CMLV inhibe leur prolifération

par une voie de signalisation incluant les protéines G (Karnik, Brooke et al. 2003). De plus, le domaine hexapeptidique « VGVAPG » de la tropoélastine est suffisant pour induire dans ces CMLV la polymérisation de l'actine globulaire (l'actine G) en actine filamenteuse (l'actine-F) (Karnik, Wythe et al. 2003).

Dans les fibroblastes dermiques, les peptides d'élastine comme la κ -élastine (kE), se fixent à l'EBP et stimulent la production de la pro-collagénase-1 et l'expression de la collagénase-1 en activant la voie ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase), avec la participation de la protéine kinase A (PKA) et de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K). De même, la stimulation par les peptides d'élastine induit l'augmentation de la liaison de l'activator protein-1 (AP-1) à l'ADN (Duca, Debelle et al. 2002).

Les peptides d'élastine sont aussi capables d'interactions avec d'autres types cellulaires, comme les monocytes, les lymphocytes et les lignées épithéliales bronchiques tumorales (Tableau 4). Sur ces dernières, de manière inexplicée, la kE induit leur migration, la production et l'activation de la MMP-2 et de l'uPA, mais sans avoir un effet sur la prolifération. Cette induction ne passe ni par l'ERC, ni par l'intégrine $\alpha\beta3$, ni par la galectine (Toupance, Brassart et al. 2012), ce qui suggère une interaction indirecte ou la présence d'un autre récepteur de l'élastine.

Cell	Effect	References
Monocytes	Chemotaxis	Chen <i>et al.</i> , 1997; Jacob <i>et al.</i> , 1987; Kamisato <i>et al.</i> , 1997; Senior <i>et al.</i> , 1980; Uemura and Okamoto, 1997
	Modification of ion fluxes	Jacob <i>et al.</i> , 1987
	ROS liberation	Fulop <i>et al.</i> , 1986
Lymphocytes	Inhibition of cholesterol synthesis	Varga <i>et al.</i> , 1997
	Prolifération	Poggi and Mingari, 1995
Fibroblasts	Induction of apoptosis	Peterszegi <i>et al.</i> , 1999
	Chemotaxis	Mecham <i>et al.</i> , 1989
Smooth muscle cells	Prolifération	Ghuysen-Itard <i>et al.</i> , 1992; Kamoun <i>et al.</i> , 1995; Tajima <i>et al.</i> , 1997
	Chemotaxis	Ooyama <i>et al.</i> , 1987
	Modification of ion fluxes	Mochizuki <i>et al.</i> , 2002
Endothelial cells	Induction of angiogenesis	Jacob <i>et al.</i> , 1987
	Vasorelaxing effect and NO liberation	Robinet <i>et al.</i> , 2005
		Faury <i>et al.</i> , 1998a,b

Tableau 4: Les effets biologiques de l'élastine sur quelques types cellulaires (Antonicelli, Bellon et al. 2007).

1.3.3 Transduction du signal dans les vaisseaux sanguins

1.3.3.1 Signalisation médiée par les intégrines

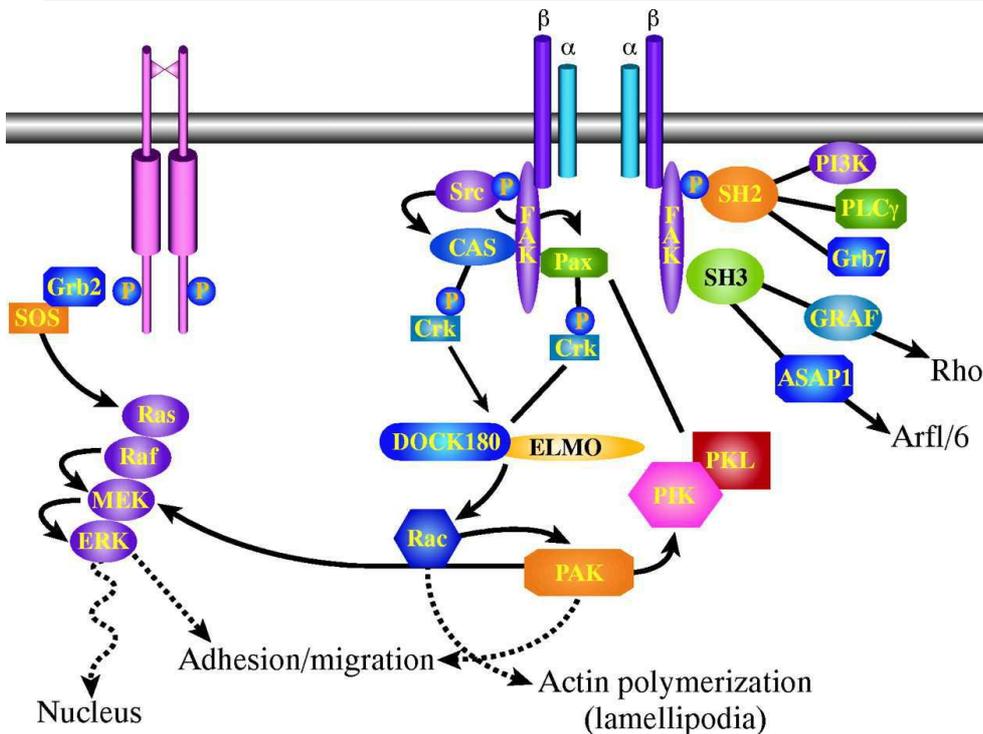


Figure 21 : Schéma simplifié de la signalisation cellulaire *via* les intégrines ou des récepteurs de croissance en lien avec l'angiogenèse. Ces voies de signalisation impliquent les voies FAK, Src et Ras/ Raf/ MEK/ERK et interviennent dans les phénomènes d'adhésion/migration cellulaires, la polymérisation du cytosquelette d'actine, ainsi que dans d'autres fonctions (Parsons 2003).

Les intégrines sont impliquées dans une signalisation bidirectionnelle. La signalisation de l'extérieur vers l'intérieur (outside-in) transmet les signaux extracellulaires de prolifération, de migration ou de survie à la cellule. Elle débute par la liaison d'un ligand extracellulaire sur le site d'interaction de l'intégrine et, par la suite, la modification de la conformation de l'intégrine. Ceci induit la signalisation intracellulaire via des kinases comme l'ILK (Integrin-linked kinase) ou la FAK (Figure 18). L'activation de ces kinases implique leur autophosphorylation et, par la suite, l'activation en cascade de voies de signalisation comme la voie des MAP kinases ou la voie de la PI3 kinase, ou encore la voie des RhoGTPases, voies qui seront décrites plus tard (Tamada 2006, Kinashi 2012, Malinin, Pluskota et al. 2012) (Figure 21). La signalisation de l'intérieur vers l'extérieur (inside-out) débute par des messagers intracellulaires qui activent les intégrines, ce qui en résulte en une exposition de leurs sites récepteurs extracellulaires. Les messagers intracellulaires proviennent souvent de l'activité des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ainsi, l'ILK activée par la PI3 kinase phosphoryle la sous-unité β des intégrines, les activant et entraînant des modifications de sa conformation modulant l'activité réceptrice des intégrines au niveau extracellulaire (Arcangeli and Becchetti 2010, Morini and Becchetti 2010, Margadant, Monsuur et al. 2011, Ye, Kim et al. 2011) (Figure 22).

Ainsi, les intégrines sont impliquées dans de nombreux processus, comme la prolifération, la migration et l'adhésion cellulaires (Figure 22). Ceci est montré dans l'observation de souris déficientes ou chimériques

pour des sous-unités d'intégrines (Margadant, Monsuur et al. 2011). De plus, l'étude de ces souris montre l'importante implication des intégrines dans la vasculogénèse et dans l'angiogénèse. Ces derniers mécanismes dépendent de l'interaction de cellules endothéliales avec la fibronectine et la vitronectine par l'intermédiaire des intégrines qui déclenchent des processus de prolifération, de migration et d'adhésion. Les intégrines ont aussi un rôle dans l'induction de l'apoptose cellulaire. En effet, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, en réponse à l'absence de ligand extracellulaire, entraîne l'apoptose via l'activation de la caspase 8. Ce phénomène est connu sous le nom de integrin-mediated death (IMD) et son absence favorise la métastase cellulaire (Shattil and Ginsberg 1997, Sheppard 2000, Margadant, Monsuur et al. 2011, Robert 2011, Ye, Kim et al. 2011).

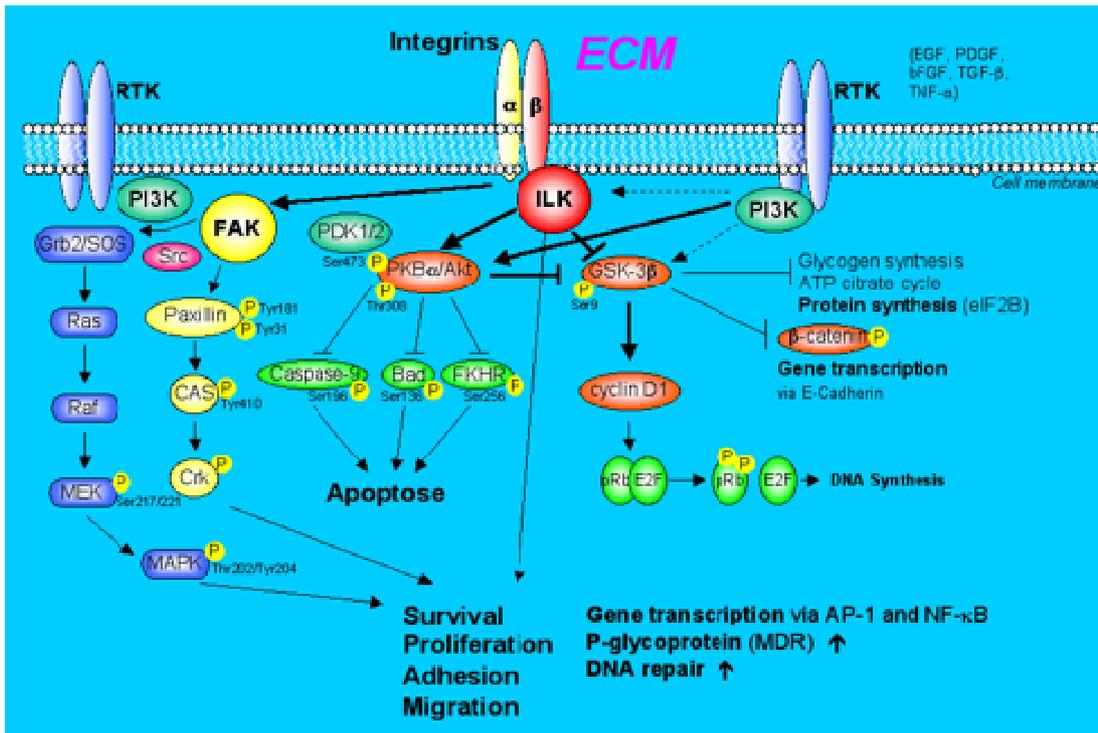


Figure 22: Transduction du signal via les intégrines : activation des voies FAK ou MAPK ou ILK (Lisiak and Cordes 2004).

1.3.3.2 La voie de signalisation calcique

Le calcium est un signal ubiquitaire contrôlant de nombreux processus cellulaires. Il intervient chez les animaux et les végétaux, dans toutes les étapes de la vie depuis la méiose et la fécondation jusqu'au développement embryonnaire et la différenciation cellulaire, dans tous les tissus et dans les types cellulaires, et dans de nombreux mécanismes intracellulaires, comme la contraction musculaire, la sécrétion, la transmission de messages nerveux et l'activation de gènes. Tous ces phénomènes sont liés à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Cette augmentation est due soit à une entrée de calcium du milieu extérieur via les canaux calciques membranaires, soit à une libération du calcium à partir des stocks intracellulaires, c'est à dire le réticulum endoplasmique, les membranes nucléaires ou les mitochondries. De plus, le signal peut varier par sa durée, son amplitude et sa fréquence (Kotlikoff 2003, Paria, Malik et al. 2003).

1.3.3.2.1 Les canaux calciques membranaires

Au niveau de la membrane plasmique, il existe plusieurs types de canaux membranaires permettant le passage du calcium depuis ou vers la cellule, dont les canaux calciques dépendants du voltage (CaV), les canaux cationiques non sélectifs, les canaux SOC (store-operated channels), ROC (receptor-operated channels), SMOC (second messenger-operated channels) (Figure 23).

Les canaux calciques dépendants du voltage sont activés par une variation du potentiel membranaire. Ils sont présents aussi bien sur les cellules excitables, comme les cellules musculaires lisses, que sur les cellules non-excitables, comme les cellules endothéliales. Sous l'effet d'une dépolarisation, ces canaux s'ouvrent et laissent entrer le calcium dans la cellule suivant un mode de diffusion passive. Cependant, dans les cellules endothéliales, l'influx de calcium est diminué par la dépolarisation membranaire. Il existe différents types de canaux calciques dépendants du voltage, les canaux T, L, N, P, Q R et A, classés suivant les propriétés pharmacologiques, la cinétique d'activation ou le seuil d'activation (LACOLLEY, BABUTY et al. 2008).

Les canaux cationiques non sélectifs sont perméables aux cations Ca^{2+} mais aussi au Na^+ et au K^+ . Dans la cellule endothéliale, ils peuvent être activés par de nombreux agonistes extracellulaires tels que la bradykinine, la thrombine et la sérotonine et impliqueront la production de médiateurs vasoactifs (LACOLLEY, BABUTY et al. 2008).

Les canaux SOC sont activés après vidage des stocks intracellulaires de calcium. L'influx du calcium résultant de l'activation de ces canaux permet la recharge des stocks du réticulum endoplasmique. L'étude structurale de des canaux SOC montre qu'il s'agit de canaux TRP (transient receptor potentiel) chez la drosophile et de leurs homologues chez les mammifères, la famille TRPC (Putney 1999, Yao and Garland 2005, LACOLLEY, BABUTY et al. 2008).

Les canaux SMOC sont activés par un certain nombre de petits seconds messagers non voltage-dépendants comme des inositol phosphates (IP3), des nucléotides, l'acide arachidonique et le diacylglycerol (DAG) ; les canaux ROC sont des canaux actives par des neurotransmetteurs alors que les canaux NCX (Na^+ - Ca^{2+} exchanger) sont des canaux échangeurs d'ions $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Parekh and Putney 2005).

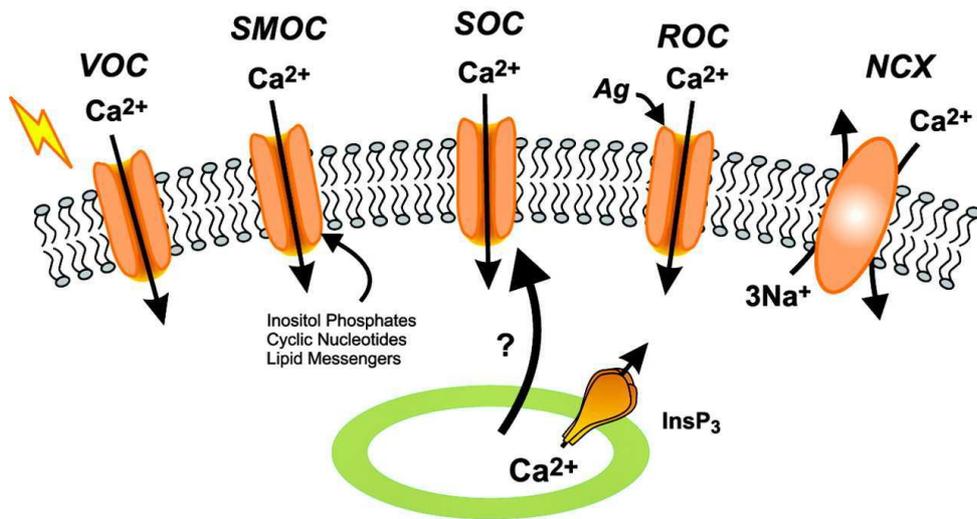


Figure 23: Les différentes voies d'entrée membranaire du calcium. Le calcium peut entrer dans les cellules par différents types de canaux membranaires dont les canaux voltages-dépendants VOC (voltage-operated channels) activés par une dépolarisation membranaire, les SMOC (second messenger-operated channels) activés par plusieurs molécules intracellulaires de type second messenger comme les IP₃, les DAG, ..., les SOC (store-operated channels) activés par un vidage du calcium intracellulaire, et les canaux activés par les récepteurs ROC (receptor-operated channels). Le calcium peut aussi rentrer par les canaux échangeurs d'ions NCX (Na⁺-Ca²⁺ exchanger) (Parekh and Putney 2005).

Il faut enfin noter que certaines pompes, notamment de la famille des PMCA (plasma membrane Ca²⁺ ATPase, issue de 4 gènes identifiés à ce jour) permettent aussi de régler l'homéostasie calcique au niveau membranaire et de rejeter l'excès de calcium intracellulaire. Ces pompes présentent un site de fixation pour la calmoduline qui ne peut se fixer que lorsque le niveau de calcium est élevé (PARIA, 2003 ; Michael I. Kotlikoff, 2003).

1.3.3.2.2 Les canaux calciques du réticulum endoplasmique

Les canaux membranaires ne sont pas les seuls à moduler la concentration du calcium libre intracellulaire. Le réticulum endoplasmique (RE), qui est la principale source de calcium mobilisable de manière rapide en réponse à des stimuli chimiques, possède aussi des canaux calciques sur sa membrane. Dans la cellule endothéliale, le réticulum endoplasmique représente approximativement 75% des réserves de Ca²⁺ intracellulaire. Divers récepteurs du RE, après la liaison de leurs agonistes sous l'effet de signaux externes ou internes, sont ouverts pour faire passer dans les deux sens le calcium réticulaire.

Les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃R) (Figure 24) sont les canaux calciques les plus connus pour leur capacité à médier le relargage du calcium du RE. L'IP₃ produit dans la cellule se lie à ces récepteurs qui sont par la suite ouverts et libèrent le calcium dans le milieu intracellulaire. Cependant, l'IP₃ n'est pas le seul effecteur contrôlant l'ouverture de ces canaux, qui sont aussi sous le contrôle de la teneur en calcium de la cellule et des ions monovalents dont la capacité décroissante à induire l'ouverture des canaux calciques est la suivante : K⁺=Na⁺>Cs⁺>Rb⁺. L'IP₃ n'est pas seulement impliqué dans les élévations transitoires de calcium intracellulaire, il joue également un rôle dans la génération des vagues calciques entre les cellules, un mécanisme de propagation de l'élévation de calcium intracellulaire entre

les cellules voisines d'un même tissu (Putney 1999, Yao and Garland 2005, LACOLLEY, BABUTY et al. 2008).

Une deuxième famille de canaux impliqués dans la libération du calcium du RE est la famille des récepteurs à la ryanodine (RyR) (Figure 24). Trois isoformes de RyR ont été identifiées jusqu'à ce jour : RyR1 essentiellement présent dans le muscle squelettique, RyR2 exprimé dans le cœur et dans le muscle lisse vasculaire, et RyR3 présent dans le cerveau, le muscle squelettique en développement et certains muscles lisses. Une isoforme de RyR2 a été caractérisée dans les cellules endothéliales de l'endocarde de porc et de l'aorte thoracique, ainsi que dans les cellules endothéliales des veines ombilicales (HUVEC). Les RyR sont aussi impliqués dans la libération du calcium induit par le niveau du calcium cytoplasmique lui-même : c'est le phénomène de calcium-induced calcium release (CICR) (Putney 1999, Yao and Garland 2005, LACOLLEY, BABUTY et al. 2008).

Outre ces 2 canaux du RE, les SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) sont les pompes de rechargement des stocks du réticulum endoplasmique à partir du cytosol, ils transportent le calcium cytoplasmique vers le réticulum endoplasmique à une vitesse plus élevée que la fuite spontanée de calcium vers le cytosol. Ce processus contribue à faire baisser le niveau de calcium cytosolique et joue ainsi un rôle dans le contrôle de l'homéostasie calcique (Langille 1993).

1.3.3.2.3 Les canaux calciques mitochondriaux

Les mitochondries contiennent elles-aussi du calcium, et peuvent le relarguer dans la cellule : 25% des réserves de calcium de la cellule sont présents dans la mitochondrie, mais sont rarement déplacés. En effet, les mitochondries constituent une faible source opérationnelle de calcium, et n'interviennent au contraire qu'en cas de surcharge en calcium intracellulaire, en captant une partie du surplus calcique, jouant ainsi un rôle de tampon. Mais les mitochondries sont toutefois capables de générer et de transmettre des signaux calciques et jouent un rôle important dans les oscillations calciques des cellules endothéliales (Falk, Oulianova et al. 1999, Ryu, Hong et al. 2012).

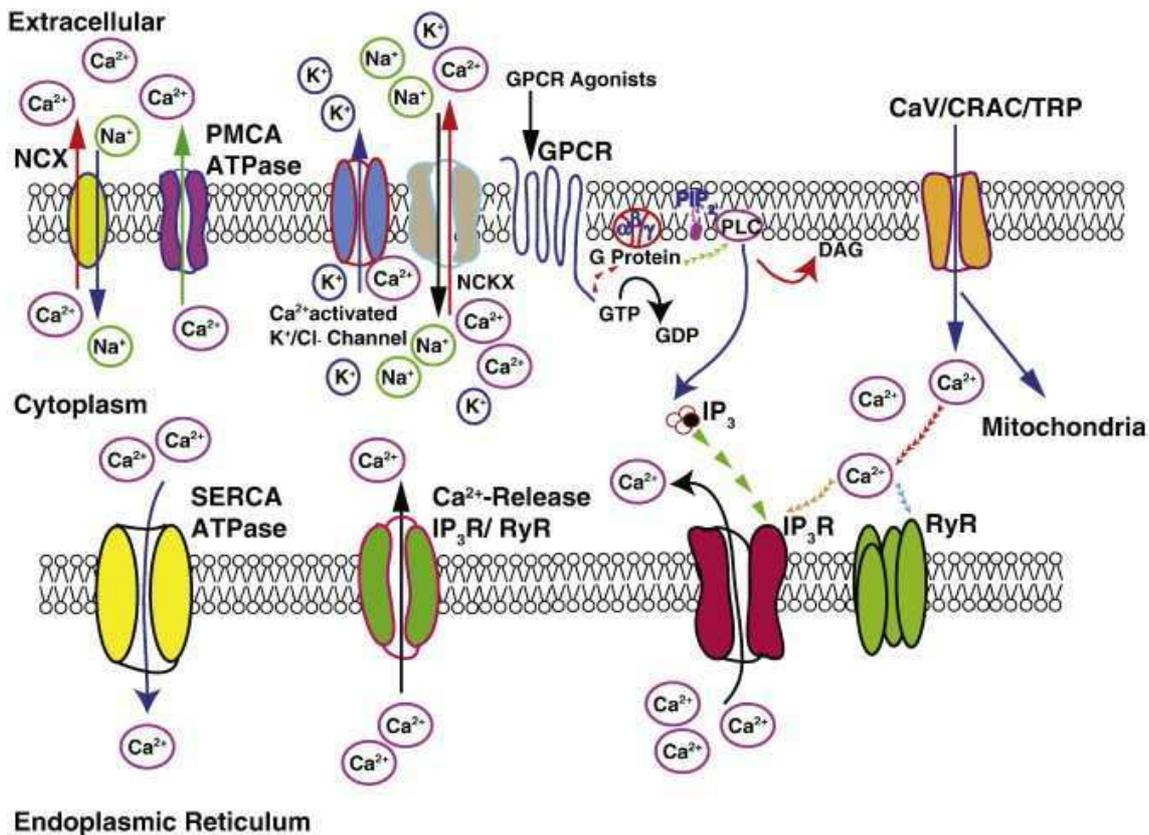


Figure 24: Les différents types de canaux calciques cellulaires. Au niveau de la membrane plasmique, on trouve les canaux échangeurs d'ions (NCX), les pompes (PMCA), les canaux SOC (TRP), les canaux dépendants du voltage (CaV), des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR) implique l'activation des canaux du RE dépendants de l'IP₃ (IP₃R). Sont aussi présents, au niveau du RE, les canaux RyR et les canaux SERCA. Un mécanisme de Ca²⁺ Induced- Ca²⁺ Release peut-être observé au niveau des canaux réticulaires IP₃R et RyR (Parkash and Asotra 2010).

1.3.3.3 Les acteurs cytoplasmiques - rôle du phosphatidyl-inositol biphosphate

Le phosphatidyl-inositol bi-phosphate (PIP₂) est un phospholipide membranaire très important dans la cellule, il entre en jeu dans un grand nombre de phénomènes cellulaires, notamment dans l'adhérence à la matrice extracellulaire et l'endocytose. Son hydrolyse par la phospholipase C (PLC) aboutit à la formation de 2 seconds messagers : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). Le DAG agit sur les protéines kinases C, alors que l'IP₃ active les canaux du RE pour libérer le calcium dans le cytosol (Figure 25). La phosphorylation de l'IP₃ par des kinases dépendants du c-GMP ou c-AMP (PKG, PKA) produit de l'IP₄ (inositol 1,3,4,5-tétraphosphate), qui favorise l'entrée du calcium extracellulaire en activant les canaux calciques membranaires. Les différentes isoformes de la PLC peuvent être activées par différents récepteurs : les récepteurs à protéines G activent les PLCβ, ce qui est le cas de la majorité des hormones, neurotransmetteurs et substance chimiques stimulant les cellules vasculaires ; les récepteurs à tyrosine-kinase activent les PLCγ -c'est le cas des récepteurs du PDGF, de l'EGF et de différents antigènes-, l'IP₃ active les PLCδ (Lee and Severson 1994, McLaughlin, Wang et al. 2002, Bird, Aziz et al. 2004, LACOLLEY, BABUTY et al. 2008).

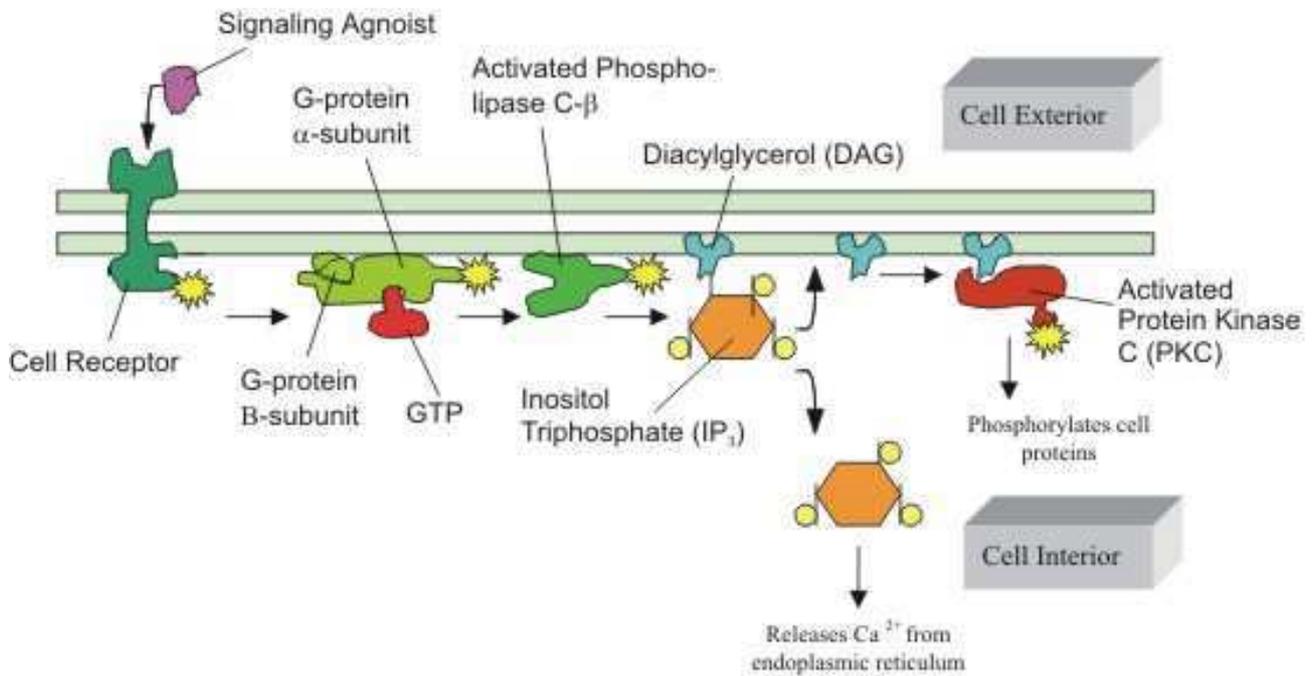


Figure 25: Les voies de signalisation du phosphatidyl-inositol bi-phosphate (PIP₂) membranaire qui, clivé par la PLC, donne de l'IP₃ et du DAG, 2 médiateurs intracellulaires importants, adapté de (Barron, Kumar et al. 2002).

1.3.3.4 Les effecteurs du complexe focal adhesion kinase (FAK)

La focal adhesion kinase (FAK) est une tyrosine-kinase de 125kDa, très conservée au sein des espèces, faisant partie de la famille des kinases d'adhérence focale (composée essentiellement de 2 protéines Pyk2 et FAK), et très importante du fait du rôle qu'elle joue dans la transmission du signal relayé par les intégrines, d'où sa localisation près des intégrines au niveau des complexes d'adhérence focaux. Elle est ainsi impliquée dans le contrôle de plusieurs processus cellulaires, comme la migration cellulaire. Outre les intégrines, FAK peut être activée par d'autres stimuli comme les facteurs de croissance, l'IGF et des hormones. Une fois activée, FAK subit une série de phosphorylations en cascades de ses résidus tyrosine. Au début de la cascade, la tyrosine 397 s'autophosphoryle, libérant ainsi un site de liaison pour les kinases de la famille Src, Fyn et c-Src, qui vont être recrutées pour phosphoryler d'autres tyrosines de FAK, comme Y576 et Y577, phosphorylées par Src. Ceci va augmenter l'activité enzymatique de FAK et créer de nouveaux sites de liaison pour d'autres effecteurs. L'activation de FAK et de c-Src est donc le point central du signal de transduction, permettant l'activation des protéines du complexe d'adhérence et donc la transmission des messages de migration, de prolifération et de survie cellulaires (Schaller, Hildebrand et al. 1994, Calalb, Polte et al. 1995, Eide, Turck et al. 1995, Kume, Nishiura et al. 1997, Manes, Mira et al. 1999, Sieg, Hauck et al. 2000, Cornillon, Campos et al. 2003).

1.3.3.5 La voie des Mitogen activated protein kinase (MAPK)

Les MAPK, également appelées « ERK » (Extracellular signal-Regulated Kinase), sont des médiateurs centraux des voies de transduction dans la cellule appartenant à la famille des sérine-thréonine kinases. Elles sont associées avec le cytosquelette et sont activées par différents récepteurs tels que l'Epidermal

Growth Factor Receptor (EGFR), le Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR), l'Insulin-like Growth Factor Receptor (IGFR) et le Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGFR), qui participent à la transduction des signaux de croissance, des signaux de transformation ou de différenciation cellulaire, de prolifération,... Les MAPK sont aussi impliquées dans la réponse des cellules endothéliales aux forces de cisaillement, où elles entraînent l'activation des gènes précoces dans les réponses rapides et dans l'initiation de la réorganisation du cytosquelette. La voie MAPK est aussi anormalement activée dans de nombreux cancers, dont le cancer colo-rectal (Tseng, Peterson et al. 1995, Chan 2005, Lievre, Rouleau et al. 2010).

La liaison ligand-récepteur implique l'activation de Ras, une GTP-ase qui va recruter et activer Raf-1, qui phosphoryle une MAPK-kinase ou MEK (MAPK-ERK-Kinase) qui, à son tour, active ERK de manière hautement spécifique et par double phosphorylation. ERK phosphorylée est capable de se transloquer pour passer au niveau du noyau et stimuler l'expression de gènes codant pour, entre autres, des facteurs de transcription (c-FOS, c-MYC, c-JUN) qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux de la cycline D1 et de cdk6 qui ont un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en G1 (Figure 26) (Tseng, Peterson et al. 1995) (Tseng, Peterson et al. 1995, Chan 2005, LACOLLEY, BABUTY et al. 2008, Lievre, Rouleau et al. 2010).

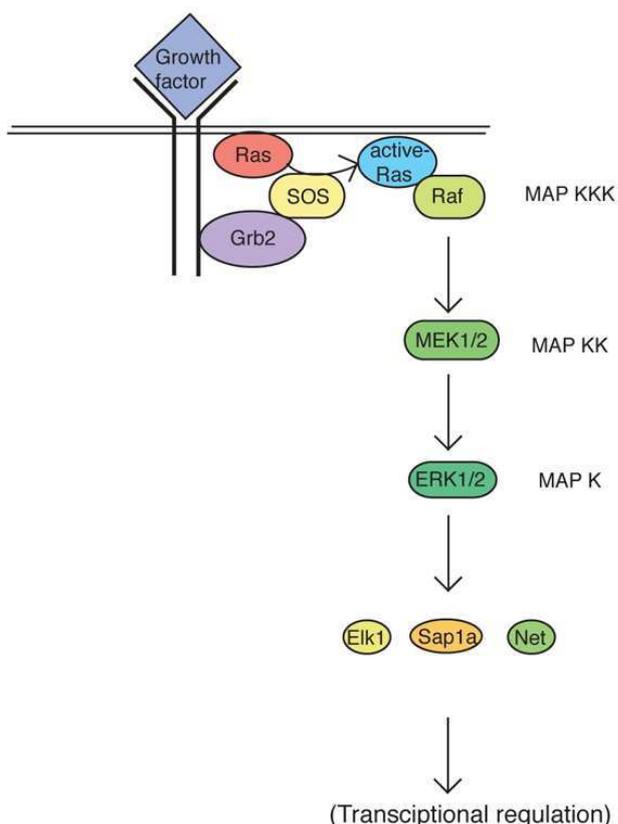


Figure 26: La voie de signalisation de la MAPK implique l'activation successive des médiateurs Ras, Raf, MEK et ERK (http://dna.brc.riken.jp/en/GENESETBANK/0200104Erk_cascade_2.html).

1.3.3.6 Les Rho GTPases

La famille des Rho GTPases est constituée de petites protéines G et comprend, chez l'Homme, 22 gènes et au moins 23 protéines. Ce sont des protéines impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'organisation du cytosquelette, la prolifération cellulaire, le trafic vésiculaire et l'expression génique. Elles possèdent une grande affinité pour les nucléotides guanidiques avec lesquelles elles se comportent comme des interrupteurs moléculaires basculant entre un état inactif associé au GDP et un état actif associé au GTP qui est capable d'interaction avec toute une série de molécules effectrices déclencheurs de plusieurs cascades de signalisation. Le passage de l'état inactif à l'état actif est assuré par les protéines guanine nucleotide exchange factors (GEF), alors que le retour à l'état inactif est induit par les GTPases activating proteins (GAPs) qui accélèrent l'hydrolyse du GTP lié à la RhoGTPase I (Etienne-Manneville and Hall 2002, Wherlock and Mellor 2002, Wennerberg and Der 2004, Wennerberg, Rossman et al. 2005).

1.4 Remodelage vasculaire

Le terme de remodelage vasculaire a été initialement utilisé pour désigner la modification du diamètre artériel au cours des pathologies cardiovasculaires. Depuis, ce sens s'est beaucoup élargi et, aujourd'hui, ce terme désigne toute modification de la structure et/ou du diamètre artériel dans les situations physiologiques normales et pathologiques. Quatre processus cellulaires sont essentiellement mis en jeu au cours de cette restructuration : la croissance, la migration cellulaire, la production ou la dégradation de la MEC et l'apoptose (Bonnet 2000, Boutouyrie, Tropeano et al. 2005). Dans ce chapitre sera traité le remodelage observé dans le cas de situations physiologiques, comme le vieillissement normal, et le remodelage pathologique observé dans certaines maladies vasculaires, comme la survenue d'anévrismes et l'athérosclérose, ou bien de maladies liées à des modifications génétiques des composants de la paroi vasculaire.

1.4.1 *Vieillessement naturel : artériosclérose*

Lors du vieillissement, les vaisseaux sanguins sont parmi les organes les plus affectés. Le vieillissement vasculaire touche surtout les grosses artères, les artères musculaires alors que les petites artères sont moins touchées. Ce phénomène physiologique est naturel et touche la totalité des individus, mais il peut être accompagné de pathologies comme l'athérosclérose, l'hypertension artérielle, l'anévrisme... (Christensen and Mulvany 2001). Au cours du vieillissement artériel, la lumière des artères élastiques augmente, l'intima s'épaissit par migration des CMLV et par synthèse de la MEC par ces cellules. La média s'épaissit aussi, souvent par hypertrophie des CMLV et accumulation de collagène et de fibronectine. De plus, une dysfonction endothéliale s'installe progressivement (Jacob 2006). La paroi artérielle se rigidifie aussi. C'est l'artériosclérose. Il s'en suit une altération de l'hémodynamique, qui entraîne une hypertension systolique et une augmentation de la pression pulsée (différence entre la pression systolique et la pression diastolique), éléments qui seront développés dans le paragraphe suivant. Cette augmentation de la pression pulsée est à l'origine de l'affectation des reins et du cerveau, qui sont particulièrement touchés dans le vieillissement. Comme ces organes apportent une faible résistance à ces variations de pression, le débit est augmenté à leur niveau, ce qui résulte en une diminution de la fonction glomérulaire par détérioration des artères rénales, et par des nécroses et des anévrismes des artères cérébrales, et donc un accroissement du nombre d'accidents vasculaires cérébraux (Cirillo, Stellato et al. 2000, Laurent, Katsahian et al. 2003, O'Rourke and Safar 2005, Verhave, Fesler et al. 2005, Scuteri, Tesouro et al. 2007). Le vieillissement artériel peut aussi être influencé par des facteurs génétiques, comme la déficience en élastine qui conduit à un vieillissement précoce (Pezet, Jacob et al. 2008), par des facteurs environnementaux, par des facteurs nutritionnels (le vieillissement est favorisé par une déficience en fer ou en acide ascorbique, et protégé par une restriction calorique) (Fornieri, Taparelli et al. 1999, Fulop, Douziech et al. 2001, Ely 2004, Hill, Buckley et al. 2007). Dans les paragraphes suivants seront traités en détails les mécanismes et événements observés lors du vieillissement artériel.

1.4.1.1 Modifications physiologiques : artériosclérose, hypertension systolique élevée et ischémie

Au cours du vieillissement physiologique ou normal, une calcification progressive de la paroi artérielle est observée en raison d'une accumulation de dépôts de calcium sur l'élastine, ce qui favorise la fixation du cholestérol sur les fibres élastiques constituant un facteur de risque pour une athérosclérose (Jacob, Brechemier et al. 1982, Robert 1998). De plus une diminution de l'extensibilité aortique est le résultat d'une part d'une fibrose essentiellement collagénique de la paroi artérielle et, d'autre part, d'une dégradation des fibres élastiques -surtout dans les artères de conductance- due à : i) des cassures mécaniques liées à l'accumulation des millions de cycles d'extension/déformation imposés par le cycle cardiaque et par ii) l'activité des MMPs qui sont sur-exprimées. Ces événements sont associés à l'altération des capacités vasomotrices. Tout ceci est à l'origine d'une rigidification artérielle : c'est l'artériosclérose.

En raison de la rigidification des parois vasculaires, la résistance aortique augmente, ce qui provoque, au moment de l'éjection du sang par le ventricule gauche, une augmentation de la pression systolique. D'autre part, la diminution de l'élasticité artérielle ne permet pas aux artères de maintenir en diastole une pression artérielle aussi élevée que chez les individus jeunes. De plus, l'éjection du bolus de sang durant la systole produit le long de la paroi vasculaire une onde qui se déplace à une vitesse appelée vitesse de l'onde de pouls (VOP). Cette vitesse dépend de la rigidité, de l'épaisseur et du rayon du vaisseau, et de la viscosité du sang. Lorsque l'onde de pouls générée par le cœur rencontre une résistance, elle produit une autre onde en sens inverse (onde réfléchie). Chez les sujets jeunes, la réflexion de l'onde de pouls survient au moment de la diastole car l'onde de pouls se déplace lentement (l'aorte est COMPLIANTE) alors que, pour un sujet âgé chez qui l'aorte est rigide et la VOP élevée, l'onde réfléchie arrive en même temps que la systole. Ceci aggrave, chez le sujet âgé, la diminution de la pression diastolique et l'augmentation de la pression systolique (Figure 27). On observe donc une augmentation de la pression pulsée (différence entre la pression systolique et la pression diastolique), qui est un indicateur hémodynamique de la rigidité vasculaire des artères de distribution (gros troncs artériels élastiques). Lorsque la pression systolique dépasse 140 mmHg avec une pression diastolique inférieure à 90 mmHg, il y a une hypertension systolique isolée. C'est la forme la plus courante d'hypertension artérielle essentielle chez les patients âgés de plus de 65 ans : elle touche environ 65% de ce groupe d'âge (Hajjar and Kotchen 2003).

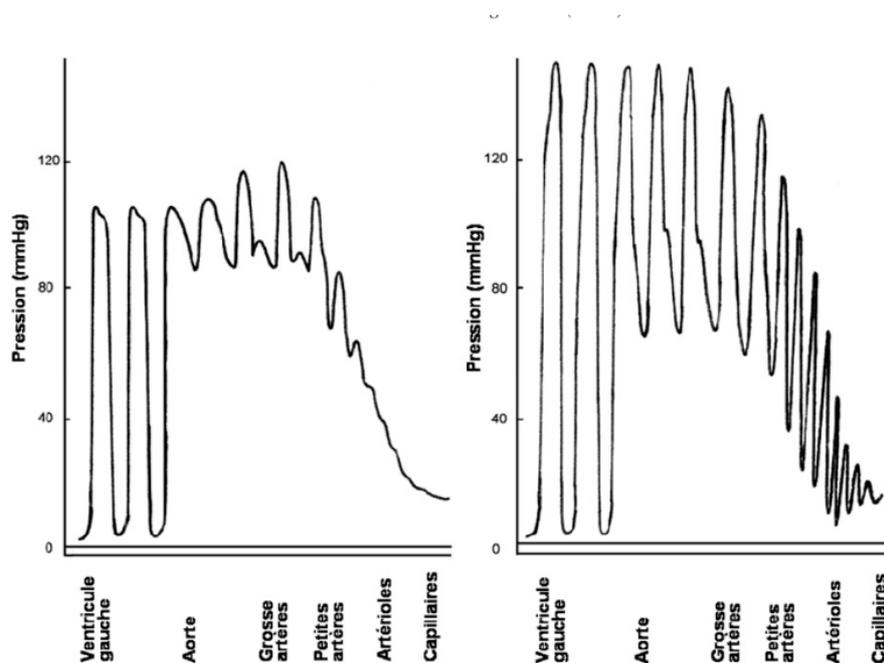


Figure 27: Changement de la pression pulsatile dans l'arbre vasculaire : représentation schématique de la pression pulsatile entre le ventricule gauche et les capillaires chez un sujet jeune (à gauche) et chez un sujet âgé (à droite). Une hypertension avec une rigidité artérielle sont observés chez le sujet âgé, et une part des pulsations observées au niveau des grosses artères sont mêmes perçues jusqu'au niveau des capillaires (Cottart, Laguillier et al. 2009).

Au niveau du coeur, l'augmentation de la pression systolique demande plus de travail au ventricule gauche pour que celui-ci puisse expulser le sang dans les artères. Ceci conduit à une hypertrophie du ventricule gauche qui, à son tour, va augmenter son temps de contraction. La durée de la systole augmente, ce qui va induire une augmentation supplémentaire de la pression à la fin de la systole du fait des ondes de réflexion, et celle de la diastole diminue (Greenwald 2007). L'hypertrophie ventriculaire gauche, en augmentant la demande en O_2 du coeur, et la prolongation de la période d'éjection participent à l'ischémie cardiaque qui induit à son tour un allongement de la période d'éjection. Parallèlement, l'élévation concomitante des pressions systolique et pulsée, est à l'origine de fractures accrues dans les fibres élastiques de la média. Ceci augmente ainsi progressivement la probabilité d'une fatigue locale, d'une altération de l'endothélium et de la susceptibilité à l'athérosclérose, pathologie abordée dans le paragraphe suivant (Nichols, Boyne et al. 2005).

1.4.1.2 Modifications de la matrice extracellulaire au cours du vieillissement

La MEC se trouve très affectée par l'avancée en âge, surtout dans les artères élastiques. Cette altération est à l'origine de la plupart des phénomènes physiologiques et physiopathologiques observés au cours du vieillissement (Figure 28).

1.4.1.2.1 Accumulation de molécules de la MEC

L'épaississement de la média est dû en partie à l'accumulation de certaines molécules de la MEC. L'accumulation des macromolécules touche surtout le collagène par suite d'une augmentation de sa

synthèse (Qi, Chi et al. 2007) mais aussi une diminution de sa dégradation due d'une part à une augmentation de la libération de TGF- β (stimulateur de la production du collagène et inhibiteur de la synthèse des collagénases) (Calalb, Polte et al. 1995, Singh and Ramji 2006) et d'autre part à l'augmentation du nombre de pontages covalents des molécules de collagène augmentant sa résistance à l'hydrolyse par les protéases (Li, Simpson et al. 1999, Jacob 2006). L'élastine, quant à elle, ne semble pas varier sensiblement en quantité avec l'âge (Spina, Garbisa et al. 1983, Pezet, Jacob et al. 2008), mais subit des modifications structurales de rupture, calcification, glycation et dégradation par les MMPs (Wang and Lakatta 2002). Les microfibrilles, elles, subiraient des modifications d'ordre structural avec l'apparition de structures fibrillaires périodiques (Hanssen, Franc et al. 2001). Tout ceci contribue à une diminution du rapport élastine/collagène, qui est renforcée par le quasi-arrêt de la synthèse d'élastine dès l'enfance et le maintien de la production de collagène jusqu'à un âge tardif (Jacob 2003). Cette accumulation de molécules peu élastiques confère au vaisseau vieillissant une rigidité accrue.

1.4.1.2.2 La glycation non enzymatique

Avec l'âge, une réaction chimique se produit entre le glucose et les protéines de l'organisme : le glucose réagit spontanément sans intervention enzymatique avec les résidus lysine ou arginine des macromolécules, pour former un produit d'Amadori qui se transforme ultérieurement en produit avancé de glycation (advanced glycation endproduct, ou AGE). Dans le système cardiovasculaire, ce processus affecte surtout les protéines à longue durée de vie de la MEC, tels que le collagène et l'élastine, et altère les réponses cellulaires (Bakris, Bank et al. 2004). En particulier, le collagène, très sensible à ce type de réaction de pontage moléculaire, devient encore plus rigide et moins susceptible à l'hydrolyse, d'où l'accumulation de fibres de collagènes moins organisées dans la paroi artérielle. Cette accumulation avec l'âge contribue à la rigidification de la paroi artérielle et donc à la dysfonction des vaisseaux.

1.4.1.2.3 La calcification

La calcification artérielle est le dépôt de calcium autour de fibres élastiques dans la média de l'artère. C'est un processus dont l'ampleur augmente énormément avec l'âge et qui participe à l'augmentation de la rigidité artérielle (Niederhoffer, Lartaud-Idjouadiene et al. 1997, Essalihi, Dao et al. 2003). La modification chimique de l'élastine liée à l'âge, c'est-à-dire sa dégradation par les MMPs qui libèrent des acides aminés polaires, favorise la fixation du calcium dans la paroi vasculaire (Seligman, Eilberg et al. 1975, Niederhoffer, Lartaud-Idjouadiene et al. 1997, Bailey, Pillarisetti et al. 2004, Basalyga, Simionescu et al. 2004, Qin, Corriere et al. 2006).

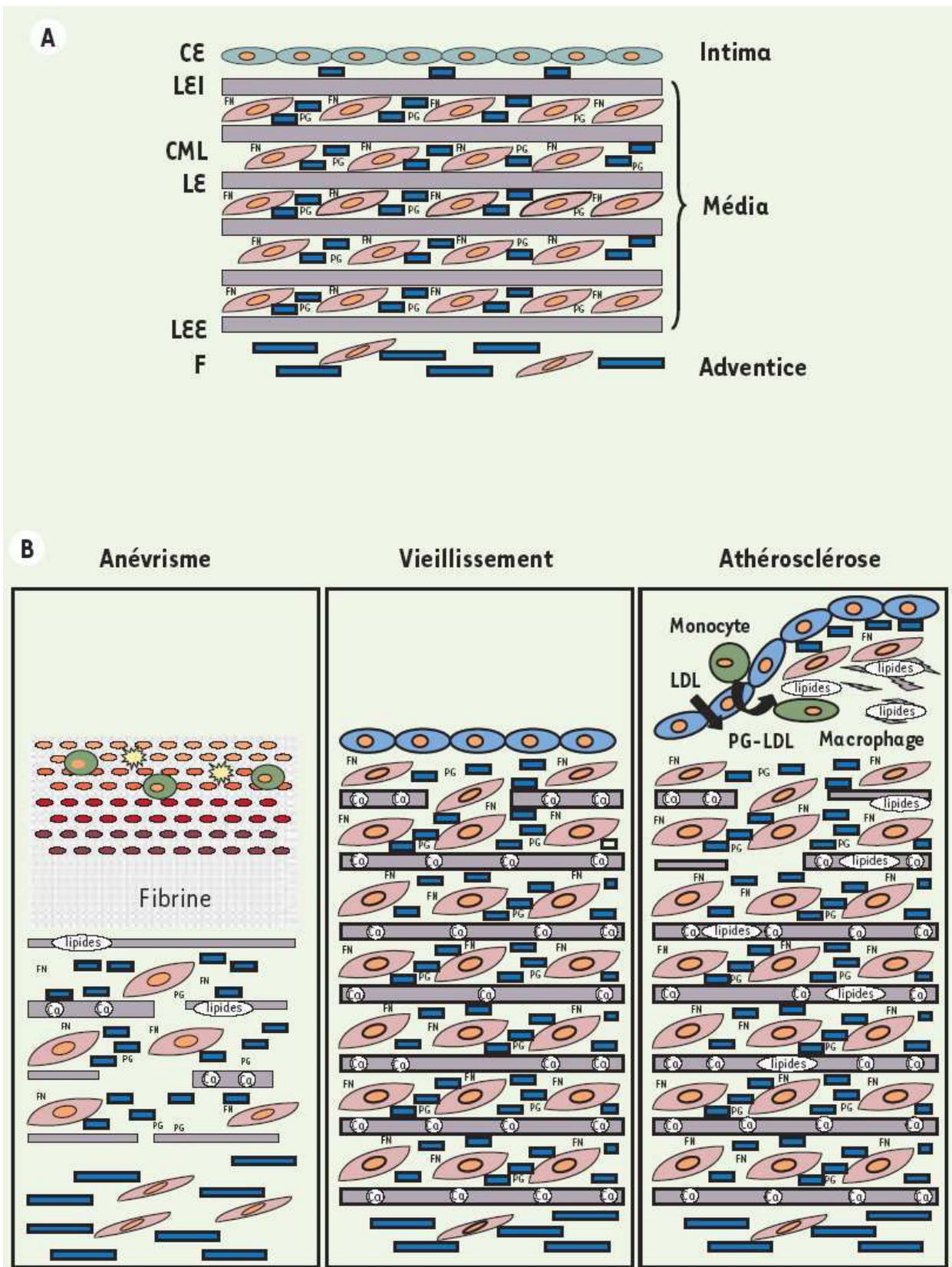


Figure 28: Différentes modifications affectant les artères en cours du vieillissement, depuis l'épaississement de l'intima-média, l'accumulation de collagène et la calcification de la paroi, jusqu'à l'hypertrophie des CMLV (Jacob 2006).

1.4.1.3 Dysfonction cellulaire lors du vieillissement

Le vieillissement vasculaire s'accompagne d'une sénescence et d'une dysfonction des cellules vasculaires. D'une part, le vieillissement s'accompagne d'une altération des propriétés vasomotrices de la paroi vasculaire en réponse à des agonistes. Par exemple, une diminution de la réponse contractile des CMLV à la noradrénaline est constatée, en partie par atteinte de la fonction des récepteurs α -adrénergiques (Vila, Vivas et al. 1997). La fonction endothéliale est également atteinte. On observe une augmentation de la perméabilité de celles-ci, une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium déclenchée par l'acétylcholine (Vila, Vivas et al. 1997) et un déséquilibre entre la production des substances vasorelaxantes et les substances vasoconstrictrices. La production endothéliale des agents vasodilatateurs telles que l'EDHF et le PGI₂ est diminuée, (Woodman, Turk et al. 2003, Long, Newaz et al. 2005, Yildiz 2007). De même, la production de NO est diminuée : si l'expression de la NOS est diminuée, celle de son inhibiteur, le diméthyl-arginine, l'est aussi ; ceci est à l'origine d'une diminution de la production de NO. De même, la vasodilatation médiée par le NO est altérée (Faury, Chabaud et al. 1997, Faury, Garnier et al. 1998, Brandes, Fleming et al. 2005). En outre, la production endothéliale des agents vasoconstricteurs tels que l'endothéline, le thromboxane A₂ et le PGH₂ est augmentée (Koga, Takata et al. 1988, Knothe, Boldt et al. 1992, Matz, Schott et al. 2000). Ce déséquilibre en faveur de production de substances vasoconstrictives contribue à l'augmentation de la rigidité vasculaire. Par ailleurs, les conséquences hémodynamiques de la rigidification vasculaire survenant au cours du vieillissement (par exemple l'hypertension) pourraient être en partie responsables de l'endommagement des cellules endothéliales et de leur dysfonction (par exemple l'altération de la production d'agents vasorelaxants) qui, par un phénomène de cercle vicieux, aggraverait à son tour cette rigidité.

1.4.2 Vieillesse pathologique des artères

1.4.2.1 Hypertension artérielle et ses conséquences

Lorsque le vaisseau est soumis à une hypertension artérielle, il réagit et subit un remodelage dans le but de normaliser la tension pariétale. Ce remodelage n'est pas le même dans tous les types d'hypertension. Dans l'hypertension systolo-diastolique -une augmentation des valeurs de pression systolique et diastolique- qui apparaît suite à une pathologie ou à la grossesse, on observe deux types de remodelages vasculaires différents : le remodelage hypertrophique dans les artères de conductance et le remodelage eutrophique dans les artères de résistance.

1.4.2.1.1 Remodelage hypertrophique

Il touche les artères de conductance. Suite à l'augmentation de la pression intraluminaire, les artères de conductance changent leur structure : la média s'épaissit et la lumière vasculaire diminue avec une augmentation de l'aire de section de l'artère (Figure 29). L'épaississement de la média fait suite à une augmentation du nombre et/ou de la taille des CMLV et de la quantité de MEC. Comme le tonus myogénique est peu perceptible au niveau des artères de conductance, ces artères ne répondent pas à l'augmentation de la pression et donc à l'étirement en se contractant. Elles réagissent par modification de

l'activité des CMLV, qui peuvent se multiplier et synthétiser des composés de la MEC, comme des fibres élastiques et du collagène, jusqu'à ce que la tension pariétale revienne à la normale.

1.4.2.1.2 Remodelage eutrophique

Le remodelage eutrophique, lui, touche plutôt les artères de résistance. Dans ce remodelage, on observe une diminution du diamètre des artères de résistance, un épaississement de la média sans changement de l'aire de section du vaisseau (Figure 29). Suite à l'augmentation de la pression sanguine, la paroi vasculaire s'étire, ce qui entraîne une augmentation du tonus myogénique et donc une vasoconstriction, ce qui génère une évolution vers ce type de remodelage (Bakker, van der Meulen et al. 2002). En outre, une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium est observée en présence d'hypertension, ce qui favorise la vasoconstriction (Deng, Curriden et al. 1996, Rizzoni, Porteri et al. 1996)...

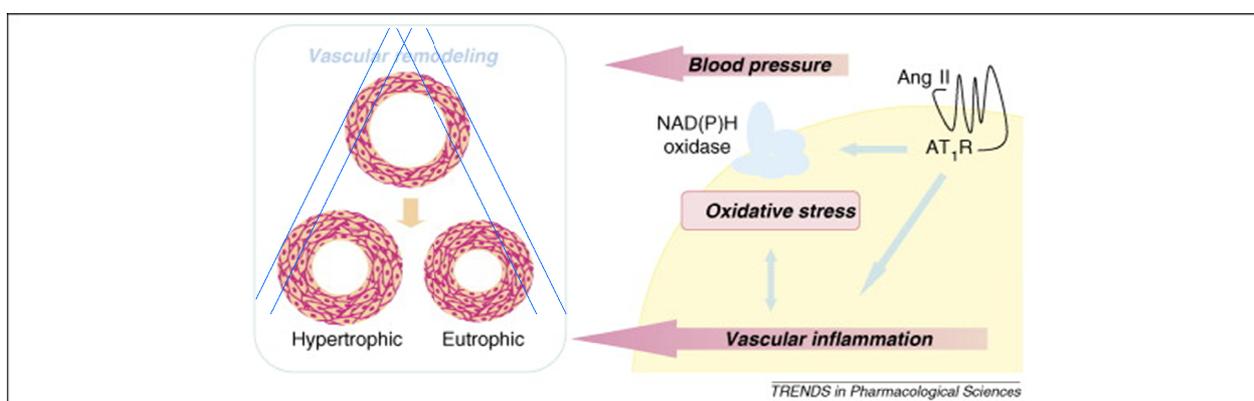


Figure 29: Représentation schématique du remodelage hypertrophique et du remodelage eutrophique observés lors de l'hypertension artérielle (Fanzani, Giuliani et al. 2008).

1.4.2.2 Athérosclérose

L'athérosclérose est un ensemble de modifications dans les parois des artères de gros et moyen calibre, très différente de l'artériosclérose, consistant en une accumulation par plaques de lipides, de glucides complexes, de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calciques dans l'intima accompagnée de modifications de la média. Les lésions se développent surtout au niveau des ramifications, bifurcations et courbures, zones où l'écoulement laminaire du flux sanguin des grosses artères est perturbé et devient plus turbulent (Augier, Charpiot et al. 1997) (Tableau 5). Les taux plasmatiques élevés de lipoprotéines de faible densité (LDL), les radicaux libres, les altérations génétiques, les infections, les réponses immunitaires, l'hypertension artérielle sont des facteurs favorisant le développement de l'athérosclérose dans ces zones de perturbation et de stress hémodynamique (Steinberg 1997, Charpiot, Bescond et al. 1998, Ross 1999). S'ajoute à ces dépôts fibro-lipidiques une hypertrophie des CMLV, une mort cellulaire accrue, une infiltration massive de monocytes, une accumulation de MEC dans l'intima et ou la média, conduisant à l'épaississement et la rigidité de la paroi artérielle (Schwartz, Lubbe et al. 1999) et constituant la plaque d'athérome.

	Athérosclérose	Artériosclérose	
Localisation	Grosses et moyennes artères (préférentiellement au niveau des coudes, bifurcations, rétrécissements...)	Toutes artères	
Types de lésions	Focales	Etendues	
Couche histologique principalement concernée	Intima	Média	
Impact sur le diamètre artériel	Diminution (sténose)	Grosses artères Dilatation	Artérioles Sténose
Répercussion de la pathologie	En aval de la lésion	En amont des lésions	En aval de la lésion
Manifestation clinique	Ischémie tissulaire	Insuffisance cardiaque	Ischémie tissulaire
Exploration	Biologie (profil lipidique, inflammation) Imagerie	Exploration fonctionnelle (imagerie)	
Base de la calcification	Noyau lipidique	Produits de dégradation de la MEC	
Mécanismes physiopathologiques principaux	Dépôt lipidique Inflammation Dysfonction endothéliale Remodelage matriciel Calcification	Anomalie de la vasorégulation endothéliale Remodelage matriciel Calcification	

Tableau 5: Principales différences entre l'athérosclérose et l'artériosclérose (Cottart, Laguillier et al. 2009).

1.4.2.3 Anévrisme artériel

L'anévrisme artériel est une dilatation anormale d'une artère, associé à une nécrose de la média avec diminution du nombre des CMLV et dégradation de la MEC, dont l'élastine, suite à l'expression et l'activation de certaines MMPs (Thompson, Geraghty et al. 2002). On observe aussi qu'une inflammation de la paroi vasculaire avec une infiltration de leucocytes est présente dans de nombreux cas (Hasham, Guo et al. 2002). Une déchirure de la paroi aortique séparant l'intima et la partie interne de la media de sa partie externe et l'adventice, appelée dissection, peut aggraver la pathologie en laissant le sang rentrer dans la media (Baxter 2005). Cette déchirure est plus fréquente au niveau de l'aorte proximale, alors que la plupart des anévrismes sont situés au niveau de l'aorte distale. La rupture de l'artère en jeu est la complication la plus grave de l'anévrisme, elle conduit à une hémorragie interne et est mortelle dans la plupart des cas (plus de 80%). Les causes de l'anévrisme sont diverses, elle peut être d'origine génétique comme dans le cas du syndrome de Marfan causé une mutation du gène de la fibrilline-1 (pathologie discutée plus loin) (Judge and Dietz 2005), ou acquise, comme au cours du vieillissement (Grimshaw and Thompson 1997), ou même d'origine inconnue (idiopathique) (Gasparovic, Nascimben et al. 2005, Marin-Manzano, Gonzalez-de-Olano et al. 2009).

1.4.3 Altération génétique des composants des fibres élastiques et pathologies vasculaires

Différentes altérations génétiques d'un des composants de la MEC peuvent survenir et conduire alors à des pathologies, dont de nombreuses pathologies cardiovasculaires. Dans les paragraphes suivants seront

traitées les pathologies humaines cardiovasculaires associées à des mutations des composants des fibres élastiques, en particulier l'élastine et les fibrillines.

1.4.3.1 Les fibrillinopathies : Le syndrome de Marfan

Les fibrillinopathies constituent l'ensemble des maladies relatives à une déficience ou une mutation dans un gène de la fibrilline. On en connaît plusieurs chez l'Homme, comme le syndrome de Beals, le syndrome de Marfan, le syndrome de Weill-Marchesani, le syndrome de Shprintzen-Goldberg et l'anévrisme de l'aorte thoracique (Loeys, Matthys et al. 2003). Les fibrillinopathies impliquent les différents organes dans lesquels les fibrillines sont exprimées, dont le système cardiovasculaire qui est touché par le syndrome de Marfan.

Le syndrome de Marfan est essentiellement lié à la mutation du gène de la fibrilline-1 (Dietz, Pyeritz et al. 1991). Cependant, dans certains cas (10%), la cause de cette maladie est une mutation d'un récepteur du TGF- β qui contrôle des phénomènes cellulaires de prolifération, différenciation, et d'apoptose (Mizuguchi, Collod-Beroud et al. 2004, Singh, Rommel et al. 2006). Jusqu'à ce jour, il n'y a pas de diagnostic moléculaire de cette maladie, ce qui est le résultat de l'influence des facteurs environnementaux ou stochastiques sur le facteur génétique de la maladie, impliquant une hétérogénéité clinique du syndrome : des personnes d'une même famille portant la même mutation sur le gène de la fibrilline-1 peuvent souvent manifester très différemment les signes cliniques de ce syndrome (Hutchinson, Furger et al. 2003). Le syndrome de Marfan, qui touche 2 à 3 personnes sur 10000 dans le monde (Judge and Dietz 2005), est caractérisé par une excroissance osseuse, une dislocation du cristallin de l'œil, un anévrisme aortique ainsi que d'autres affections du système pulmonaire et de la peau. La mortalité causée par ce syndrome est due à l'affection du système cardiovasculaire (Judge and Dietz 2005). Au niveau vasculaire, l'aorte ascendante (et parfois l'aorte abdominale) est touchée par un anévrisme, surtout au niveau de la racine aortique, impliquant par la suite sa rupture et donc la mort. Cette dilatation artérielle évolue avec l'âge, mais elle peut commencer dès le développement embryonnaire comme dans le cas de la dilatation du sinus du Valsava (Lopes, Delezoide et al. 2006, Ramaswamy, Lytrivi et al. 2006).

Au niveau structural, l'aorte des patients atteints du syndrome de Marfan présentent un lissage des lamelles élastiques qui perdent leur connections avec les cellules musculaires lisses. On observe aussi une accumulation du collagène fibrillaire, et une mort cellulaire par apoptose. L'aorte est ainsi plus rigide et moins distensible (Adams, Brooks et al. 1995, Vitarelli, Conde et al. 2006).

Au niveau moléculaire, les mutations affectant le gène de la fibrilline-1 (plus que 600 mutations connues) dans le cas du syndrome de Marfan aboutissent à la production : i) soit d'une fibrilline-1 tronquée plus courte suite à l'introduction de codons STOP ou à la délétion de parties du gène de la fibrilline-1, ii) soit à des mutations ponctuelles touchant les sites de fixation du calcium sur la protéine ou sur un résidu cystéine impliqué dans la formation de ponts disulfures de la protéine qui aboutissent à la production d'une protéine non excrétée depuis le réticulum endoplasmique ou à une protéine mal repliée plus susceptible à l'action des protéases (Booms, Tiecke et al. 2000, Whiteman and Handford 2003, Vollbrandt, Tiedemann et al. 2004).

1.4.3.2 Altérations de l'élastine :

Des mutations dans le gène de l'élastine conduisent à un certain nombre de pathologies humaines incluant les 2 syndromes touchant le système cardiovasculaire la sténose aortique supra-avalvulaire (SVAS) et le syndrome de Williams-Beuren. La diminution de la production de l'élastine par les CMLV (et dans une bien moindre mesure par les cellules endothéliales) est à l'origine des principales anomalies structurales et fonctionnelles observées dans les artères.

1.4.3.2.1 La sténose supra-avalvulaire aortique

La sténose supra-avalvulaire aortique (SVAS) est une maladie touchant 1 personne sur 20000 et se caractérisant par une diminution de la lumière de l'aorte ascendante (sténose), accompagnée par une augmentation de l'épaisseur artérielle par hyperprolifération des CMLV. La SVAS touche fréquemment l'aorte ascendante mais peut aussi toucher d'autres artères comme les artères pulmonaires, cérébrales et rénale. Cette pathologie peut-être associée à d'autres pathologies comme dans le cas du syndrome de Williams-Beuren (SWB), décrit plus bas (Williams, Barratt-Boyes et al. 1961, Beuren, Apitz et al. 1962, Schmidt, Ensing et al. 1989).

Au niveau structural, la région touchée de l'aorte des patients atteints de SVAS se caractérise par un épaissement de l'intima suite à une migration de CMLV, conduisant à une sténose artérielle, et une désorganisation des lames élastiques de la média (O'Connor, Davis et al. 1985). Les régions non-touchées de l'aorte possèdent quand même un épaissement de la paroi aortique malgré le fait qu'elles présentent un diamètre intraluminal normal. Cet épaissement est dû à une augmentation du nombre d'unités lamellaires, qui deviennent par ailleurs plus fines (O'Connor, Davis et al. 1985). Des complications peuvent s'ajouter au syndrome de SVAS, comme l'hypertrophie biventriculaire, l'ischémie myocardique surtout lors d'anesthésies, et des accidents vasculaires cérébraux quand la sténose touche les artères cérébrales (Kaplan, Levinson et al. 1995)

Au niveau moléculaire, cette maladie est due à des translocations, délétions ou mêmes des mutations ponctuelles dans un allèle du gène de l'élastine (Ewart, Morris et al. 1993, Li, Toland et al. 1997, Tassabehji, Metcalfe et al. 1997). Ces mutations peuvent engendrer la production d'une molécule d'élastine non fonctionnelle interférant dans l'assemblage des fibres élastiques, ou bien engendrer des codons STOP au niveau de la séquence du gène de l'élastine, susceptibles d'obtenir un ARNm de l'élastine facilement dégradable, et donc de rendre l'allèle de l'élastine touché non fonctionnel (Urban, Peyrol et al. 2000), d'où la diminution de 50% de la synthèse de l'élastine ou encore haploinsuffisance d'élastine (Tassabehji, Metcalfe et al. 1997, Urban, Peyrol et al. 2000).

Le Syndrome de Williams-Beuren (SWB)

Le syndrome de Williams-Beuren est une pathologie génétique humaine décrite par JCP Williams et AJ Beuren (Williams, Barratt-Boyes et al. 1961, Beuren, Apitz et al. 1962, Schmidt, Ensing et al. 1989). Le SWB touche environ 1 personne sur 10000 dans le monde et se caractérise par plusieurs symptômes dont une hypercalcémie, un métabolisme anormal du glucose, un retard psychomoteur, des difficultés d'apprentissage, une dysmorphie avec faciès d'elfe, une hypertrophie ventriculaire gauche et une cardiopathie (70% des cas), une SVAS localisée ou diffuse, une sténose des branches de l'artère pulmonaire et un pourcentage élevé d'hypertension artérielle (40-70%). L'importance des conséquences

des atteintes du système vasculaire des patients peut varier fortement suivant les individus, depuis la mortalité infantile jusqu'à l'absence de tout signe clinique cardiovasculaire (Williams, Barratt-Boyes et al. 1961, Beuren, Apitz et al. 1962, Schmidt, Ensing et al. 1989, Giordano, Turchetta et al. 2001). Dans le cas du SWB, la quantité d'élastine sécrétée est seulement de 15 % par rapport à la normale, et non de 50% comme dans le cas de la SVAS isolée. Au niveau structural, les artères de patients SWB sont plus épaisses, même au niveau des zones non sténotiques. Dans la média, les lames élastiques sont fragmentées et sont 2,5 fois plus nombreuses, les CMLV prolifèrent énormément et sont désorganisées, et passent même dans l'intima. En effet, les artères de patients SVAS et SWB présentent un déséquilibre du ratio MMP-9 / TIMP-1 en faveur de la dégradation matricielle, ce qui pourrait faciliter la migration de CMLV (Dridi, Foucault Bertaud et al. 2005).

Au niveau moléculaire, le SWB est dû à une microdélétion sur le chromosome 7 en 7q11.23, cette région de longueur d'environ 1,4 mégabases englobe au moins 27 gènes dont celui de l'élastine, aboutissant à la perte d'un des allèles de l'élastine. Le plus souvent, cette délétion apparaît de novo et, mais elle est peut-être d'origine héréditaire. La variabilité d'expression des symptômes du SWB pourrait être expliquée soit par une variabilité dans la production de l'élastine, soit par les variations de l'expression des gènes flanquants la région touchée par la microdélétion. Parmi les 27 gènes, certains sont fortement exprimés dans le cerveau, comme les gènes LIMK1, GTF2IRD1, CYLN2 et GTF21 impliqués dans les déficits de repérage visio-spatial et dans la cognition (Urban, Riazi et al. 2002, Merla, Howald et al. 2006, Pober, Johnson et al. 2008)

1.5 Présentation des objectifs de la thèse

Dans les 2 syndromes liés à des déficiences dans les deux composants majeurs des fibres élastiques, le syndrome de Williams-Beuren (WBS) / sténose supra- valvulaire aortique (SVAS) et le syndrome de Marfan (MS), la plupart des symptômes et des modifications cardiovasculaires observées sont discordantes. Le SWB/SVAS -lié a un déficit en élastine- est caractérisé par une sténose vasculaire alors que les patients atteints du MS -lié à un déficit en fibrilline-1- présentent un affinement de la paroi des vaisseaux, des anévrismes. Au niveau cellulaire, on observe une prolifération accrue des CMLV dans le cas du SWB alors qu'une mort cellulaire par apoptose est observée dans le cas du MS. Au niveau de la structure des fibres élastiques, celles-ci se trouvent plus fenestrées, mais avec un plus grand nombre de lames élastiques, dans le cas du WBS, alors qu'elles deviennent lisses/continues dans le cas du MS. Un grand nombre d'autres modifications, dont celles citées dans les paragraphes précédents, apparaissent aussi. Cette contradiction entre ces processus reste une interrogation non encore résolue : pourquoi une déficience dans deux composés élastiques de la même structure résulterait dans des effets cellulaires et tissulaires opposés (prolifération/sténose contre apoptose/anévrisme) ?

Une des réponses consiste à postuler des effets contradictoires de l'élastine et des fibrillines sur les cellules vasculaires et, par la suite, dans la composition de la MEC néosynthétisée par les cellules vasculaires. Selon cette hypothèse, la déficience en élastine ou en fibrilline résulterait en une diminution de leurs effets déjà contradictoires sur les cellules, induisant ainsi des phénotypes contradictoires dans les 2 syndromes. Les données de la littérature sur les effets de l'élastine et de la fibrilline-1 (et des microfibrilles) sur la signalisation et la fonction des cellules vasculaires (voir chapitre 3) ne montrent à priori pas de différence claire, mais la signalisation de la fibrilline-1 est encore peu connue. Dans cette hypothèse, il apparaît important d'identifier plus précisément et de comparer les effets respectifs de chacun de ces deux composés sur les cellules vasculaires, endothéliales et musculaires lisses.

D'autre part, plusieurs symptômes observés dans ces deux syndromes ressemblent à certains égards à un vieillissement précoce. Les mécanismes cellulaires et moléculaires du vieillissement artériel sont assez bien décrits et des modifications de la fonction cellulaire et de la structure des fibres élastiques y sont observées. La question d'une éventuelle relation cause-conséquence entre ces deux types de modifications se pose : est-ce que les modifications cellulaires sont à l'origine des modifications de la structure des fibres élastiques, ou bien alors l'origine des changements des fonctions cellulaires serait les altérations progressives de la structure des fibres élastiques ? Une part de la réponse à cette question est l'étude de l'effet du vieillissement sur la réponse cellulaire aux composants des fibres élastiques, fibrilline-1/ microfibrilles et élastine.

L'objectif de cette thèse est donc de comparer les actions des microfibrilles et de l'élastine sur les différentes fonctions cellulaires vasculaires, en fonction de l'âge : prolifération, adhésion, migration, synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire dans les cellules endothéliales humaines seront étudiées. Nous utiliserons principalement comme modèle d'étude les cellules endothéliales (CE) isolées à partir de veines ombilicales humaines (HUVEC). Les HUVEC seront traitées avec des microfibrilles aortiques bovines, un fragment de la fibrilline-1 contenant le motif RGD (PF14), la kappa-élastine bovine ainsi que la tropoélastine recombinante humaine clonée chez *Escherichia coli*.

Dans ces conditions, la signalisation calcique induite par ces fragments sur ces cellules endothéliales sera étudiée et comparée, permettant de repérer une éventuelle différence dans les signalisations cellulaires, en particulier la signalisation calcique, induites par l'élastine et les microfibrilles.

Outre les cellules endothéliales, une étude de certaines voies de signalisation induites par les mêmes composants des fibres élastiques sera réalisée sur des CMLV cultivées à partir de l'aorte de souris sauvages ou de souris invalidées pour la fibrilline-1 (Fbn-1 +/-) ou l'élastine (Eln +/-). **La mise au point d'un protocole de culture de CMLV de souris de grande efficacité est un deuxième objectif de cette thèse.**

Les souris hétérozygotes pour la fibrilline-1 (Fbn-1 +/-) ont été générées par délétion des exons 19-24 codant pour les domaines cbEGF8-TB3, dans le gène de la fibrilline-1. Ces souris sont un modèle du syndrome de Marfan puisqu'elles présentent des symptômes vasculaires équivalents à ceux observés dans ce syndrome (Pereira, Andrikopoulos et al. 1997, Mariko, Pezet et al. 2011). L'allèle mutant est exprimé à hauteur de seulement 10% par rapport à l'allèle sauvage (Pereira, Andrikopoulos et al. 1997). Les souris hétérozygotes (Fbn-1 +/-) sont viables et fertiles alors que les homozygotes (Fbn-1 mgΔ /mgΔ) meurent 2 à 3 semaines après la naissance en moyenne, par rupture de l'aorte ascendante (Neptune, Frischmeyer et al. 2003)

Les souris hémizygotiques pour l'élastine (Eln +/-) sont un modèle partiel du SVAS et du SWB, elles montrent certaines des caractéristiques communes à ces pathologies, à savoir l'hypertension artérielle, l'hypertrophie cardiaque, une augmentation du nombre de lame élastiques qui deviennent plus fines, une diminution du diamètre luminal et une rigidification artérielle (Li, Faury et al. 1998, Faury, Robert et al. 2003, Pezet, Jacob et al. 2008). Les souris hétérozygotes (Eln +/-) sont viables et fertiles alors que les souris homozygotes (Eln -/-) meurent d'occlusion artérielle dans les 72 heures après la naissance (Li, Toland et al. 1997, Li, Faury et al. 1998).

Sur ces modèles de cellules musculaires lisses, nous étudierons : i) la différence dans la génération d'un signal calcique en réponse aux différents fragments de microfibrilles ou d'élastine étudiés, et ii) l'influence du vieillissement sur la réponse cellulaire à l'élastine et aux microfibrilles.

L'étude de l'influence des paramètres "vieillessement", "invalidation de l'élastine" ou "invalidation de la fibrilline-1" permettront de comparer : i) d'une part la différence de signalisation cellulaire entre les 2 syndromes de Williams-Beuren et de Marfan, et ii) d'autre part, la relation entre les modifications observées par l'invalidation génique et celles observées dans le cas du vieillissement normal.

Enfin, l'implication de la stimulation des CMLV et des CEs par les composants des fibres élastiques dans la vasoréactivité chez le rat sera comparée aux résultats obtenus concernant la signalisation calcique, ceci afin de déterminer l'importance du calcium dans la fonction contractile des artères.

Toutes ces études visent donc à étudier le rôle de l'élastine et des microfibrilles dans la fonction des cellules vasculaires, afin de déterminer l'impact de leur déficience respective sur la fonction vasculaire. La comparaison entre ces effets et ceux observés en cas du vieillissement permettront d'observer d'un autre point de vue l'action des composants des fibres élastiques sur la fonction vasculaire. Les résultats obtenus permettront, en premier lieu de déterminer les origines des symptômes observés dans le cas du vieillissement, du SWB et du MS, qui, une fois déterminées, pourront suggérer de nouvelles stratégies

thérapeutiques ou, au moins, des alternatives de traitement de ces maladies à moyen terme ou à long terme.

2) Expériences et résultats

2.1 Effets des composants des fibres élastiques sur la tension des anneaux aortiques de rats : étude *ex-vivo*

Les fibres élastiques jouent un rôle essentiel de régulation de l'élasticité et de la tension des vaisseaux sanguins. Ceci est rendu possible grâce à leur structure qui leur permet, par simple modification d'organisation, de se tendre et détendre, tout en augmentant ou diminuant le diamètre artériel (Rosenbloom, Abrams et al. 1993). Les études réalisées sur les effets des fibres élastiques sur les cellules vasculaires conduisent à la conclusion que les fibres élastiques ne sont pas des simples effecteurs de tension dans le vaisseau mais interagissent avec leur milieu vivant, en particulier en déclenchant des événements de signalisation dans les cellules avec lesquelles elles entrent en contact (Faury, Usson et al. 1998, Reinhardt, Gambee et al. 2000, Fulop, Douziech et al. 2001, Spofford and Chilian 2001, Mochizuki, Brassart et al. 2002, Karnik, Brooke et al. 2003, Karnik, Wythe et al. 2003, Booms, Ney et al. 2006, Guo, Booms et al. 2006, Sengle, Charbonneau et al. 2008, Mariko, Ghandour et al. 2010). Une des questions qui se posait alors était de savoir si les composants des fibres élastiques pouvaient être non seulement à l'origine de l'élasticité vasculaire, mais aussi responsables –directement ou indirectement- de la régulation de la contractilité artérielle, donc des CMLV. Des études avaient déjà montré que la kappa-élastine (κ E), en interagissant avec le complexe récepteur de l'élastine (ERC), induit sur des anneaux aortiques de rats une relaxation dépendante de l'endothélium, via une synthèse d'oxyde nitrique NO (Faury, Ristori et al. 1995). Une vasorelaxation similaire est aussi observée en réponse à des fragments de l'élastine contenant les séquences VGV, PGV, et VGVAPG ainsi qu'à la tropoélastine recombinante (Faury, Garnier et al. 1998). Il est donc apparu important de savoir si l'autre composant des fibres élastiques, les microfibrilles -et spécialement leur composant principal, la fibrilline-1, influence la tension des anneaux aortiques de rats, ainsi que la voie de signalisation impliquée dans la vasorelaxation par l'élastine. Nous avons donc réalisé des expériences de mesure de tension d'anneaux aortiques de rats en réponse à l'application de tropoélastine recombinante (rTE), de microfibrilles aortiques bovines (MF) ou du fragment PF14 de la fibrilline-1.

Protocole d'étude :

Des rats mâles âgés de 4 à 6 mois sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique 6% (60 mg/kg), avant injection de 0.2 mL d'héparine à 1700 UI/ml au niveau de la veine saphène, dans le but d'éviter la coagulation sanguine et la formation de caillots sanguins qui pourraient endommager l'endothélium vasculaire. Le rat est alors disséqué et l'aorte thoracique est prélevée depuis la crosse aortique jusqu'au diaphragme dans du liquide physiologique (118mM NaCl, 5,6mM KCl, 1,2mM MgCl₂, 1,2mM KH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 2,4mM CaCl₂, 11mM Glucose ; pH 7,4) maintenu dans un bullage O₂ 95% / CO₂ 5% pour l'oxygéner et réguler son pH. L'aorte est ensuite coupée en anneaux de 1-2 cm de longueur, puis chaque anneau est placé entre les 2 crochets d'un artériographe de tension perfusé constamment par du liquide

physiologique bullé au CO₂ et chauffé à 37°C. Celui des 2 crochets qui est relié à un mécanotransducteur permet la détection de la tension exercée par l'anneau d'aorte et son transfert, après amplification du signal, vers un système informatique d'analyse de données (Biocodas, Biologic, Claix, France). Une augmentation de la tension est le résultat d'une contraction de l'anneau d'aorte alors qu'un relâchement de l'anneau d'aorte diminue la tension exercée sur les crochets et le niveau du tracé sur l'écran.

Les anneaux d'aorte sont précontractés avec 1µM de phényléphrine (PE) puis relâchés par l'ajout de 1µM d'acétylcholine au liquide physiologique de perfusion, ceci dans le but de vérifier l'intégrité et la fonctionnalité de l'endothélium et des cellules musculaires lisses. Les anneaux sont alors recontractés avec 1µM de PE dans du liquide physiologique ne nécessitant pas de bullage continu car tamponné à l'HEPES (135mM NaCl, 5mM KCl, 1,17mM MgSO₄, 0,44mM KH₂PO₄, 2,6mM NaHCO₃, 0,34mM Na₂HPO₄, 5,5mM D-Glucose, 0,025mM EDTA, 10mM HEPES, 1,6mM CaCl₂, pH7,4) puis sont soumis à des doses croissantes cumulées des différentes solutions de rTE, de MF ou de PF14, pendant 15min par dose. Les différentes concentrations utilisées pour la rTE étaient 0.01, 0.1, et 1 µg/mL ; celles des MF étaient de 0.15, 0.5 et 1.5 µg/mL alors que celles de PF14 étaient de 0.1, 1 et 10µg/mL.

Les tracés sont alors analysés, normalisés par rapport à la contraction moyenne de 970mg de tous les anneaux artériels étudiés sous l'action de 1µM de PE:

Tension de normalisation de l'anneau a sous traitement X=

*[Tension expérimentale obtenue de l'anneau a sous traitement X (mg)*970(mg)/*

Tension expérimentale de l'anneau a sous 1µM de PE (mg)]

Les valeurs des relâchements induites par les produits testés sont alors déduites par soustraction de la tension obtenue en fin de période d'action de la molécule à la tension de départ (970 mg) :

Relâchement de la tension sous traitement X= (Tension moyenne de contraction sous PE- Tension moyenne de contraction sous traitement PE + X)

Pour chaque produit, au moins 3 anneaux d'aorte provenant de 3 rats différents sont testés, et la moyenne de l'effet est établie. Des tests ANOVA à un facteur sont réalisés pour comparer les différents groupes.

Résultats obtenus :

L'ajout de la rTE à des anneaux de vaisseaux précontractés à la PE induit une vasorelaxation dose-dépendante, de 80mg à la dose 0,01µg/mL à 130mg pour une dose de 1µg/mL pour laquelle la relaxation observée est significative (Figure 30A). Nous avons donc confirmé que la tropoélastine est une molécule relaxante de l'aorte de rat, comme démontré auparavant (Faury, Garnier et al. 1998). Pour vérifier si la relaxation observée est dépendante de l'endothélium, l'endothélium des anneaux de vaisseaux testés a été détruit par frottement et la relaxation produite par la rTE a été étudiée. Dans cette condition, aucune vasorelaxation significative n'a été observée par aucune des doses testées (Figure 30B). Ceci confirme que la vasorelaxation obtenue par l'ajout de la rTE est dépendante de l'endothélium, qui secréterait un ou plusieurs vasodilatateurs agissant au niveau des cellules musculaires de la média.

Une des molécules vasodilatatrices bien connue pour être sécrétée par l'endothélium est le monoxyde d'azote (NO), synthétisé sous l'action d'une enzyme, la NO synthase (NOS) qui peut-être bloquée par le L-NAME (L-NG-Nitroarginine methyl ester) (Singh, Carraher et al. 2010). Nous avons montré que le blocage de la NOS par $10^{-5}M$ de L-NAME pendant 30min avant l'ajout de la rTE fait aussi disparaître la vasorelaxation médiée par la rTE (Figure 30C), confirmant alors une synthèse de NO par les cellules endothéliales vasculaires, qui diffuseraient au niveau des cellules musculaires lisses les dilatant et provoquant par la suite une dilatation de l'aorte.

Nous avons ensuite voulu vérifier qu'une interaction rTE-cellules endothéliales est une interaction qui pourrait être médiée spécifiquement par le complexe récepteur de l'élastine (ERC), comme dans le cas de la kappa-élastine (kE) (Faury, Ristori et al. 1995). Pour tester ceci, les anneaux de vaisseaux ont été bloqués pendant 15 min par $10^{-4}M$ de lactose, qui agit en diminuant l'affinité des peptides d'élastine pour ce récepteur-là. Or, une fois les ERC bloqués par le lactose, l'ajout de la rTE résulte encore en une forte relaxation des anneaux de vaisseaux de l'aorte des rats, même plus élevée que celle observée sans lactose (Figure 30D), suggérant cette fois-ci la participation d'un autre récepteur de l'élastine dans la transduction intracellulaire du signal de synthèse de vasodilatateurs au niveau des cellules endothéliales.

Outre l'élastine, l'autre composant des fibres élastiques, les microfibrilles (MF) s'est avéré être aussi un vasodilatateur agissant de façon dose-dépendante, avec un effet significatif aux doses 0,5 et 1,5 µg/mL, doses auxquelles il génère une dilatation de 200mg (Figure 30E). Cette dilatation est aussi endothélium-dépendante comme le montre la même expérience réalisée après destruction de l'endothélium des anneaux de vaisseaux (figure 30F). Dans ce cas, aucune modification significative du diamètre artériel n'est observée. Afin de savoir si le NO pourrait être un médiateur de cette relaxation, les anneaux de vaisseaux ont aussi été pré-incubés avec le L-NAME. Dans ce cas, tout comme pour la rTE, la relaxation disparaît après blocage de la NOS par le L-NAME (Figure 30G), démontrant alors la participation du NO comme vasodilatateur

secrété par les cellules endothéliales vasculaires pour agir au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. L'action du lactose, bloqueur de l'ERC, a alors été testée sur l'effet des MF. Une fois l'ERC bloqué, une vasorelaxation résultant de l'ajout des MF est toujours présente, bien que légèrement inférieure à celle qui est induite en l'absence de lactose (Figure 30H). Il est donc probable que les MF agissent au niveau des cellules endothéliales, partiellement via l'ERC et, pour une autre part, *via* un autre récepteur que l'ERC.

PF14, un fragment de la fibrilline-1 contenant la séquence RGD, a aussi été testé sous artériographie de tension pour vérifier si l'effet observé par les MF est dû à cette région de la fibrilline-1. Ce fragment s'est aussi montré avoir un effet vasorelaxant dose-dépendant, mais cette fois-ci avec des valeurs plus importantes, significatives même pour les faibles doses de 0,1µg/mL où les vaisseaux sont dilatés de 140mg alors que pour 10µg/mL, 400mg de relâchement sont induits par PF14 (Figure 30I). Il serait normal de déduire, comme dans le cas des MF, que cette vasodilatation pourrait être médiée par l'endothélium vasculaire. Or, de manière surprenante, la destruction de l'endothélium vasculaire ne résulte pas seulement en la disparition de la dilatation observée, mais résulte de plus en une légère contraction vasculaire significative pour les doses 1 et 10µg/mL (Figure 30J). Cet effet vasoconstricteur est aussi démontré en présence de L-NAME, ajoutée 30 min avant l'addition de PF14 sur des anneaux de vaisseaux possédant leur endothélium, et devient significatif à la dose 10µg/mL (Figure 30K). On peut alors supposer la présence de plusieurs effets tenseurs simultanés de PF14 au niveau des anneaux de vaisseaux. Au niveau des cellules endothéliales, PF14 agirait en stimulant la synthèse et la sécrétion du NO qui, en diffusant vers la média, agirait au niveau des cellules musculaires lisses en les relâchant. Cet effet est prépondérant mais n'est pas unique : il existerait au moins un autre effet opposé de PF14. Au niveau des cellules musculaires lisses, PF14 pourrait agir avec un récepteur dont la stimulation induirait un effet vasoconstricteur. L'effet global de PF14 serait alors un équilibre entre ces 2 effets qui, en présence d'un endothélium intègre, serait déporté vers le relâchement vasculaire.

L'existence d'une telle molécule à double effet vasomoteur n'est pas isolée. L'acétylcholine, qui induit un important effet vasorelaxant dépendant de l'endothélium à faibles doses, induit une remontée de la tension des vaisseaux à des doses plus élevées par son action constrictrice directe sur les CMLV (Andreasen, Kjoller et al. 1997). PF14 pourrait avoir le même type de double action. Cependant, il n'est pas possible de savoir d'après nos expériences si ceci pourrait être un effet général de la fibrilline-1 entière ou seulement une action du fragment PF14. Il se peut aussi que d'autres fragments de la molécule agissent différemment, conduisant à supprimer cet effet du fragment PF14 pour la protéine entière. De plus, il se peut que les molécules associées à la fibrilline-1 pour former les microfibrilles aient d'autres effets, en particulier opposés. Ceci pourrait expliquer pourquoi le fragment PF14 est vasoconstricteur en absence de l'endothélium alors que les MF n'ont aucun effet -vasoconstricteur ou vasodilatateur- dans cette situation.

Pour conclure, on démontre encore une fois un rapprochement des effets des 2 composés des fibres élastiques. L'élastine et les microfibrilles sont des vasodilatateurs endothélium-dépendants agissant via la synthèse de l'oxyde nitrique NO. Au contraire de la kE, la rTE et les MF n'agissent pas -ou peu- via l'ERC, laissant supposer la présence d'un autre récepteur, probablement une intégrine.

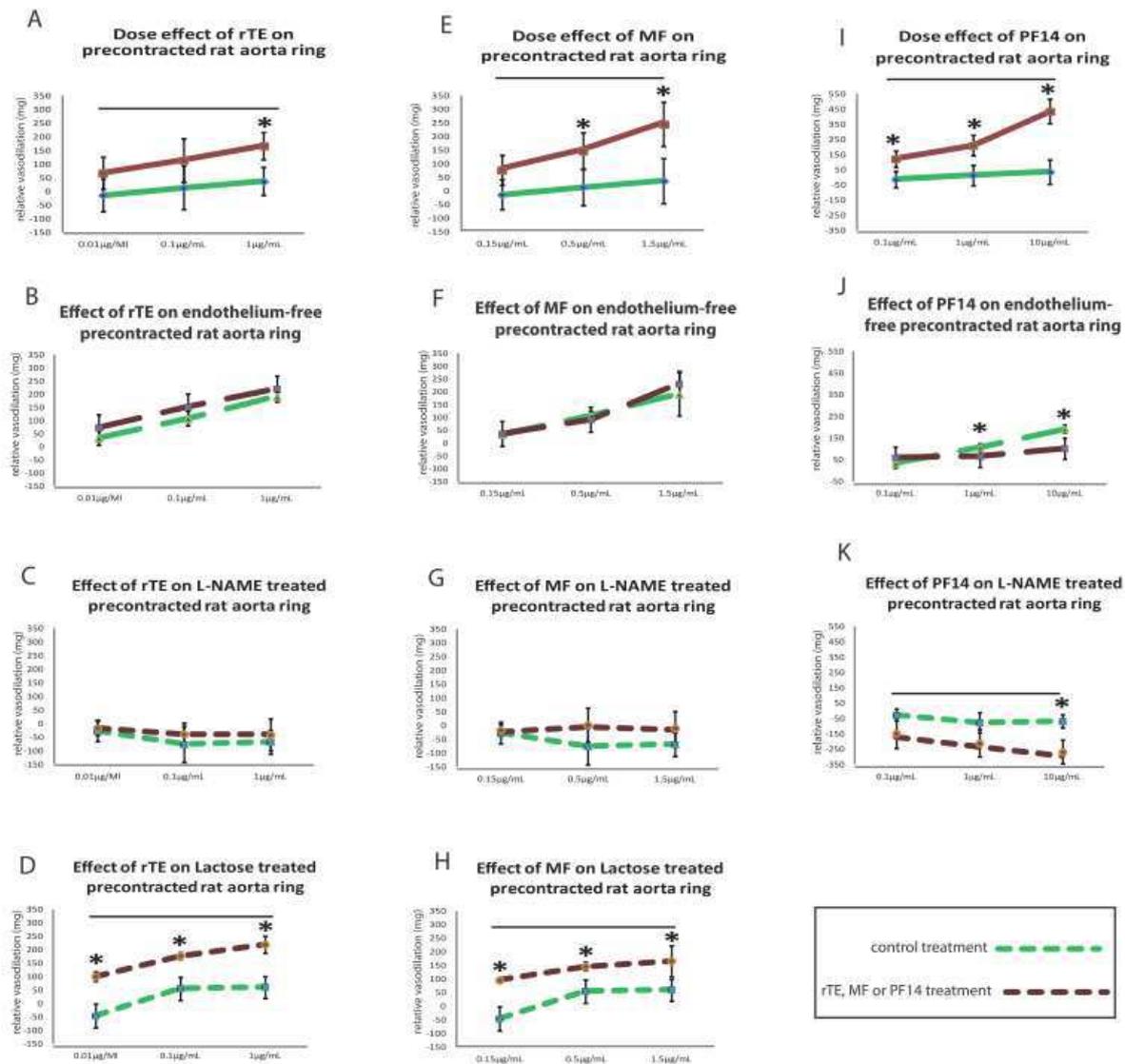


Figure 30: Effet de la rTE (A-D), des MF (E-H) et de PF14 (I-K) sur la tension des anneaux d'aorte de rat. Effet-dose des molécules en présence ou en absence de l'endothélium, ainsi qu'après inhibition de la synthèse de NO par le L-NAME ou blocage de l'ERC par le lactose. Les valeurs présentées sont des moyennes \pm SEM de la variation de tension induite par les molécules testées à partir de la valeur de tension initiale sous PE (970 mg). n = 3-6 pour chaque expérience. *Différence significative par rapport au contrôle correspondant (ANOVA 1 facteur, $P \leq 0.05$). Le trait horizontal représente un effet significatif général observé pour la molécule après un test ANOVA 2 facteurs ($P \leq 0.05$).

2.2 Articles 1 et 2 : Effet des composants des fibres élastiques sur les fonctionnalités des cellules endothéliales (HUVEC)

2.2.1 Introduction des articles 1 et 2

Les fibres élastiques, composées de microfibrilles riches en fibrilline-1 sur lesquelles se déposent les molécules d'élastine, contribuent de façon essentielle à la fonction mécanique des vaisseaux sanguins, en leur conférant leur propriété d'élasticité (Niederhoffer, Lartaud-Idjouadiene et al. 1997). Ces fibres contribuent au lissage du flux sanguin discontinu éjecté par le cœur et permettent ainsi la mise en place d'une hémodynamique adaptée (Arteaga-Solis, Gayraud et al. 2000). Cependant, la fonction des fibres élastiques n'est pas restreinte à une simple action mécanique : les syndromes dus à la déficience en élastine (syndrome de Williams-Beuren (WBS)) et en fibrilline-1 (syndrome de Marfan (MS)) occasionnent chez les patients des symptômes allant au-delà d'une modification certaine de la structure des fibres élastiques et des pressions sanguines. On observe dans ces syndromes une modification de la fonction et de l'organisation des cellules vasculaires aussi bien que des autres composants de la matrice extracellulaire (MEC) (Lacroix, Pezet et al. 2009). Au niveau cellulaire, dans le cas du SWB, ce sont les CMLV qui sont touchées et qui hyperprolifèrent, avec une augmentation du nombre d'unités lamellaires dans les parois artérielles (Karnik, Brooke et al. 2003, Lacroix, Pezet et al. 2009). Dans le cas du syndrome de Marfan, une apoptose affecte un grand nombre de cellules vasculaires. De plus, une altération des cellules endothéliales et leur décollement sont observés (Carta, Pereira et al. 2006, Chung, Au Yeung et al. 2007, Malinin, Pluskota et al. 2012). Ces altérations mettent en valeur le rôle important de l'interaction des cellules vasculaires, dont les cellules endothéliales, avec les composants des fibres élastiques. Ceci a aussi été démontré, en situation physiologique, par la mise en évidence du fait que les microfibrilles contribuent à l'ancrage des cellules vasculaires -dont les cellules endothéliales- dans l'aorte en cours de développement (Davis 1993, Davis 1994) et dans des modèles de cellules endothéliales en culture (Albig and Schiemann 2004, Mariko, Ghandour et al. 2010). *In vitro*, les microfibrilles induisent une augmentation du signal calcique des cellules endothéliales (HUVEC) (Mariko, Ghandour et al. 2010). De même, la fibrilline-1, composant essentiel des microfibrilles, est capable d'interagir avec les cellules endothéliales. Il a été montré qu'une des portions de la fibrilline-1 contenant le motif RGD, le fragment PF14, interagit avec les intégrines des cellules endothéliales, jouant un rôle dans leur adhésion, leur migration, leur prolifération et induisant une signalisation calcique par ces intégrines (Pfaff, Reinhardt et al. 1996, Bax, Bernard et al. 2003, Booms, Pregla et al. 2005, Bax, Mahalingam et al. 2007, Mariko, Ghandour et al. 2010).

Concernant l'élastine, il a été montré qu'elle augmente la survie et la migration cellulaire, l'expression et l'activation des proMMP2 et proMT1-MMP (Robinet, Fahem et al. 2005) Cette activation fait suite à l'activation de la voie PI3K/Akt/NOS résultant en la

production du NO qui interagit au niveau de ces cellules via la voie NO/GMPc/Erk1/2 (Robinet, Fahem et al. 2005, Fahem, Robinet et al. 2008). De plus, les peptides d'élastine induisent une augmentation du niveau de calcium cytosolique et nucléaire via l'activation de l'ERC et des microfilaments d'actine (Faury, Usson et al. 1998). De plus, les peptides d'élastine induisent une vasorelaxation dépendante de l'endothélium et de NO chez le rat (Faury, Ristori et al. 1995, Faury, Chabaud et al. 1997, Faury, Garnier et al. 1998).

Les connaissances sur l'interaction des composants des fibres élastiques avec les cellules endothéliales sont nombreuses, mais restent incomplètes. Dans cette thèse, nous avons cherché à compléter les résultats publiés par d'autres équipes et par notre laboratoire. J'ai participé aux premières études décrites plus haut consacrées à la signalisation induite dans les endothéliales « human umbilical venous endothelial cells » (HUVECs) par les microfibrilles et la fibrilline-1, en me consacrant particulièrement à la mise en évidence de l'implication des intégrines dans la voie de signalisation (Mariko, Ghandour et al. 2010). L'article qui a résulté de ces travaux est inséré dans les pages suivantes. Sur les mêmes cellules, nous avons ensuite : i) étudié de manière plus approfondie les mécanismes de signalisation impliqués dans ces interactions, et ii) comparé les effets des composants des fibres élastiques –élastine et microfibrilles- sur les signalisations et les fonctions cellulaires. En particulier, nous avons étudié l'effet produit par l'ajout des composants des fibres élastiques sur : i) la concentration du calcium intracellulaire libre et la signalisation intracellulaire induite par cette variation du niveau calcique, et ii) les fonctions cellulaires de migration, d'adhésion, prolifération et de synthèse et de dégradation de la MEC. Les composants des fibres élastiques utilisés sont la kappa-élastine (kE), produit résultant de la digestion du ligament du nuque de bœuf en milieu alcalin, la tropoélastine recombinante (rTE) produite chez E. coli, les microfibrilles (MF) produites par la digestion de l'aorte d'un veau nouveau-né, et PF14, fragment de la fibrilline-1 contenant la séquence RGD clonée et produit dans des cellules EBNA. Les résultats de ces travaux sont présentés dans les pages suivantes sous la forme d'un deuxième article à soumettre pour publication. .

2.2.2 *Article 1*

Microfibrils and fibrillin-1 induce integrin-mediated signaling, proliferation and migration in human endothelial cells

Boubacar Mariko,¹ Zeinab Ghandour,¹ Stéphanie Raveaud,¹ Mickaël Quentin,¹ Yves Usson,² Jean Verdetti,¹ Philippe Huber,¹ Cay Kielty,^{3,4} and Gilles Faury¹

¹Laboratoire "Physiopathologies Vasculaires: Interactions Cellulaires, Signalisation et Vieillessement," Université Joseph Fourier, CEA; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U882, Grenoble; ²Laboratory TIMC, Team "Reconnaissance des Formes et Microscopie Quantitative," Institut d'Ingénierie et de l'Information de Santé, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR5525, Grenoble; Université Joseph Fourier, La Tronche, France; ³Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, and ⁴Centre for Tissue Regeneration, University of Manchester, Manchester, United Kingdom

Submitted 20 August 2009; accepted in final form 27 July 2010

Mariko B, Ghandour Z, Raveaud S, Quentin M, Usson Y, Verdetti J, Huber P, Kielty C, Faury G. Microfibrils and fibrillin-1 induce integrin-mediated signaling, proliferation and migration in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 299: C977–C987, 2010. First published August 4, 2010; doi:10.1152/ajpcell.00377.2009.—Microfibrils are macromolecular complexes associated with elastin to form elastic fibers that endow extensible tissues, such as arteries, lungs, and skin, with elasticity property. Fibrillin-1, the main component of microfibrils, is a 350-kDa glycoprotein for which genetic haploinsufficiency in humans can lead to Marfan syndrome, a severe polyfeathered pathology including aortic aneurysms and dissections. Microfibrils and fibrillin-1 fragments mediate adhesion of several cell types, including endothelial cells, while fibrillin-1 additionally triggers lung and mesangial cell migration. However, fibrillin-1-induced intracellular signaling is unknown. We have studied the signaling events induced in human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) by aortic microfibrils as well as recombinant fibrillin-1 Arg-Gly-Asp (RGD)-containing fragments PF9 and PF14. Aortic microfibrils and PF14, not PF9, substantially and dose dependently increased HUVEC cytoplasmic and nuclear calcium levels measured using the fluorescent dye Fluo-3. This effect of PF14 was confirmed in bovine aortic endothelial cells. PF14 action in HUVECs was mediated by $\alpha\text{v}\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins, phospholipase-C, inositol 1,4,5-trisphosphate, and mobilization of intracellular calcium stores, whereas membrane calcium channels were not or only slightly implicated, as shown in patch-clamp experiments. Finally, PF14 enhanced endothelial cell proliferation and migration. Hence, fibrillin-1 sequences may physiologically activate endothelial cells. Genetic fibrillin-1 deficiency could alter normal endothelial signaling and, since endothelium dysfunction is an important contributor to Marfan syndrome, participate in the arterial anomalies associated with this developmental disease.

adhesion; calcium signaling; Marfan syndrome

LARGE ARTERIES have an essential mechanical role in the smoothing of the pulsatile blood flow and pressure during the cardiac cycle. This function is made possible by extracellular elastic components of the arterial wall. In many invertebrates, with an open and low pressure circulatory system, arterial elasticity is mainly provided by microfibrils, a supramolecular assembly of more than 17 proteins, including fibulins, emilins, latent transforming growth factor- β (TGF- β) binding proteins (LTBPs), and fibrillins (16, 26, 34). Microfibrils and fibrillins

were rather conserved during evolution and present clear similarities between invertebrate and vertebrates (9, 55, 65). In vertebrates, arterial elasticity, more adapted to the close and high-pressure circulatory system, is provided by elastic fibers made of elastin (90%, only present in vertebrates) and microfibrils (10%) (58). Elastin is the main contributor to the elastic properties of these fibers, although microfibrils moderately participate in the elastic fiber mechanics (43). As a consequence, elastin or fibrillin-1 haploinsufficiency induces arterial mechanics alteration and remodelling (18, 42, 45, 52). During development of elastic tissues, microfibrils are the first elastic fiber structure that is formed. Tropoelastin, the precursor of elastin, is then deposited on the microfibril scaffold before molecular rearrangement, which leads to the mature/functional elastic fiber (34, 75).

Besides their mechanical role, microfibrils and microfibrillar components can also be involved in cell adhesion. In the developing aorta, microfibrils/fibrillin come in direct contact with endothelial cells (by passing through the basement membrane) and smooth muscle cells and mediate the anchoring of these cells to the internal elastic lamina (13, 14). The anchoring activity of microfibrils seems to be mediated at least in part by their main component fibrillin-1, since 1) fibrillin-1 domains extend out of microfibrils (38) and 2) besides modulating extracellular matrix synthesis and deposition, fibrillin-1 fragments mediate adhesion and spreading of several cell types in vitro, including fibroblasts, smooth muscle cells, and endothelial cells (5, 53, 61, 70).

Fibrillin-1 is a 350-kDa cystein-rich glycoprotein that has first been characterized in humans, mice, and chickens (60, 75). Autosomal dominant mutations in the fibrillin-1 gene can be responsible for the human genetic disorder Marfan Syndrome (MFS), which features, at the vascular level, aneurysms and aortic disruptions (32, 46). One of the pleiotropic causes of MFS seems to be endothelial dysfunction, since it has been observed in these patients: 1) reduced flow-mediated vasodilation, suggesting an altered endothelial cell signaling, and 2) elevated plasma levels of homocysteine, which attenuate endothelial function and limits nitric oxide (NO) bioavailability (22, 30, 71). The participation of fibrillin-1 in endothelial cell anchoring together with the observation of an endothelial detachment in fibrillin-1 null mice (*Fbn1*^{-/-}), a mouse model for MFS (11), suggests that binding of fibrillin-1 to the endothelial cell is important in arterial morphogenesis and physiology. Alteration of this interaction may be one of the causes of

Address for reprint requests and other correspondence: G. Faury, LAPV/INSERM U882, iRTSV, CEA-Grenoble, 17 rue des Martyrs, 38054 Grenoble cedex 9, France (e-mail: Gilles.Faury@ujf-grenoble.fr).

the vascular dysfunctions and remodelling observed in MFS. To support these hypotheses, it has been found that the Arg-Gly-Asp (RGD) motif in the fourth TGF β -binding protein-like domain of human fibrillin-1 is flexible and accessible and regulates cell adhesion and spreading through binding to integrins (40). The integrins involved are, in particular, $\alpha_v\beta_3$ or $\alpha_5\beta_1$ in fibroblasts and β_1 -subunit in smooth muscle cells (5, 53, 61) and the subunits α_v , α_5 , and β_1 in endothelial cells (70). However, the signaling mechanisms directly induced by fibrillin-1 in endothelial cells are unknown. Since endothelial integrins and intracellular calcium level play an important role during embryonic development and angiogenesis (50, 64), we have investigated here the potential integrin-mediated signaling events and functions triggered by microfibrils and fibrillin-1 fragments in human endothelial cells.

MATERIALS AND METHODS

A more detailed materials and methods is also provided as online supporting information.

Cell Culture

Human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) were isolated using a technique adapted from Jaffe et al. (19, 29). Cells were harvested from the umbilical vein by a 10-min incubation at 37°C with collagenase 1A and cultured in 0.25 mg/ml human fibronectin-coated dishes in medium 199 containing 22% human serum, streptomycin (0.1 mg/ml), penicillin (100 UI/ml), and L-glutamine (2 mmol/l). Umbilical cords were harvested after birth, with full informed consent of the mother, according to the French government order no. 2007-1220 from August 10, 2007. Each cell culture was prepared by pooling the endothelial cells from two to three umbilical cords. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were prepared by collagenase treatment of bovine aorta, as described previously (3).

Production of Aortic Microfibrils and Fibrillin-1 Fragments

Microfibrils were isolated from bovine aorta, in native and non-denaturing conditions, as previously described (4, 15, 38, 10, 44). A piece of the aorta from a newborn calf was incubated for 18 h at 4°C with 0.5 mg/ml purified bacterial collagenase 1A, in the presence of hyaluronidase (5 U/ml) and freshly prepared protease inhibitors. In both cases, segments of bovine aortas were collected at the slaughterhouse immediately after the animal's death. Microfibrils were collected after passage of the supernatant through a CL-2B sepharose column and purified by CsCl density gradient centrifugation. In our experiments, aortic microfibrils (average molecular mass \approx 15,000 kDa) were used at 0.15 μ g/ml (\approx 10⁻¹¹ mol/l), 0.5 μ g/ml (\approx 3.3 \times 10⁻¹¹ mol/l), and 1.5 μ g/ml (\approx 10⁻¹⁰ mol/l).

The cloning, expression, and purification of RGD-containing recombinant human fibrillin-1 fragments PF9 (residues 1528–1807) and PF14 (residues 1362–1688), using the mammalian expression vector pCEP-pu/AC7 and 293-EBNA cells, has been described (5, 6). The domains of the fibrillin-1 fragments are presented in the online supporting information.

RGD-RGA PF14 mutant (PF14-RGA) was produced using a site-directed mutagenesis of aspartic acid 1541 to alanine, as described (6). Validation of the purity and folding of all the fragments used were performed, as described (6).

[Ca²⁺]_i in Adhering HUVEC

Measurements and analyses were performed either by confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 410, Carl Zeiss, Jena, Germany) or by classical microscopy (CellR system, Olympus, Rungis, France) using the calcium-sensitive fluorescent dye Fluo-3/AM (ex-

citation: 488 nm; emission: >510 nm, purchased from Sigma-Aldrich, St. Quentin-Fallavier, France), according to the previously described procedures (19). The cells were bathed in a physiological salt solution composed of (in mmol/l) 125 NaCl, 5.6 KCl, 2.4 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 11 D-glucose, and 10 HEPES; pH 7.4. In the figures, each tracing represents Fluo-3 fluorescence in one cell. Bradykinin, a reference agent elevating intracellular free calcium concentration ([Ca²⁺]_i) in endothelial cells, was used to verify cell functionality. In some experiments, 10 μ g/ml LM609 or JBS5 blocking antibodies (Chemicon Europe, Southampton, UK) to integrins $\alpha_v\beta_3$ or $\alpha_5\beta_1$, respectively, were applied to HUVECs 30 min before the addition of PF14 and during the experiment.

Other experiments were conducted using the calcium-sensitive dye Fura-2 (Sigma-Aldrich) in place of Fluo-3, to obtain actual intracellular calcium concentrations. The loading and analysis procedures were previously described (17).

Electrophysiological Recording

Calcium current recordings (imposed potential: +20 mV) were performed using the cell-attached patch-clamp technique (single channel) and materials previously described (19). Cells were immersed in a Tyrode solution containing (in mmol/l) 125 NaCl, 5.6 KCl, 2.4 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 HEPES, and 11 glucose, pH 7.4. The patch pipette was filled with a solution containing Ba(CH₃COO)₂ (90 mmol/l) and HEPES (10 mmol/l), pH 7.4. Resting potential (V_m) equals -57 ± 4 mV ($n = 35$) for nondividing cells (19). The recorded transmembrane currents were integrated and analyzed using the software Biopatch (Biologic, Claix, France).

siRNA Knockdown of Integrin Subunits α_v and α_5

siRNA synthesis. Control and α_5 integrin small interfering RNAs (siRNAs) were purchased as four oligonucleotide Smart Pools (Dharmacon, Lafayette, CO). siRNAs targeting α_v integrin were designed using DSIR algorithm (67) and synthesized by Dharmacon.

siRNA transfection. Confluent HUVECs were cultured at 8×10^5 cells in 60-mm diameter dishes for 24 h. Cells were then trypsinized and transfected with siRNAs at 1 nM using AMAXA as previously described (63). The subsequent decrease in α_5 expression was assessed by immunoblotting (-72% , see Fig. 5A). α_v is a protein difficult to substantially knock down (23), and one transfection with α_v siRNAs only produced a limited extinction (-25%). Therefore, cells were transfected a second time with α_v siRNAs 48 h after the first transfection. This led to a more significant extinction of α_v (approximately equal to -71%), which was assessed by flow cytometry (see Fig. 5, C and D) since, despite the use of several commercial antibodies, α_v immunoblotting never produced clearly specific bands. Transfected cells were then cultured in 35-mm diameter, fibronectin-coated, glass-bottom dishes and used for calcium measurement experiments.

Antibodies. Polyclonal rabbit antibody to integrin α_5 and mouse monoclonal antibody to integrin α_v were from Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Germany). Monoclonal mouse antibody to anti- β -tubulin was from Sigma-Aldrich.

Cell lysis and Western blotting. HUVEC monolayer extracts were electroporated and then centrifuged at 15,000 g for 5 min at 4°C. Protein concentration of the lysates was then determined with a Micro-BCA kit (Pierce, Rockford, IL). After polyacrylamide gel electrophoresis of the protein and electroblotting onto nitrocellulose, the blots were incubated overnight (4°C) with the primary antibodies, rabbit anti-integrin α_5 , or anti-tubulin in blocking buffer. The antigen was then detected using the ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech-GE Healthcare, Saclay, France) with a peroxidase-labeled goat anti-rabbit antibody.

Flow cytometry. Aliquots of 10⁶ cells were centrifuged and resuspended in 1% fetal calf serum containing PBS in the presence of anti- α_v -primary antibody and, after washing was completed, the cells

were incubated for 30 min with the secondary antibody. Cells were then pelleted, resuspended in 0.5 ml phosphate-buffered saline containing 1% BSA, and analyzed on a fluorescence-activated cell sorter analyzer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). A fluorescence threshold separating the αv -negative cells (M1) from αv -positive cells (M2) was set using autofluorescence of unlabeled/untransfected cells as negative control. In each experiment, the relative αv content in cell populations was estimated as the product of the percentage of αv -positive cells (M2, see Fig. 5C, table, column head: "% Gated") by the mean αv content per αv -positive cell. The mean αv content per αv -positive cell is assumed to be represented by the mean fluorescence level per cell (M2, Fig. 5C, table, column head: "Mean") from which the mean autofluorescence of unlabeled cells (measured at a value of 12.9) was deducted. The value obtained for control siRNA-transfected cells was considered as the reference, normalized to a value of 100.

HUVEC adhesion assay. 96-Well microplates were coated with different concentrations of human plasma fibronectin and fibrillin-1 recombinant fragments (PF14 and PF9) and kept at 4°C overnight. BSA (10 mg/ml) was used as negative control. After the unbound peptides were removed, the nonspecific binding was blocked by 10 mg/ml BSA for 2 h at room temperature. HUVEC were trypsinized and seeded at 3×10^4 cells/well in serum-free medium and incubated for 1 h, 30 min at 37°C, 5%CO₂. Nonadherent cells were removed and adherent cells were fixed with 10% glutaraldehyde in Percoll for 5 min. The wells were washed with phosphate-buffered saline and stained with crystal violet 0.1% (wt/vol) in water for 30 min. The cells were washed with water and lysed in 0.2% Triton X-100 in water for 2 h. The absorbance was measured at 460 nm with an ELISA plate reader.

HUVEC Proliferation

Two different methods used were the following.

Trypsinization/cell count method. HUVEC were trypsinized and resuspended in deprived culture medium containing 5% human serum to limit spontaneous cell proliferation. Two hours after cell

seeding, the dishes were incubated with 1 μ g/ml (≈ 26 nmol/l) PF14 or PF9, or solvent of these fibrillin-1 fragments. After 48 h, cells were trypsinized and counted using a Kova cell count unit. Proliferation rate was $(\text{Cell number}_{48\text{h}} - \text{Cell number}_{0\text{h}}) \times 100 / \text{Cell number}_{0\text{h}}$.

WST-1 colorimetric method. The measurement is based on the ability of mitochondrial dehydrogenases of viable cells to cleave tetrazolium salts (2). Two hours after cell plating, HUVECs were treated with PF14 (1 μ g/ml; ≈ 26 nmol/l) or solvent alone for 48 h. Cell proliferation reagent 4-[3-[4-iodophenyl]-2-(4-nitrophenyl)]-2H-5-tetrazolio-1,3-benzene disulfonate (WST-1, 10 μ l/well) (Roche Diagnostics, Meylan, France) was added. Absorbance of the samples, proportional to the viable cell number, was then measured after 3 h at 450 nm using a microplate reader, and background absorbance was deducted. Proliferation rate was $(\text{Absorbance}_{48\text{h}} - \text{Absorbance}_{0\text{h}}) \times 100 / \text{Absorbance}_{0\text{h}}$.

Cell Migration/Haptotaxis-Transwell Assay

Cell migration was assayed using a modified Boyden chamber as previously described (39). The lower side of the transwell inserts (3 μ m pore; Falcon, Becton-Dickinson) was previously coated overnight with PF14 and PF9 fragments at 10 μ g/ml.

Confluent monolayer of HUVEC was labeled in serum-free medium 199 with CellTracker CMRA Orange (10 μ M) for 45 min at 37°C. Cells were rinsed and incubated in fresh medium for an additional 45 min at 37°C to allow leakage of unbound fluorophore.

Fluorophore-labeled HUVECs were trypsinized and suspended at the final concentration of 2×10^5 cells/ml in medium 199 containing 0.5% human serum. The cell suspension (100 μ l) was added to the upper side of the transwell inserts. The inserts were placed in 24-well plates (Becton-Dickinson) containing 500 μ l medium 199 with 0.5% human serum (control) and incubated at 37°C. The migration of cells through the optically opaque insert membrane to the lower chamber was measured by fluorescence measurement at 0 and 24 h. The fluorescence level difference between 0 and 24 h was representative of the number of migrated cells.

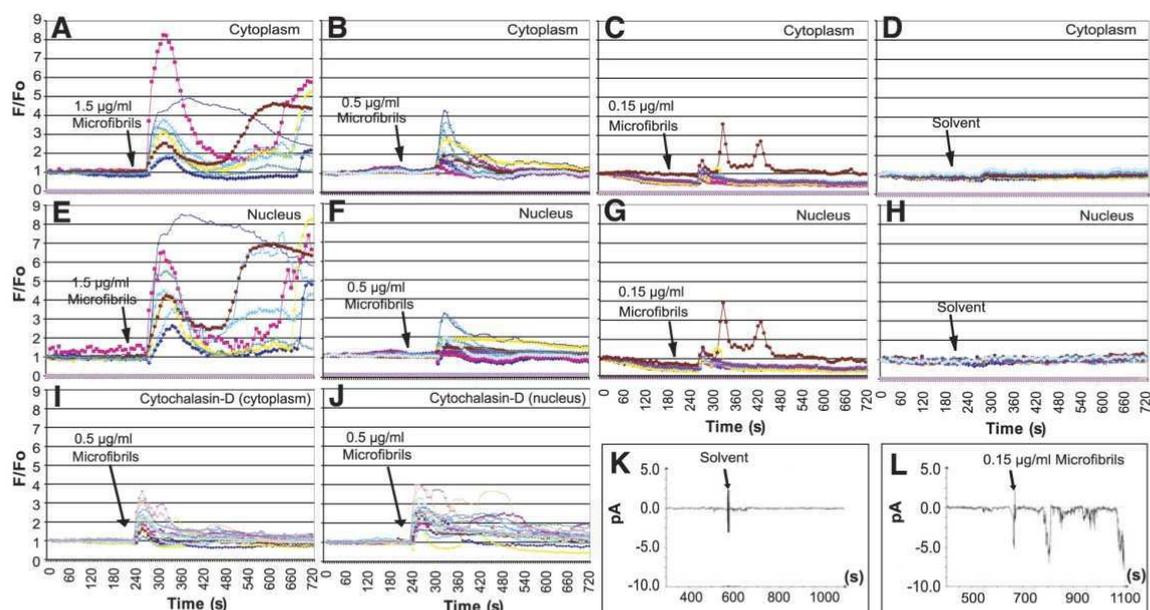


Fig. 1. Effect of aortic microfibrils on human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) nuclear and cytoplasmic $[\text{Ca}^{2+}]$. A–H: dose effect of microfibrils. $n = 27$ –30 cells (control: $n = 56$). I, J: effect of microfibrils (0.5 μ g/ml) after 45 min incubation with cytochalasin-D (1 μ mol/l) ($n = 28$ cells). K, L: microfibril-induced activation of membrane calcium channels recorded in patch-clamp experiments. All experiments were at least triplicated. Representative experiments are presented.

HUVEC Wound Healing Assay

This *in vitro* assay aims at evaluating the cellular proliferation and migration capabilities when some cells are destroyed in a confluent monolayer, leading to replacement of the missing cells. Wounds were produced *in vitro* by scratching the cell layer using a pipette tip, and wound closure was monitored over time as previously described (1). HUVECs were grown in human plasma fibronectin-coated plates until confluence in complete culture medium and then incubated in deprived culture medium (5% human serum instead of 22%) overnight. Cell cultures were imaged at 0 and 8 h after being wounded and after the addition of solvent, PF9, and PF14 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Wound areas were measured from the images using Image J software (NIH). Wound closure rate is $(\text{Wound area}_{0\text{h}} - \text{Wound area}_{8\text{h}}) \times 100/\text{Wound area}_{0\text{h}}$.

Data Analysis

When applicable, groups were compared by using one- or two-way ANOVAs followed by Fisher's Least Significant Difference test for paired comparisons, and presented values were means \pm SE. $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

Action of Microfibrils on $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Addition of aortic microfibrils produced substantial, dose-dependent and transient elevations of Fluo-3 fluorescence in HUVEC cytoplasm and nucleus, indicative of free calcium level increases. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevations, present in most cells, were in the ranges of 1.3- to 8-fold at 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.1- to 4-fold at 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, and 1- to 3-fold at 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ microfibrils (Fig. 1, A–H). Regarding the cytoplasmic calcium rise, the effects of 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (peak mean value = 3.5 ± 0.3 -fold) and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ microfibrils (peak mean value = 2.1 ± 0.1 -fold) were significantly higher than those produced by 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ microfibrils (peak mean value = 1.3 ± 0.1 -fold) or the solvent alone (mean value = 1.1 ± 0.0 -fold) (two-way ANOVA, $P \leq 0.05$). No significant difference could be detected between the effects of 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ microfibrils and solvent. Regarding the nuclear calcium rise, the effects of 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.5 and 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ microfibrils (peak mean values = 4.9 ± 0.4 , 2.1 ± 0.1 , and 1.8 ± 0.2 -fold, respectively) were significantly greater than those produced by the solvent alone (mean value = 1.2 ± 0.0 -fold) (two-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

Since microfibrils interact with integrins (5, 35), which are membrane receptors linked to actin microfilaments, we investigated the possibility of an actin-mediated transduction of the microfibrillar signal. After treatment of HUVEC with the actin-depolymerizer cytochalasin-D, the cells classically changed their morphology to a more spread phenotype. When 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ microfibrils (an intermediate concentration high enough to trigger substantial raises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and low enough to avoid a potential plateau effect of the high doses) was applied, cytochalasin-D-treated HUVEC had a response to similar to that of untreated cells; i.e., a 1.5- to 4-fold increase in both nuclear and cytoplasmic fluorescence. This indicated that actin microfilaments did not mediate the microfibril-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ signaling in HUVECs (Fig. 1, B, F, I, and J).

The possibility of an involvement of Ca^{2+} channels in this mechanism was then studied by using the patch-clamp technique. First, addition of microfibril solvent did not lead to activation of membrane calcium channels showing that: 1) the solvent is inactive on calcium channels, and 2) HUVECs

present a low basal activity of their membrane calcium channels, with no spontaneous activation over time (Fig. 1K). Conversely, addition of aortic microfibrils (0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) produced a strong activation of calcium channels (Fig. 1L). Microfibril concentrations higher than 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were not used since preliminary experiments have shown that such concentrations induced too high activity of calcium channels, rapidly breaking the seal and ending the experiment. Intensity-voltage experiments were then performed, and unitary currents were measured at each imposed potential, resulting in a calculated conductance of the activated calcium channels in the range of 6 pS. Similar low conductance calcium channels (<16 pS) have previously been observed in endothelial cells and other cell types and involved in the response to elastin and growth factors (19, 20, 48, 66).

Action of Fibrillin-1 Fragments on $[\text{Ca}^{2+}]_i$

To verify whether the major component of microfibrils, i.e., fibrillin-1, was responsible for the effects triggered in HUVEC by aortic microfibrils, two overlapping fibrillin-1 RGD-containing fragments PF9 and PF14 were used. When compared with the control (Fig. 2A), PF9 did not modify HUVEC $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at all the concentrations used (Fig. 2, B–E). On the contrary, PF14 application triggered a clear dose-dependent elevation of

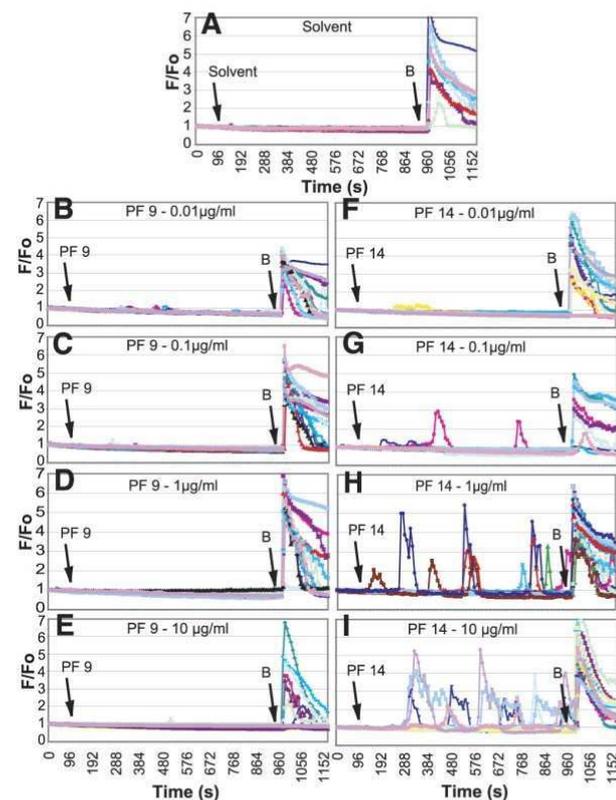


Fig. 2. Dose effect of fibrillin-1 fragments PF9 and PF14 on HUVEC intracellular free Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Addition of solvent (A) or different concentrations of PF9 (B–E) or PF14 (F–I). B, bradykinin (1 $\mu\text{mol}/\text{l}$). Representative experiments are presented. In each case, $n = 30$ –45 cells from at least 3 different cell cultures.

[Ca²⁺]_i in these cells. The fluorescence peaks appearing after addition of PF14 reached a value up to 2- to 5-fold the initial fluorescence level at the highest concentrations (Fig. 2, *F-I*). Also, some cells exhibited a unique fluorescence peak produced by PF14 (5–10% of the cells at 0.01–0.1 μg/ml PF14; ≈25% at 1 μg/ml PF14; ≈15% at 10 μg/ml PF14), while other cells responded several times by fluorescence peaks (≈0% at 0.01–0.1 μg/ml PF14; ≈15% at 1 μg/ml PF14; ≈30% at 10 μg/ml PF14). The average values of calcium peaks were in the ranges of 2.0 ± 0.4- to 2.6 ± 1.0-fold at 0.01–0.1 μg/ml PF14 and 4.2 ± 0.4- to 4.9 ± 0.2-fold at 1–10 μg/ml PF14. It was observed, however, that some cells did not respond to PF14 (≈90% at 0.01–0.1 μg/ml PF14; ≈55–60% at 1–10 μg/ml PF14) within the time window of the experiment, whereas 1 μmol/l bradykinin (a reference activator of endothelial [Ca²⁺]_i) triggered a strong increase in [Ca²⁺]_i in most cells, confirming that HUVEC were functional even when nonresponding to PF14 (Fig. 2). Similar effect of PF9 and PF14 were also obtained in BAECs, which were responsive for ≈30% of them. However, the calcium peak amplitudes induced by 1 μg/ml PF14 (ranging from 1.2- to 3.4-fold, peak mean value: 2.4 ± 0.3-fold) were of lower amplitude in these cells than in HUVECs (online supplemental Fig. 1, *A-C*). Nevertheless, these results suggest that PF14-induced [Ca²⁺]_i signaling is a general mechanism in endothelial cells.

To verify whether PF14 acts on [Ca²⁺]_i in a longer term, HUVEC, free calcium concentrations measured by using the dye Fura-2 were compared before and 24 h after addition of 1 μg/ml PF14 to the cell culture medium. No calcium peak could be observed, and [Ca²⁺]_i values were not significantly changed by the treatment: 109 ± 21 nM at time 0 h and after 24 h, 143 ± 23 nM in the presence of solvent and 138 ± 19 nM in the presence of PF14 (*n* = 29–32 cells in each group, paired comparisons performed using one-way ANOVAs, *P* > 0.25 for the three comparisons). Our results suggest that PF14 does not durably modify endothelial free calcium concentration.

Similar to the effects previously observed in elastin-stimulated HUVECs (19), the calcium increases in response to microfibrils or PF14 were often asynchronous and of various amplitudes (no response to eightfold, single or multiple peaks) from cell to cell. This is possibly due the short time window of the experiment or, alternatively, to the presence of different endothelial cell subpopulations (our cultures being made of pooled cells from several individuals) differing from each other by the phase in the cell cycle or the receptor allele or expression level, as suggested by the existence of a genotype-dependent expression of endothelial NO synthase alleles (62). PF9 or PF14 (1 μg/ml; ≈26 nM) were used in all further experiments.

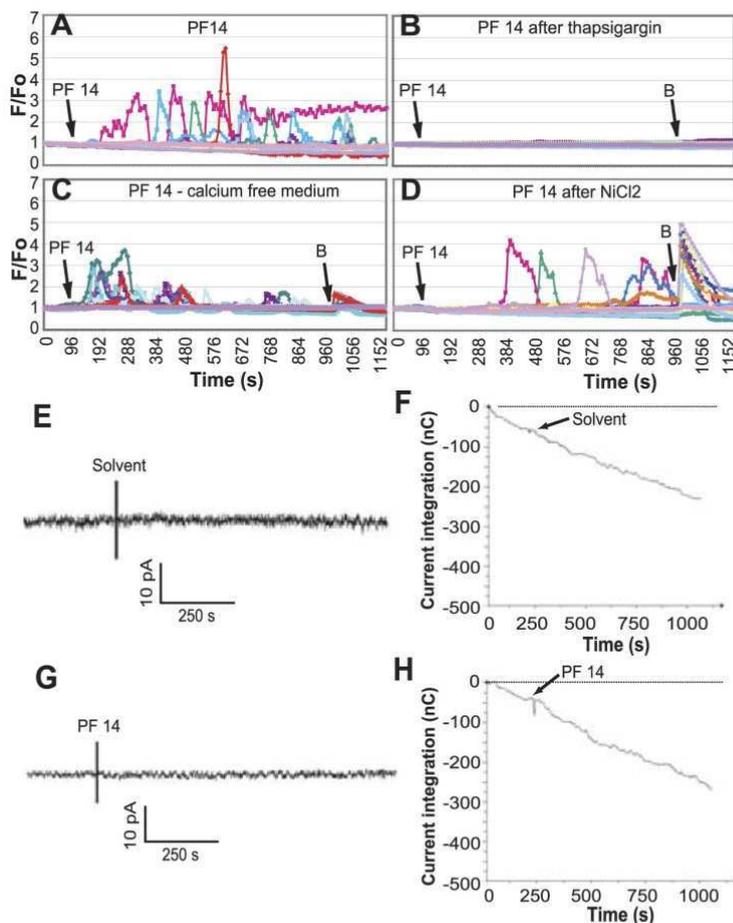


Fig. 3. Calcium origin in PF14-induced [Ca²⁺]_i elevations in HUVECs. Effect of PF14 (1 μg/ml) alone (*A*), after thapsigargin (1 μmol/l) (*B*), and bathing in calcium-free medium (*C*) or NiCl₂ (1 mmol/l) (*D*). B, bradykinin (1 μmol/l). *n* = 30–45 cells in each case. Effect of solvent (*E*, *F*; *n* = 5) or PF14 (1 μg/ml) (*G*, *H*; *n* = 10) on membrane calcium channels, recorded in patch-clamp experiments. Representative experiments are presented.

Origin of Calcium Leading to PF14-Triggered $[Ca^{2+}]_i$ Elevation in HUVECs

The question of the origin of the calcium mobilized by PF14 stimulation was then raised. When compared with control, emptying of the intracellular calcium stores by thapsigargin prevented PF14 to induce a $[Ca^{2+}]_i$ increase, suggesting a major role of the intracellular calcium stores in PF14 signaling (Fig. 3, A and B). This result was supported by another series of experiments aiming at the verification of the role of extracellular calcium influx in the PF14-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation. Placing the cells in a calcium-free medium; i.e., preventing calcium influx in the cells, had little effect on the general profile of $[Ca^{2+}]_i$ increases induced by PF14, except for a progressive decrease with time in the calcium peak sizes (Fig. 3C). This decrease is likely a side effect of bathing the cells in calcium-free medium, which induces a progressive emptying of the intracellular calcium stores (41) and therefore reduces the quantity of calcium that can be mobilized from the stores over time.

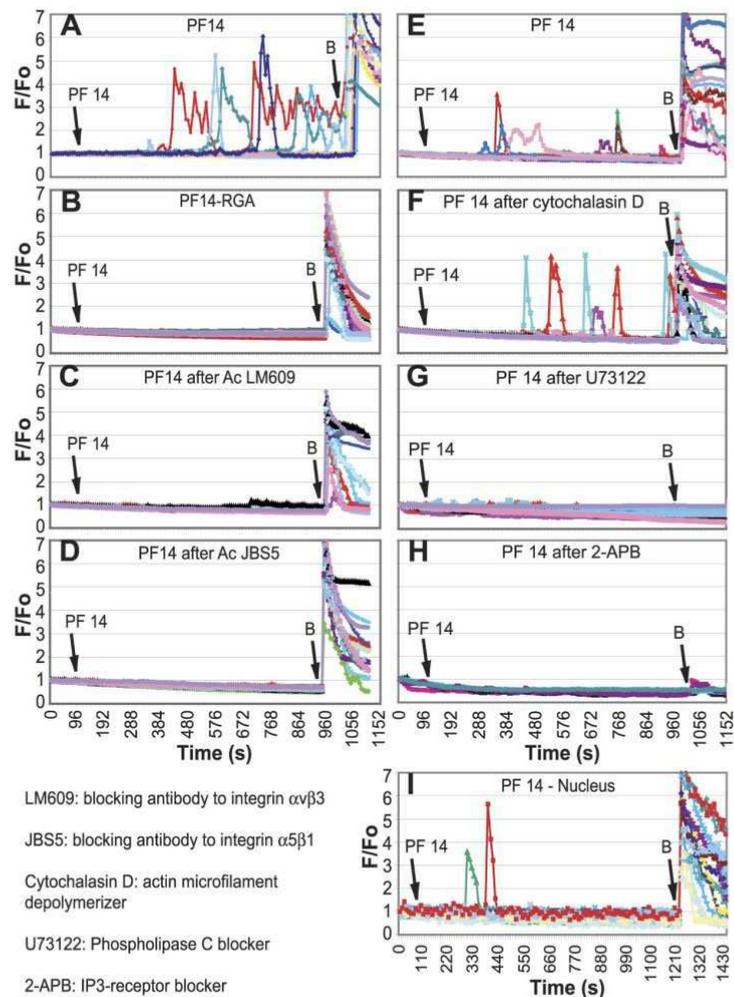
Also, blockade of HUVEC calcium channels by nickel chloride did not substantially inhibit PF14-induced elevation of

$[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 3D). This feature confirmed that the origin of the calcium mobilized by PF14 was mainly from the intracellular calcium stores, while extracellular calcium influx took a modest part, if any, in this mechanism. To further verify the minor involvement of extracellular calcium influx in the PF14-triggered elevation of $[Ca^{2+}]_i$, the effect of PF14 on the activity of membrane calcium channels was investigated using the patch-clamp technique in HUVECs. PF14 was not able to induce a calcium channel activity in 9 of 10 cells studied (Fig. 3, E–H), confirming the weak involvement of calcium influx.

Receptors and Signaling Pathways Activated by Fibrillin-1 Fragment PF14

To uncover the receptors involved in the PF14-induced calcium signaling pathway, a mutated form of PF14, PF14-RGA, in which the RGD sequence was replaced by RGA (which does not bind to integrins), was applied to the cells. As opposed to the clear response to PF14 (Fig. 4A), PF14-RGA did not trigger any response from HUVECs (Fig. 4B), suggesting an implication of integrins in the signal transduction. This was supported by the results from other experiments using

Fig. 4. PF14-activated receptors and signaling pathways mediating $[Ca^{2+}]_i$ elevations in HUVECs. PF14 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) addition: alone (A, E), PF14-RGA (B), plus LM609 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (C), plus JBS5 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (D), or after cytochalasin-D (1 $\mu\text{mol}/\text{l}$) (F), U73122 (1 $\mu\text{mol}/\text{l}$) (G), or 2-APB (50 $\mu\text{mol}/\text{l}$) (H). I: effect on nuclear $[Ca^{2+}]_i$ (confocal microscopy). B, bradykinin (1 $\mu\text{mol}/\text{l}$). Representative experiments are presented. $n = 30\text{--}45$ cells in each case.



blocking antibodies to integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$. Both antibodies abolished the response of HUVEC to PF14, suggesting the implication of the two above cited integrins in the transduction of the PF14 signal and suggesting that both integrins are needed for PF14 signaling (Fig. 4, C and D). The involvement of $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ in PF14 signaling was further verified by using siRNA-mediated downregulation of these integrins. HUVEC transfection by siRNAs targeting either αv or $\alpha 5$ induced a substantial drop of the content of these integrin subunits in the cells (Fig. 5, A, C, and D) and strongly decreased, if not abolished, in both cases the cell response to PF14 (Fig. 5, B and E). This confirmed the implication of these

two integrins in the transduction of the PF14 signal, which was also supported by the fact that classical ligands of $\alpha v\beta 3$ (vitronectin) and $\alpha 5\beta 1$ (fibronectin) produced the same type of calcium responses than those induced by PF14 in HUVECs (online supplemental Fig. 2).

The signaling pathway leading to PF14-induced elevation of $[Ca^{2+}]_i$ was then studied. When compared with control, depolymerization of actin microfilaments by cytochalasin D did not significantly modify HUVEC response to PF14 (Fig. 4, E and F), suggesting that PF14 signaling is not a mechanotransduction process mediated by integrin-connected actin microfilaments. However, since integrins are known to activate the Src

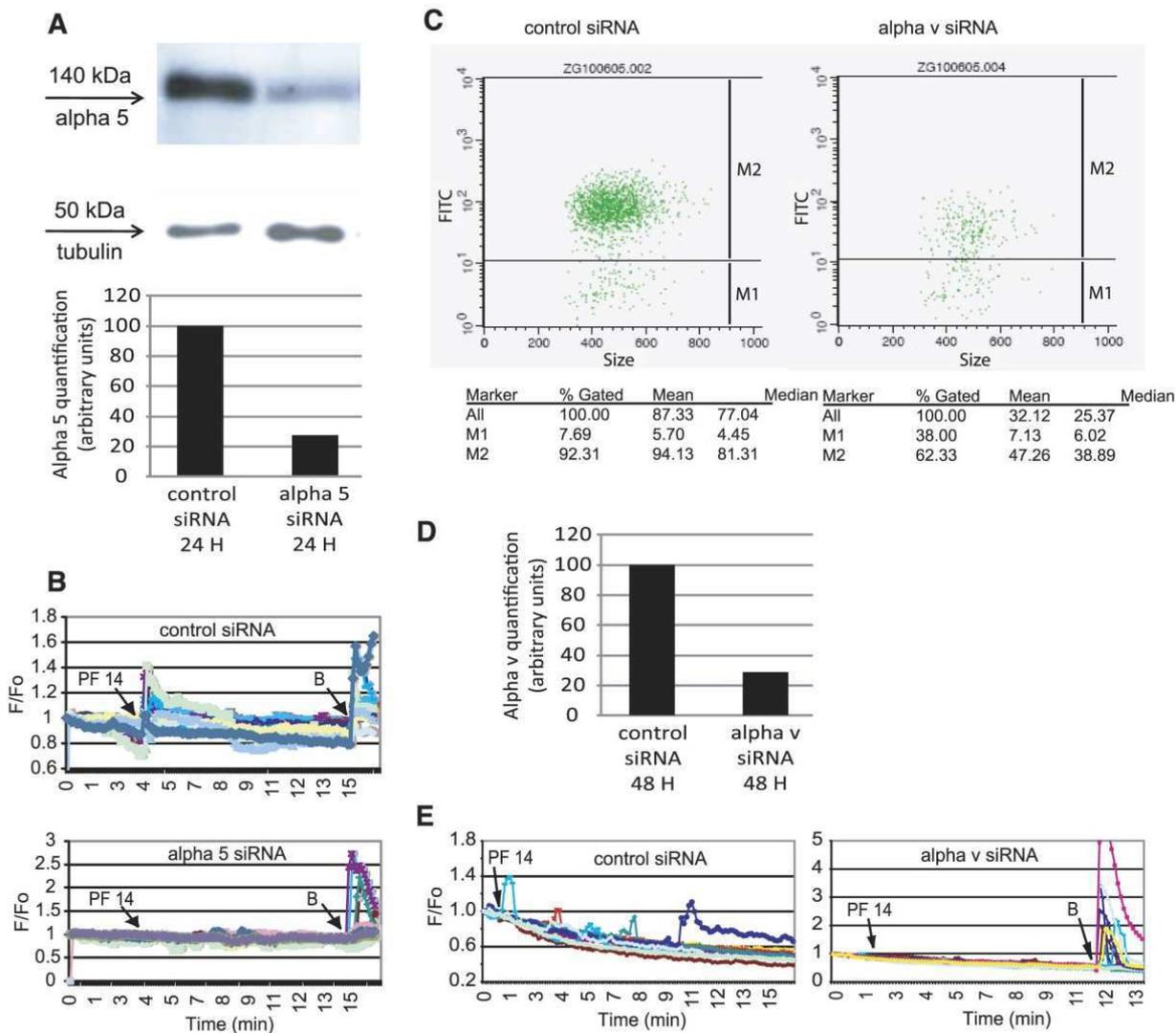


Fig. 5. Effects of small interfering RNA (siRNA) targeting of integrin subunits αv and $\alpha 5$ on $[Ca^{2+}]_i$ elevations induced by PF14 in HUVECs. Western blot and related quantification compared with tubulin of $\alpha 5$ (A) and effects of 1 $\mu g/ml$ PF14 on $[Ca^{2+}]_i$ (B) in HUVECs transfected with control or $\alpha 5$ siRNAs. Flow cytometry analysis (C) and estimation of relative quantity (D) of αv , and effects of 1 $\mu g/ml$ PF14 on $[Ca^{2+}]_i$ (E) in HUVECs transfected with control or αv siRNAs. In C, the graphs present the number of cells negative (M1) or positive (M2) for αv after transfection with control (left) or αv (right) siRNAs. Quantitative analyses are provided in the corresponding tables: Mean = mean fluorescence per cell ; % Gated = cell percentage in the group. When compared with the cells transfected with control siRNA, αv -positive cells were present in a lower percentage and expressed less αv after transfection with αv siRNA. PF14-induced $[Ca^{2+}]_i$ increases were of lower amplitudes in HUVECs transfected with control siRNA than in untransfected cells (Fig. 2), probably as a consequence of the cell transfection processes. B, bradykinin (1 $\mu mol/l$). The experiments were duplicated.

kinase, which subsequently activates phospholipase C (PLC) (31), we have also investigated this signaling pathway. When PLC was blocked by U73122, the PF14-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation was abolished, suggesting an involvement of at least one of the reaction products of PLC as a signaling molecule (Fig. 4G). Since inositol-1,4,5-trisphosphate (IP_3), a major reaction product of PLC, is classically known to trigger a release of calcium from the intracellular stores through binding to the IP_3 receptor present at the surface of the endoplasmic reticulum (8), the effects of IP_3 -receptor blockade with 2-APB were evaluated. In this condition, PF14 was unable to trigger any increase in $[Ca^{2+}]_i$ in HUVEC, suggesting that IP_3 was the second messenger responsible for intracellular calcium store release (Fig. 4H). Finally, it has to be noted that, using confocal fluorescence microscopy, PF14 was also found to increase nuclear free calcium level in HUVECs (Fig. 4I).

Effect of PF14 on HUVEC Adhesion, Proliferation, and Migration

After it was demonstrated that PF14 was able to trigger calcium signaling in HUVECs, it was found necessary to investigate the effects of cell-fibrillin-1 fragment interaction on several cell functions; i.e., adhesion, migration, and proliferation.

A first set of experiments showed that fibronectin, PF9, and PF14 promoted a similar substantial dose-dependent adhesion of HUVECs, except for the highest dose used, for which fibronectin became slightly more effective than both PF9 and PF14 (Fig. 6A).

Since $[Ca^{2+}]_i$ is known to be involved in the regulation of cell proliferation and migration (8, 50), we have then verified whether the PF14-induced $[Ca^{2+}]_i$ increase impacts on these biological activities in HUVECs. The effects of BSA, PF9, and

PF14 (10 $\mu\text{g/ml}$) on HUVEC transwell migration were assessed in Boyden chambers. These experiments showed that only PF14 was haptotactic and triggered a transmigration of HUVECs significantly different from the controls in the range of +65% (Fig. 6B). In addition, the effects of PF14 and PF9 on HUVEC proliferation were assessed by the trypsinization and direct cell counting method: only PF14 was found active, since the proliferation rate was +108% 48 h after addition of PF14 (1 $\mu\text{g/ml}$), while it was only +61% after addition of PF9 (1 $\mu\text{g/ml}$) and +66% in the presence of solvent alone (one-way ANOVA, $P \leq 0.05$) (Fig. 7A). The enhancement of cell proliferation by PF14 was then verified by using the WST-1 colorimetric method: HUVEC proliferation rate at 48 h was significantly higher after addition of PF14 (1 $\mu\text{g/ml}$) (+125% after 48 h) than after addition of solvent alone (+100%) (one-way ANOVA, $P \leq 0.05$) (online supplemental Fig. 1D). This is consistent with the significantly increased cell proliferation rate induced by aortic microfibrils (0.5 $\mu\text{g/ml}$) after 48 h, which reached +70% after addition of microfibrils and only +35% after addition of the solvent alone (one-way ANOVA, $P \leq 0.05$) (Fig. 7A). Finally, the effects of fibrillin-1 fragments on migration were further investigated in wound healing assays. After 8 h, only PF14 (1 $\mu\text{g/ml}$) induced a significantly higher wound closure (51%) than in control conditions with solvent alone (37%) (one-way ANOVA, $P < 0.05$) (Fig. 7, B and C).

DISCUSSION

MFS, caused by mutations in the fibrillin-1 gene, raises the question of knowing whether microfibrillar components are able to trigger intracellular signaling events that would be missing in case of genetic anomalies, potentially altering the developmental process. To support this idea, microfibrils and RGD-containing fibrillin-1 fragments are already known to enhance adhesion, spreading, and migration of several cell types (5, 6, 14, 47, 53, 54, 61, 70). Further support to this hypothesis was provided by 1) evidence that mice mutated for other microfibrillar components, e.g., fibulin-5 or emilin-1, have severe anomalies of vascular development and structure (51, 73, 74), and 2) the facts that mutations in the other main component of elastic fibers, elastin, cause Williams syndrome, and elastin fragments and tropoelastin have already been shown to influence Ca^{2+} signaling, proliferation, and other functions in vascular and other types of cells (17, 19, 27, 28, 33, 49, 68).

Here, we have shown that aortic microfibrils induced a substantial dose-dependent elevation of cytoplasmic and nuclear free calcium levels in endothelial cells. In particular, the rise in nuclear calcium level is known to modulate the activity of transcription factors and stimulate gene expression and cell proliferation (57) and may explain, at least in part, the increased cell proliferation triggered by microfibrils. To know which component of microfibrils was responsible for this effect, we studied the action of two RGD-containing overlapping fragments of their main component fibrillin-1, i.e., fragments PF9 and PF14. Although PF14 contains a wider sequence than PF9 on the NH_2 -terminal side of the RGD, both fragments promote *in vitro* adhesion of fibroblasts (5, 6) and, according to the present experiments and previous results (70), endothelial cells. However, only PF14, not PF9, induced a substantial dose-dependent $[Ca^{2+}]_i$ increase in HUVECs, although

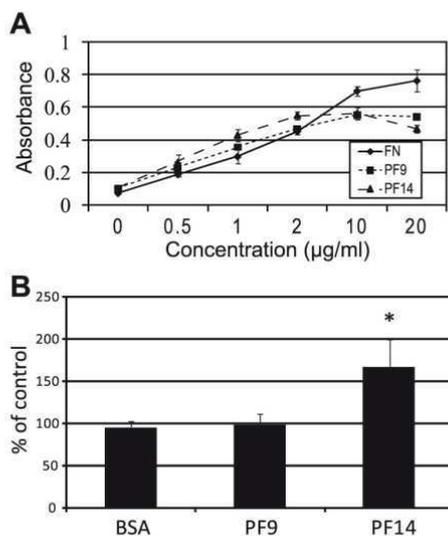


Fig. 6. Adhesion and transmigration of HUVEC in response to fibrillin-1 fragments PF9 and PF14. *A*: dose-dependent attachment of HUVECs to fibrillin-1 fragments PF9, PF14, and full-length human fibronectin ($n = 6$ in each case). *B*: transmigration of HUVEC when the underside of the Boyden chamber inserts was precoated with 10 $\mu\text{g/ml}$ BSA, PF9, or PF14 ($n = 3$ in each case). *Significantly different from the control (uncoated underside of the Boyden chamber). Data are means \pm SE.

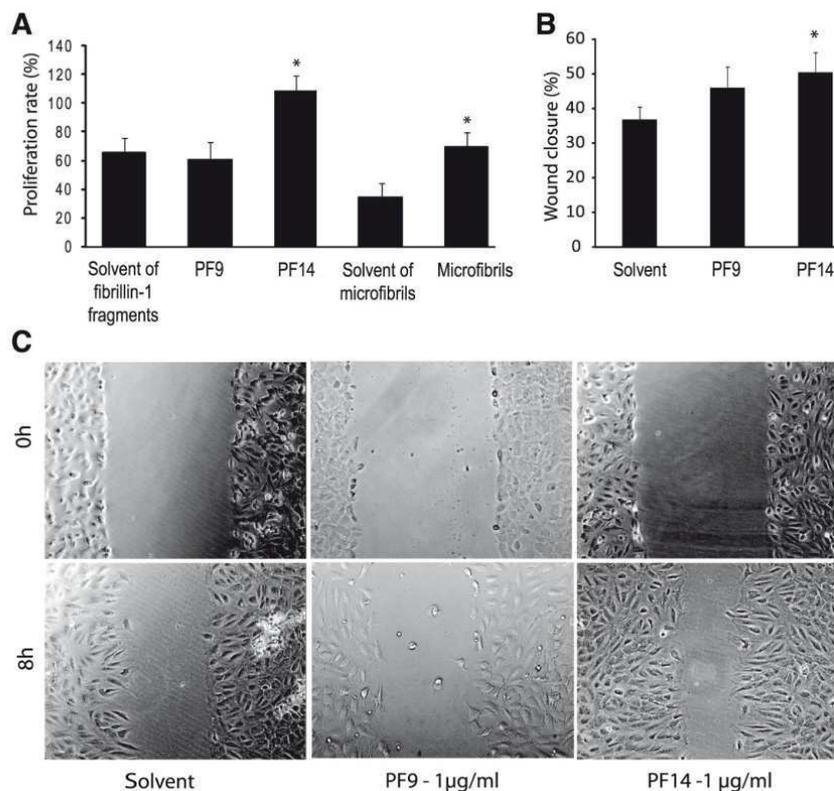


Fig. 7. Effect of PF9 and PF14 on HUVEC proliferation and wound healing. *A*: PF9 (1 µg/ml), PF14 (1 µg/ml), and aortic microfibrils (0.5 µg/ml) effects on HUVEC proliferation after 48 h, evaluated by cell counting ($n = 4-8$ dishes per group). *B*, *C*: effect of PF9 and PF14 (1 µg/ml) after 8 h on wound healing assays in HUVEC cultures ($n = 6$). In *A* and *B*, values are means \pm SE. One representative experiment is shown in *C*. *Significantly different from corresponding solvent (one-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

lower than the rise induced by aortic microfibrils. The different responses induced by PF9 and PF14 confirm the importance of the amino acids on the NH₂-terminal side of the RGD sequence of PF14 for cell recognition and/or function, as suggested previously (6, 40). At least, the PF14 domains upstream of RGD are needed to stabilize the binding to $\alpha 5\beta 1$ and facilitate $\alpha 5\beta 1$ activation. If they are absent, the RGD domain cannot activate $\alpha 5\beta 1$ (6). Here, PF14 exerted a RGD-dependent action on calcium signaling through its binding to integrins substantially expressed in endothelial cells: $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$, the latter being known to also bind to tropoelastin (7, 56, 59). Curiously, in our experiments, the blockade of each of these integrins totally inhibited the effect of PF14. This could be explained by the previously demonstrated cross-talk between $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrin signaling pathways (36) and subsequent inhibition of angiogenesis by blockade of either of these two integrins (37). Alternatively, the simultaneous activation of both integrins might be necessary for PF14 signal transduction in HUVECs, as shown for the action of several angiogenic factors in the induction of endothelial cells migration (25).

The transduction of extracellular matrix signals that activate integrins is often mediated by the actin-based cytoskeleton (69). Here, no involvement of actin microfilaments was observed in PF14-induced calcium signaling in HUVECs, similar to what was shown with aortic microfibrils. However, sequential mobilization of PLC, IP₃, and intracellular calcium stores were demonstrated to be a major pathway activated by PF14 binding to integrins and leading to [Ca²⁺]_i increase. In addition, as opposed to the effects of aortic microfibrils, no clear calcium channel activation could be observed following

HUVEC stimulation by PF14. This, together with the higher HUVEC response to aortic microfibrils than to PF14, suggests that microfibril-induced calcium signaling in these cells also involves either microfibrillar components other than fibrillin-1 or fibrillin-1 sequences that are not present in PF14.

Integrin activation by extracellular matrix proteins often leads to [Ca²⁺]_i elevation, which regulates many cellular events, including adhesion, migration, proliferation, and angiogenesis (8, 50, 64). The present experiments suggested that PF14-induced increase in cytoplasmic and nuclear calcium level enhanced, at least, HUVEC proliferation and migration. Since microfibrils anchor the aortic endothelial cells to the subendothelial elastic lamina in the embryo (14), microfibrillar components, including fibrillin-1, could be responsible for physiological endothelial calcium signaling at the onset of vessel formation. Endothelial dysfunction is an important contributor to MFS (12, 71), acting in synergy with vascular smooth muscle cell (VSMC) dysfunction. Among several potential effects, the calcium signaling induced by fibrillin-1 fragments in endothelial cells likely activates the production of NO, which is known to regulate different functions of smooth muscle cells, such as apoptosis and synthesis of matrix metalloproteases involved in aortic dissection and aneurysmal progression (21, 24, 72). Dysregulation of calcium signaling, due to a decrease in the availability of fibrillin-1 in mutated animals or patients, may then alter NO production and its signaling effects, as suggested by the decreased activity of the calcium-dependent endothelial NO synthase (eNOS) in the aorta of a Marfan mouse model (12). In MFS, fibrillin-1 impairment may therefore alter physiological fibrillin-1 signaling in endothelial

cells, contribute to the endothelial dysfunction leading to the disease (71), and directly account for the arterial anomalies.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Daniel V. Bax (currently at University of Sydney, Australia) for contribution to providing the fibrillin-1 PF9 and PF14 fragments and Dr. Yves Vandenbrouck (CEA, Grenoble, France) for design of siRNAs.

GRANTS

The authors also acknowledge the European Commission (contracts TELASTAR, 5th PCRD, number QLK6-CT-2001-00332; and ELAST-AGE, 6th PCRD, number LSHM-CT-2005-018960) for funding.

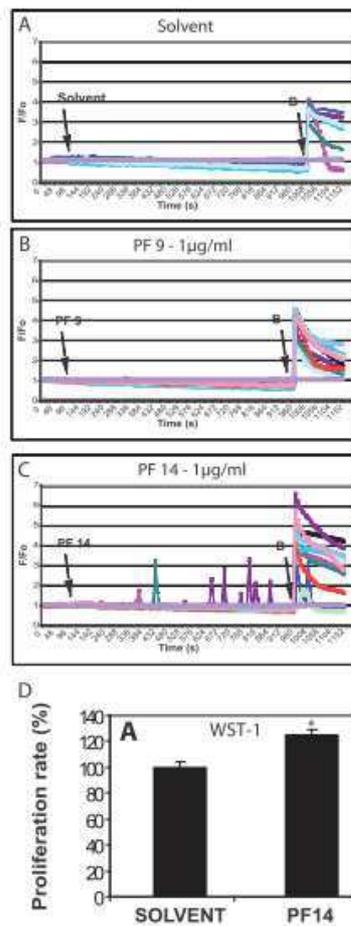
DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

REFERENCES

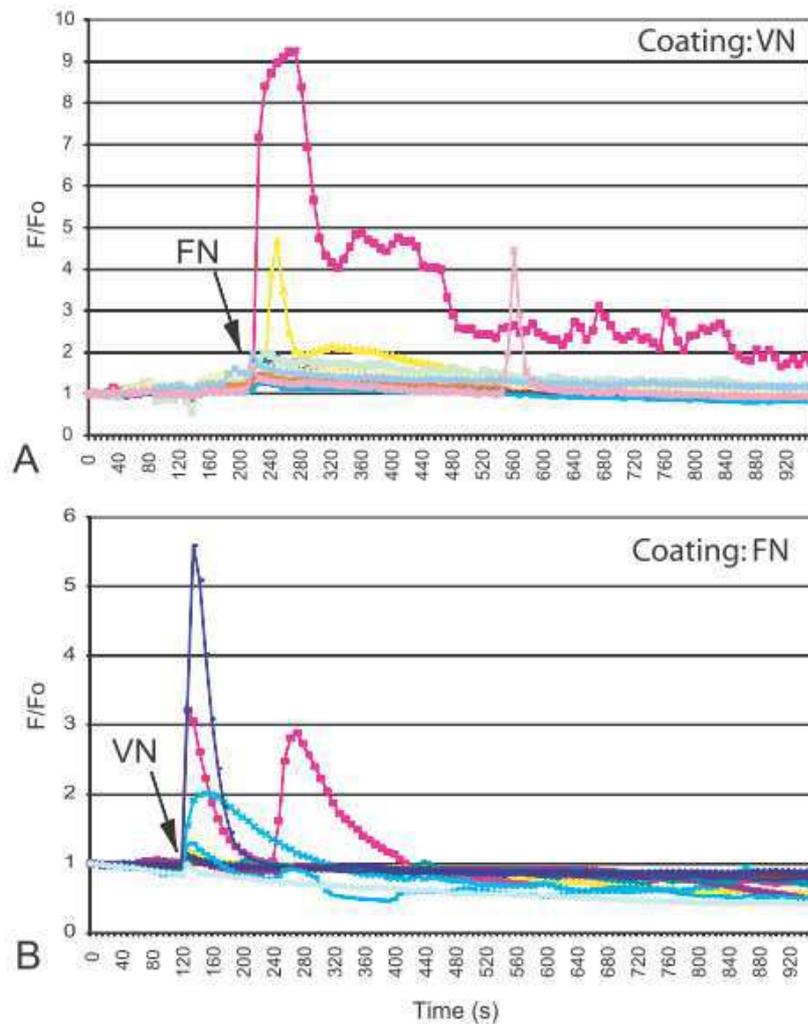
- Babbitt BA, Parkos CA, Mandell KJ, Winfree LM, Laur O, Ivanov AI, Nusrat A. Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J Pathol* 170: 951–966, 2007.
- Bailey SR, Polan JL, Munoz OC, Agrawal MC, Goswami NJ. Proliferation and beta-tubulin for human aortic endothelial cells within gas-plasma scaffolds. *Cardiovasc Radiat Med* 5: 119–124, 2004.
- Balconi G, Dejana E. Cultivation of endothelial cells: limitations and perspectives. *Med Biol* 64: 231–245, 1986.
- Baldock C, Koster AJ, Ziese U, Rock MJ, Sherratt MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA, Kielty CM. The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol* 152: 1045–1056, 2001.
- Bax DV, Bernard SE, Lomas A, Morgan A, Humphries J, Shuttleworth CA, Humphries MJ, Kielty CM. Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Biol Chem* 278: 34605–34616, 2003.
- Bax DV, Mahalingam Y, Cain S, Melody K, Freeman L, Younger K, Shuttleworth CA, Humphries MJ, Couchman JR, Kielty CM. Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation. *J Cell Sci* 120: 1383–1392, 2007.
- Bax DV, Rodgers UR, Bilek MM, Weiss AS. Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRR motif and integrin alphaV-beta3. *J Biol Chem* 284: 28616–28623, 2009.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 11–21, 2000.
- Bussiere CT, Wright GM, DeMont ME. The mechanical function and structure of aortic microfibrils in the lobster *Homarus americanus*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 143: 417–428, 2006.
- Cain SA, Morgan A, Sherratt MJ, Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Proteomic analysis of fibrillin-rich microfibrils. *Proteomics* 6: 111–122, 2006.
- Carta L, Pereira L, Arteaga-Solis E, Lee-Arteaga SY, Lenart B, Starcher B, Merkel CA, Sukoyan M, Kerkis A, Hazeki N, Keene DR, Sakai LY, Ramirez F. Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem* 281: 8016–8023, 2006.
- Chung AW, Au Yeung K, Cortes SF, Sandor GG, Judge DP, Dietz HC, van Breemen C. Endothelial dysfunction and compromised eNOS/Akt signaling in the thoracic aorta during the progression of Marfan syndrome. *Br J Pharmacol* 150: 1075–1083, 2007.
- Davis EC. Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. *Lab Invest* 68: 89–99, 1993.
- Davis EC. Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta. *J Cell Sci* 107: 727–736, 1994.
- El-Hallous E, Sasaki T, Hubmacher D, Getie M, Tiedemann K, Brinckmann J, Batge B, Davis EC, Reinhardt DP. Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *J Biol Chem* 282: 8935–8946, 2007.
- Faury G. Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathol Biol (Paris)* 49: 310–325, 2001.
- Faury G, Garnier S, Weiss AS, Wallach J, Fulop T Jr, Jacob MP, Mecham RP, Robert L, Verdetti J. Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. *Circ Res* 82: 328–336, 1998.
- Faury G, Pezet M, Knutsen RH, Boyle WA, Heximer SP, McLean SE, Minkes RK, Blumer KJ, Kovacs A, Kelly DP, Li DY, Starcher B, Mecham RP. Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J Clin Invest* 112: 1419–1428, 2003.
- Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L, Verdetti J. Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2967–2972, 1998.
- Garnier-Raveaud S, Usson Y, Cand F, Robert-Nicoud M, Verdetti J, Faury G. Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Growth Factors* 19: 35–48, 2001.
- Geng YJ, Wu Q, Muszynski M, Hansson GK, Libby P. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 19–27, 1996.
- Giusti B, Porciani MC, Brunelli T, Evangelisti L, Fedi S, Gensini GF, Abbate R, Sani G, Yacoub M, Pepe G. Phenotypic variability of cardiovascular manifestations in Marfan Syndrome. Possible role of hyperhomocysteinemia and C677T MTHFR gene polymorphism. *Eur Heart J* 24: 2038–2045, 2003.
- Graef T, Steidl U, Nedbal W, Rohr U, Fenk R, Haas R, Kronenwett R. Use of RNA interference to inhibit integrin subunit alphaV-mediated angiogenesis. *Angiogenesis* 8: 361–372, 2005.
- Gurjar MV, Sharma RV, Bhalla RC. eNOS gene transfer inhibits smooth muscle cell migration and MMP-2 and MMP-9 activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2871–2877, 1999.
- Hotchkiss KA, Ashton AW, Schwartz EL. Thymidine phosphorylase and 2-deoxyribose stimulate human endothelial cell migration by specific activation of the integrins alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3. *J Biol Chem* 278: 19272–19279, 2003.
- Hubmacher D, Tiedemann K, Reinhardt DP. Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions. *Curr Top Dev Biol* 75: 93–123, 2006.
- Ito S, Ishimaru S, Wilson SE. Effect of coacervated alpha-elastin on proliferation of vascular smooth muscle and endothelial cells. *Angiology* 49: 289–297, 1998.
- Jacob MP, Fulop T Jr, Foris G, Robert L. Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 995–999, 1987.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52: 2745–2756, 1973.
- Jiang X, Yang F, Tan H, Liao D, Bryan RM Jr, Randhawa JK, Rumbaut RE, Durante W, Schafer AL, Yang X, Wang H. Hyperhomocysteinemia impairs endothelial function and eNOS activity via PKC activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2515–2521, 2005.
- Jones NP, Peak J, Brader S, Eccles SA, Katan M. PLCgamma1 is essential for early events in integrin signalling required for cell motility. *J Cell Sci* 118: 2695–2706, 2005.
- Judge DP, Dietz HC. Marfan's syndrome. *Lancet* 366: 1965–1976, 2005.
- Kamoun A, Landeau JM, Godeau G, Wallach J, Duchesnay A, Pellat B, Hornebeck W. Growth stimulation of human skin fibroblasts by elastin-derived peptides. *Cell Adhes Commun* 3: 273–281, 1995.
- Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci* 115: 2817–2828, 2002.
- Kielty CM, Whittaker SP, Grant ME, Shuttleworth CA. Attachment of human vascular smooth muscle cells to intact microfibrillar assemblies of collagen VI and fibrillin. *J Cell Sci* 103: 445–451, 1992.
- Kim S, Harris M, Varner JA. Regulation of integrin alpha v beta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J Biol Chem* 275: 33920–33928, 2000.
- Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* 156: 1345–1362, 2000.
- Kuo CL, Isogai Z, Keene DR, Hazeki N, Ono RN, Sengle G, Peter Bachinger H, Sakai LY. Effects of fibrillin-1 degradation on microfibril ultrastructure. *J Biol Chem* 282: 4007–4020, 2007.

39. Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, Bailly S. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 100: 4495–4501, 2002.
40. Lee SS, Knott V, Jovanovic J, Harlos K, Grimes JM, Choulier L, Mardon HJ, Stuart DI, Handford PA. Structure of the integrin binding fragment from fibrillin-1 gives new insights into microfibril organization. *Structure* 12: 717–729, 2004.
41. Lew PD, Monod A, Krause KH, Waldvogel FA, Biden TJ, Schlegel W. The role of cytosolic free calcium in the generation of inositol 1,4,5-trisphosphate and inositol 1,3,4-trisphosphate in HL-60 cells. Differential effects of chemotactic peptide receptor stimulation at distinct Ca^{2+} levels. *J Biol Chem* 261: 13121–13127, 1986.
42. Li DY, Faury G, Taylor DG, Davis EC, Boyle WA, Mecham RP, Stenzel P, Boak B, Keating MT. Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *J Clin Invest* 102: 1783–1787, 1998.
43. Lillie MA, David GJ, Gosline JM. Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue. *Connect Tissue Res* 37: 121–141, 1998.
44. Lu Y, Sherratt MJ, Wang MC, Baldock C. Tissue specific differences in fibrillin microfibrils analysed using single particle image analysis. *J Struct Biol* 155: 285–293, 2006.
45. Marque V, Kieffer P, Gayraud B, Lartaud-Idjouadiene I, Ramirez F, Atkinson J. Aortic wall mechanics and composition in a transgenic mouse model of Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 1184–1189, 2001.
46. Mátyás G, Alonso S, Patrignani A, Marti M, Arnold E, Magyar I, Henggeler C, Carrel T, Steinmann B, Berger W. Large genomic fibrillin-1 (FBN1) gene deletions provide evidence for true haploinsufficiency in Marfan syndrome. *Hum Genet* 122: 23–32, 2007.
47. McGowan SE, Holmes AJ, Mecham RP, Ritty TM. Arg-Gly-Asp-containing domains of fibrillins-1 and -2 distinctly regulate lung fibroblast migration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 38: 435–445, 2008.
48. Merle PL, Feige JJ, Verdetti J. Basic fibroblast growth factor activates calcium channels in neonatal rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* 270: 17361–17367, 1995.
49. Mochizuki S, Brassart B, Hinek A. Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 277: 44854–44863, 2002.
50. Munaron L. Intracellular calcium, endothelial cells and angiogenesis. *Recent Patents Anticancer Drug Discov* 1: 105–119, 2006.
51. Nakamura T, Lozano PR, Ikeda Y, Iwanaga Y, Hinek A, Minamisawa S, Cheng CF, Kobuke K, Dalton N, Takada Y, Tashiro K, Ross J Jr, Honjo T, Chien KR. Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* 415: 171–175, 2002.
52. Pezet M, Jacob MP, Escoubet B, Gheduzzi D, Tillet E, Perret P, Huber P, Quaglino D, Vranckx R, Li DY, Starcher B, Boyle WA, Mecham RP, Faury G. Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta. *Rejuvenation Res* 11: 97–112, 2008.
53. Pfaff M, Reinhardt DP, Sakai LY, Timpl R. Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1. *FEBS Lett* 384: 247–250, 1996.
54. Porst M, Plank C, Bieritz B, Konik E, Fees H, Dotsch J, Hilgers KF, Reinhardt DP, Hartner A. Fibrillin-1 regulates mesangial cell attachment, spreading, migration and proliferation. *Kidney Int* 69: 450–456, 2006.
55. Reber-Müller S, Spissinger T, Schuchert P, Spring J, Schmid V. An extracellular matrix protein of jellyfish homologous to mammalian fibrillins forms different fibrils depending on the life stage of the animal. *Dev Biol* 169: 662–672, 1995.
56. Rodgers UR, Weiss AS. Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie* 86: 173–178, 2004.
57. Rodrigues MA, Gomes DA, Nathanson MH, Leite MF. Nuclear calcium signaling: a cell within a cell. *Braz J Med Biol Res* 42: 17–20, 2009.
58. Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J* 7: 1208–1218, 1993.
59. Ruegg C, Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 60: 1135–1157, 2003.
60. Sakai LY, Keene DR, Glanville RW, Bachinger HP. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J Biol Chem* 266: 14763–14770, 1991.
61. Sakamoto H, Broekelmann T, Cheresh DA, Ramirez F, Rosenbloom J, Mecham RP. Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem* 271: 4916–4922, 1996.
62. Senthil D, Raveendran M, Shen YH, Utama B, Dudley D, Wang J, Wang XL. Genotype-dependent expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and its regulatory proteins in cultured endothelial cells. *DNA Cell Biol* 24: 218–224, 2005.
63. Short SM, Derrien A, Narsimhan RP, Lawler J, Ingber DE, Zetter BR. Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol* 168: 643–653, 2005.
64. Stupack DG, Cheresh DA. Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol* 64: 207–238, 2004.
65. Thurmond FA, Koob TJ, Bowness JM, Trotter JA. Partial biochemical and immunologic characterization of fibrillin microfibrils from sea cucumber dermis. *Connect Tissue Res* 36: 211–222, 1997.
66. Vaca L, Kunze DL. Depletion of intracellular Ca^{2+} stores activates a Ca^{2+} -selective channel in vascular endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 267: C920–C925, 1994.
67. Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandembrouck Y. An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics* 7: 520, 2006.
68. Wachi H, Sugitani H, Murata H, Nakazawa J, Mecham RP, Seyama Y. Tropoelastin inhibits vascular calcification via 67-kDa elastin binding protein in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb* 11: 159–166, 2004.
69. Wiesner S, Legate KR, Fassler R. Integrin-actin interactions. *Cell Mol Life Sci* 62: 1081–1099, 2005.
70. Williamson MR, Shuttleworth A, Canfield AE, Black RA, Kielty CM. The role of endothelial cell attachment to elastic fibre molecules in the enhancement of monolayer formation and retention, and the inhibition of smooth muscle cell recruitment. *Biomaterials* 28: 5307–5318, 2007.
71. Wilson DG, Bellamy MF, Ramsey MW, Goodfellow J, Brownlee M, Davies S, Wilson JF, Lewis MJ, Stuart AG. Endothelial function in Marfan syndrome: selective impairment of flow-mediated vasodilation. *Circulation* 99: 909–915, 1999.
72. Xiong W, Knispel RA, Dietz HC, Ramirez F, Baxter BT. Doxycycline delays aneurysm rupture in a mouse model of Marfan syndrome. *J Vasc Surg* 47: 166–172, 2008.
73. Yanagisawa H, Davis EC, Starcher BC, Ouchi T, Yanagisawa M, Richardson JA, Olson EN. Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* 415: 168–171, 2002.
74. Zanetti M, Braghetta P, Sabatelli P, Mura I, Doliana R, Colombatti A, Volpin D, Bonaldo P, Bressan GM. EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol Cell Biol* 24: 638–650, 2004.
75. Zhang H, Hu W, Ramirez F. Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 129: 1165–1176, 1995.



Online supplemental figure 1: Effects of fibrillin-1 fragments on BAEC $[Ca^{2+}]_i$ and HUVEC proliferation

Effect of solvent (A), PF9 (B) and PF14 (C) on $[Ca^{2+}]_i$ in bovine aortic endothelial cells (BAECs). Contrarily to HUVECs, BAECs are arterial, not venous, cells and bear a high blood pressure in vivo. Similar to what was found in HUVECs, PF14, not PF9, induced substantial transient elevations of $[Ca^{2+}]_i$ in BAECs, although of relatively lower amplitude than in HUVECs (n=30-45 in each case). One representative experiment is shown in each case. D: effect of PF14 (1 μ g/mL) on HUVEC proliferation after 48H, measured by using the WST-1 colorimetric method (n=6-8).



Online supplemental figure 2: Effects of fibronectin and vitronectin on HUVEC [Ca²⁺]_i.

In order to avoid any ambiguous interpretation of the cell response if the protein used for culture dish-coating and cell stimulation were the same, different proteins were used for coating and cell stimulation in each experiment. 1 ng/ml human fibronectin (FN) was added to HUVECs cultured on 5 µg/ml human vitronectin (VN)-coated dishes (A). Also, 50 ng/ml VN was added to HUVECs cultured on 250 µg/ml FN-coated dishes (B). The fluorescence peaks, representative of calcium elevations elicited by FN and VN resembled those which were induced by PF14. One representative experiment is shown in each case.

DETAILED MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) were isolated using a technique adapted from Jaffe et al. (Jaffe EA et al. 1973 ; Faury G. et al. 1998). Cells were harvested from the umbilical vein by a 10 minute incubation with collagenase 1A. The endothelial cells were pelleted at 200 G for 10 minutes, and resuspended in medium 199 containing 22% human serum, streptomycin (0.1 mg/mL), penicillin (100 UI/mL) and L-glutamine (2 mmol/L), then placed in dishes with a glass bottom coated with human plasma fibronectin (250 ng/mL). Each cell culture was prepared by pooling the endothelial cells from 2-3 umbilical veins. Fluorescence observations were performed in cells adhering to the glass coverslip. Culture medium was changed every two days. Only first and second passage HUVECs were used in the experiments. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were prepared by collagenase treatment of bovine aorta, as described previously (3).

Production of microfibrils and fibrillin-1 fragments

Microfibrils were isolated from bovine aorta, in native and non-denaturing conditions, as described (Baldock et al. 2001 ; Kuo et al. 2007 ; El-Hallous et al. 2007). The protocol was adjusted to prevent proteolytic damages to microfibrils. The aorta from a newborn calf was incubated for 18 hours at 4°C with 0.5 mg/ml purified bacterial collagenase 1A, in the presence of hyaluronidase (5U/mL) and freshly prepared protease inhibitors: phenylmethanesulphonyl fluoride (2 mmol/L) and N-ethylmaleimide (10 mmol/L). Samples were centrifugated at 5000 G for 5 minutes, and the supernatant was passed through a CL-2B sepharose column. Excluded volums contained microfibrils (average molecular weight: 15000 kDa), which were then purified by CsCl density gradient centrifugation, before verification of

the purity by mass spectrometry and transmission electron microscopy (Cain SA et al. 2006; Lu et al. 2006).

Recombinant RGD-containing fragments of human fibrillin-1 PF9 (residues 1528-1807) and PF14 (amino acids 1362-1688) were expressed using the mammalian expression vector pCEP-pu/AC7 and 293-EBNA cells, were purified as previously described (Bax et al. 2003). The cloning, expression and purification of recombinant fibrillin-1 fragments PF9 (316 aminoacids) and PF14 (362 aminoacids), using the mammalian expression vector pCEP-pu/AC7 and 293-EBNA cells, has been described (Bax et al. 2003 ; Bax et al. 2007). DNA and protein sequences were confirmed by cDNA sequencing, SDS-PAGE and mass spectrometry. Gel filtration chromatography was used to ensure only monomeric recombinant fragments were used. Recombinant fragments were concentrated after elution from nickel affinity chromatography, using Vivaspin columns (Sartorius), prior to separation using Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), using an AKTA Purifier system. Monomeric protein was pooled for further experimentation. Fragments were N-glycosylated, as determined by treatment with PNGaseF (New England Biolabs). The domains of the fibrillin-1 fragments PF9 and PF 14 are presented below in Figure 1.

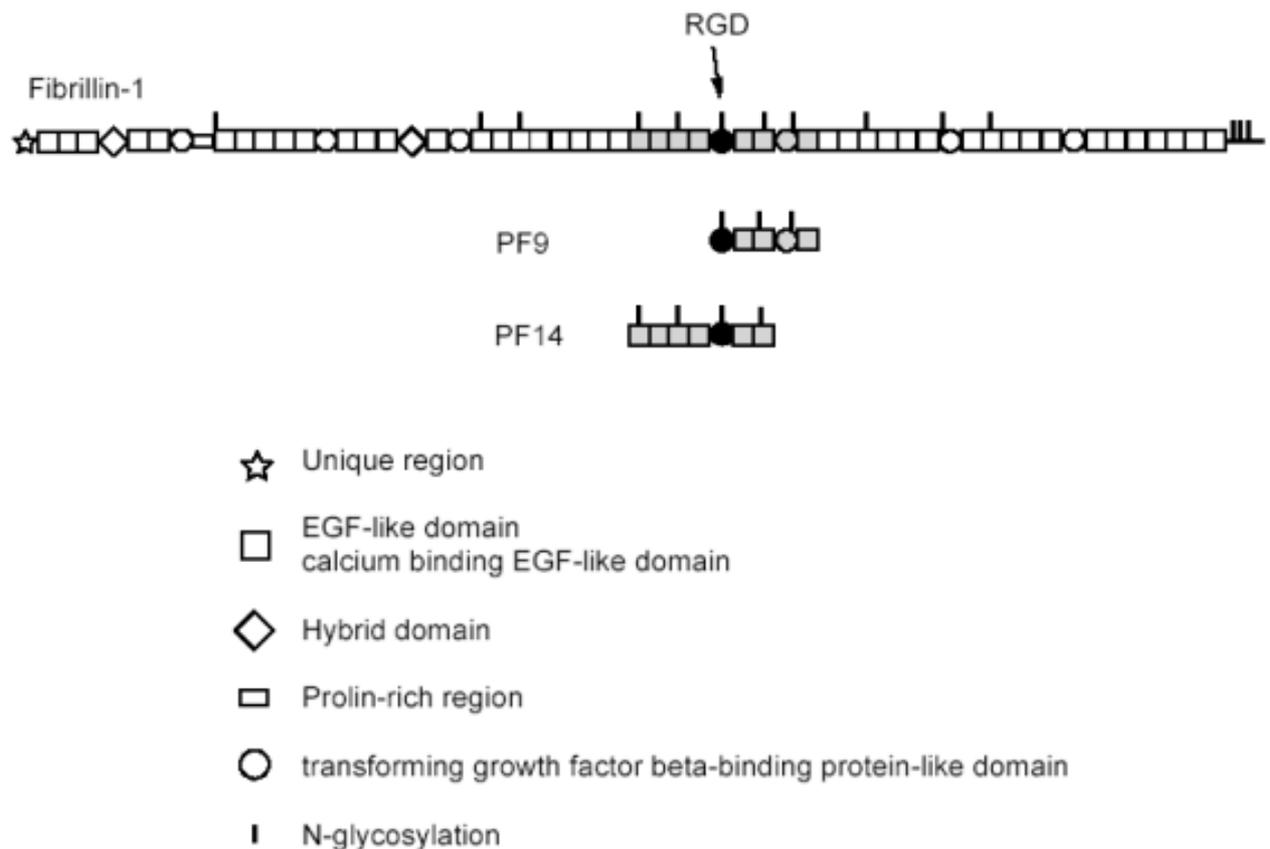


Figure 1: Domains of fibrillin-1 and fibrillin-1 fragments PF9 and PF14. (see also Bax et al. 2003 and Bax et al. 2007).

RGD-RGA PF14 mutant (PF14-RGA) was produced using a site-directed mutagenesis of aspartic acid 1541 to alanine (4th transforming growth factor beta-binding protein-like domain), using the following primers to introduce the mutation into WT PF14, as previously described (Bax et al. 2007):

WT PF14: Forward, 5'-GTCGACCTGGACGAATGTTCCAATGG-3' and Reverse, 5'-GGATCCTACATGCAATTATTTCCCCC-3';

RGA mutant of PF14: Forward, 5'-CGACCTCGAGGAGCCAATGGAGATACAGCC-3' and Reverse, 5'-GGCTGTATCTCCATTGGCTCCTCGAGGTCG-3'.

Intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in adhering HUVEC

Measurements and analyses were performed either by confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 410, Carl Zeiss, Jena, Germany) or by classical microscopy (CellR system, Olympus, Rungis, France) using the calcium-sensitive fluorescent dye Fluo3/AM (excitation: 488 nm; emission: >510 nm), according to the procedures previously described (Faury et al. 1998a). The cells were washed twice with a physiological salt solution (PSS) composed of: NaCl (125 mmol/L); KCl (5.6 mmol/L); $CaCl_2$ (2.4 mmol/L); $MgCl_2$ (1.2 mmol/L); D-glucose (11 mmol/L); HEPES (10 mmol/L); pH 7.4. PSS (0.75 mL) was then added to the cell dish followed by addition of 0.25 mL of a bovine serum albumin (2%) and Pluronic F127 (0.08%) solution in PSS containing 5 μ L of a FLUO3/AM solution (0.5 mmol/L) in DMSO (final concentrations: FLUO3/AM: 2.5 μ mol/L, DMSO: $<1\%$). After a 25 minute incubation of HUVECs at room temperature in the dark, the cells were washed three times and bathed in 1 mL PSS 20 minutes before and during the measurements (22°C). In confocal microscopy experiments, the optical slices passed through the nuclei, so that nuclear and cytoplasmic fluorescence could be measured separately. In all cases, ratio of current fluorescence to initial fluorescence (F/F_0) was assumed to be representative of the free calcium level.

In some cells, Fura-2 (dual excitation: 340 nm / 380 nm; emission: >510 nm, purchased from Sigma-Aldrich) was used instead of Fluo-3, in order to get actual values of intracellular free calcium concentration. Fura 2-AM loading was performed according to an already described procedure (Faury et al. 1998b). The culture dish was washed twice with PSS. The dish was then filled with 0.75 mL Tyrode's solution. In the dark, 8 μ L of 0.5 mmol/L fura 2-AM in DMSO was added to 250 μ L of Tyrode's solution containing 2% BSA and 0.08% pluronic F-127 (wt/vol). This solution (258 μ L) was then added to the culture dish (final volume, ≈ 1 mL), yielding final concentrations of 4 μ mol/L Fura 2-AM and $<1\%$ DMSO. After a 40-minute incubation (room temperature, in the dark), the cells were washed twice and bathed with PSS.

Intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in adhering HUVEC

Measurements and analyses were performed either by confocal laser scanning microscopy (Zeiss LSM 410, Carl Zeiss, Jena, Germany) or by classical microscopy (CellIR system, Olympus, Rungis, France) using the calcium-sensitive fluorescent dye Fluo3/AM (excitation: 488 nm; emission: >510 nm), according to the procedures previously described (Faury et al. 1998a). The cells were washed twice with a physiological salt solution (PSS) composed of: NaCl (125 mmol/L); KCl (5.6 mmol/L); $CaCl_2$ (2.4 mmol/L); $MgCl_2$ (1.2 mmol/L); D-glucose (11 mmol/L); HEPES (10 mmol/L); pH 7.4. PSS (0.75 mL) was then added to the cell dish followed by addition of 0.25 mL of a bovine serum albumin (2%) and Pluronic F127 (0.08%) solution in PSS containing 5 μ L of a FLUO3/AM solution (0.5 mmol/L) in DMSO (final concentrations: FLUO3/AM: 2.5 μ mol/L, DMSO: <1%). After a 25 minute incubation of HUVECs at room temperature in the dark, the cells were washed three times and bathed in 1 mL PSS 20 minutes before and during the measurements (22°C). In confocal microscopy experiments, the optical slices passed through the nuclei, so that nuclear and cytoplasmic fluorescence could be measured separately. In all cases, ratio of current fluorescence to initial fluorescence (F/F_0) was assumed to be representative of the free calcium level.

In some cells, Fura-2 (dual excitation: 340 nm / 380 nm; emission: >510 nm, purchased from Sigma-Aldrich) was used instead of Fluo-3, in order to get actual values of intracellular free calcium concentration. Fura 2-AM loading was performed according to an already described procedure (Faury et al. 1998b). The culture dish was washed twice with PSS. The dish was then filled with 0.75 mL Tyrode's solution. In the dark, 8 μ L of 0.5 mmol/L fura 2-AM in DMSO was added to 250 μ L of Tyrode's solution containing 2% BSA and 0.08% pluronic F-127 (wt/vol). This solution (258 μ L) was then added to the culture dish (final volume, \approx 1 mL), yielding final concentrations of 4 μ mol/L Fura 2-AM and <1% DMSO. After a 40-minute incubation (room temperature, in the dark), the cells were washed twice and bathed with PSS.

Each measurement (2-5 min) was stopped by the addition of 0.01% digitonin (maximum $[Ca^{2+}]_i$), followed by 45 mmol/L EGTA (minimum $[Ca^{2+}]_i$). $[Ca^{2+}]_i$ was calculated using a standard method, assuming that the K_d of Fura-2 for Ca^{2+} is 224 nmol/L (Grynkiewicz et al. 1985).

In some cases, bradykinin (1 μ mol/L) (Sigma B3259, Saint Quentin-Fallavier, France), classically inducing a strong receptor-mediated elevation of $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells (Wang et al. 1995; Leung et al. 2006), was added to HUVECs at the end of the experiment in order to verify cell functionality.

In some experiments, different agents were also applied to HUVECs in order to uncover the PF14 signalling pathways:

- thapsigargin (1 μ mol/L) (Sigma T-9033, Saint Quentin-Fallavier, France), known to empty the intracellular calcium stores by blocking the calcium pump ATP-ase of the endoplasmic reticulum (Thastrup et al. 1989) was applied to HUVECs and depletion of calcium stores was monitored for 16 minutes before addition of PF14 and during the experiment.

- nickel chloride (1 mmol/L), a wide spectrum blocker of membrane calcium channels (Garnier-Raveaud et al. 2001 ; Faury et al. 1998 ; Narahashi et al. 1992), and calcium free medium were used to verify the potential involvement of extracellular calcium influx in the PF14-mediated increase in $[Ca^{2+}]_i$. Composition of the calcium free medium was the following: NaCl (125 mmol/L); KCl (5.6 mmol/L); $MgCl_2$ (1.2 mmol/L); D- glucose (11 mmol/L); HEPES (10 mmol/L); EDTA (0.2 mmol/L); pH 7.4. $NiCl_2$ was applied to the cells 15 minutes prior to addition of PF14 and during the experiment.

- U73122 (1 μ mol/L) (Sigma U-6756, Saint Quentin-Fallavier, France), a blocker of phospholipase C (Jones et al. 2005 ; Yule et al. 1992), was applied to the cells 30 minutes prior to addition of PF14 and during the experiment.

- 2-APB (50 $\mu\text{mol/L}$) (Sigma D9754, Saint Quentin-Fallavier, France), a membrane permeable inhibitor of the IP3 receptor (Maruyama et al. 1997), was added to cells for 5 minutes. HUVECs were rinsed prior to recording and addition of PF14.
- Cytochalasin D (1 $\mu\text{mol/L}$) (Sigma C8273, Saint Quentin-Fallavier, France), an actin microfilament depolymerizer, making an actin microfilament-mediated mechanotransduction impossible (Cooper 1987) was added to the cells 45 minutes prior to addition of PF14 and during the experiment.
- blocking antibodies (10 $\mu\text{g/mL}$) for integrins $\alpha_v\beta_3$ or $\alpha_5\beta_1$, LM609 or JBS5 (Chemicon Europe, Southampton, UK), respectively, were applied to HUVECs 30 minutes prior to addition of PF14 and during the experiment.

Electrophysiological recording

Calcium current recordings were performed using the cell-attached patch-clamp technique (single channel) and materials previously described (Faury et al. 1998). Cells were immersed in a Tyrode solution containing: NaCl (125 mmol/L); KCl (5.6 mmol/L); CaCl₂ (2.4 mmol/L); MgCl₂ (1.2 mmol/L); HEPES (10 mmol/L); Glucose (11 mmol/L), pH 7.4. The patch pipette was filled with a solution containing: Ba(CH₃COO)₂ (90 mmol/L); HEPES (10 mmol/L), pH 7.4. Barium was used instead of calcium, because calcium channels are generally more permeable to this ion, and barium is known to inhibit potassium currents (Tsien et al. 1987). The imposed potential was +20 mV (except during recording of current-tension curves). HUVEC membrane resting potential (V_m) was measured at -57 ± 4 mV (n=35) for non-dividing cells (Faury et al. 1998). The recorded transmembrane currents were integrated and analyzed using the software Biopatch (Biologic, Claix, France).

siRNA knock-down of integrin subunits α_v and α_5

siRNA synthesis:

$\alpha 5$ integrin siRNAs were purchased as four oligonucleotide Smart Pools (Dharmacon, Lafayette, Colorado, USA) containing sequences: i)

Sense5'GAACGAGUCAGAAUUUCGA3' ; Antisense5'UCGAAAUUCUGACUCGUUC3',

ii) Sense5'UCACAUCGCUCUCAACUUC3' ; Antisense

5'GAAGUUGAGAGCGAUGUGA3', iii) Sense5'ACACGUUGCUGACUCCAUU3' ;

Antisense 5'AAUGGAGUCAGCAACGUGU3', and iv)

Sense5'CAAACGCUCCCUCCCAUAU3' ; Antisense5'AUAUGGGAGGGAGCGUUUG3'.

A siRNA (Dharmacon) which does not target any known mammalian gene was used as a non-specific control: Sense5'UAGCGACUAAACACAUCAA3' ;

Antisense5'UUGAUGUGUUUAGUCGCUA3'.

The use of commercial αv integrin siRNAs four nucleotide smart pool (Dharmacon) did not produce a significant knock-down of αv in HUVECs (-3%). Therefore, other siRNAs targeting αv integrin were designed using DSIR algorithm (Vert et al. 2006). Sequences targeting high RNA secondary structures were removed using RNAfold program (Tafer et al. 2008). The resulting siRNA sequences were: i) Sense 5'CCUCAAGAAGAACAAGAAA3' ; Antisense5'UUUCUUGUUCUUCUUGAGG3', and ii)

Sense5'GGCUUGCAACCCAUUCUUA3' ; Antisense 5'UAAGAAUGGGUUGCAACC3'.

These siRNAs were synthesized by Dharmacon.

siRNA transfection:

Confluent HUVECs were cultured at $8 \cdot 10^5$ cells in 60 mm diameter dishes for 24 hours. Cells were then trypsinized and transfected with siRNAs at 1 nM using AMAXA as previously described (Short et al. 2005). The subsequent decrease in $\alpha 5$ expression was assessed by

immunoblotting (-72%, figure 5A). αv is a protein difficult to substantially knock-down (Graef et al. 2005), and one transfection with αv siRNAs only produced a limited extinction (-25%). Therefore, cells were transfected a second time with αv siRNAs 48h after the first transfection. This led to a more significant extinction of αv (\approx -71%), which was assessed by flow cytometry (figure 5C and D), since αv immunoblotting never produced clearly specific bands despite the use of classical commercial antibodies. Transfected cells were then cultured in 35 mm-diameter fibronectin-coated glass-bottom dishes and used for calcium measurement experiments.

Antibodies:

Polyclonal rabbit antibody to integrin $\alpha 5$ (cat. no. sc-10729) (Han et al. 2006) and mouse monoclonal antibody to integrin αv (cat. no. sc-9969) (Nilsson et al. 2004) were purchased from Santa Cruz biotechnology (Heidelberg, Germany). Monoclonal mouse antibody to anti- β tubulin (clone D66) (Audebert et al. 1999) was purchased from Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France.

The peroxidase-conjugated secondary antibodies (cat. no. 111035003, goat, anti-rabbit) and (cat. no. 115035003, goat, anti-mouse), purchased from Jackson Immunoresearch (Newmarket, Suffolk, UK), were used for immunoblotting. Alexa 488-conjugated secondary antibodies (cat. no. A11029, goat, anti-mouse), purchased from Molecular probes-Invitrogen (Cergy Pontoise, France), were used for flow cytometry.

Cell lysis and western blotting:

HUVEC monolayers were washed three times with PBS and incubated with extraction buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 270mM sucrose, 150 mM NaCl, 5mM NaF, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT, 25 μ g/ml leupeptin and 0.5% Triton X-100; 50 μ l for a 25-cm² area) for

30 min with agitation on ice. The cell extracts were electroporated, then centrifuged at 15,000 $\times g$ for 5 min at 4°C. Protein concentration of the lysates was determined with a Micro-BCA kit (Pierce, Rockford, IL) using BSA as standard. Protein extracts of the lysates were electrophoresed on a 7.5% polyacrylamide gel after boiling in β -mercaptoethanol-containing Laemmli buffer. Polyacrylamide gels were incubated for 30min in transfer buffer (95mM glycine and 1mM CaCl_2 containing Tris-HCl (pH 8.9)). Separated proteins were then electroblotted onto nitrocellulose and blocked with 10% low-fat milk in CaCl_2 - and MgCl_2 -containing phosphate-buffered saline (blocking buffer). The blots were incubated overnight (4°C) with the primary antibodies: rabbit anti-alpha 5 integrin (1/200) or anti-tubulin in blocking buffer, the membrane was then incubated with peroxidase-conjugated appropriate antibodies. The antigen was then detected using the ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech - GE Healthcare, Saclay, France) with a peroxidase-labeled goat anti-rabbit antibody.

Flow cytometry:

The cell layer was washed several times with Ca^{2+} - and Mg^{2+} -containing phosphate-buffered saline and trypsinized (0.01% trypsin). Tryptic activity was stopped by the addition of Medium 199 supplemented with 10% fetal calf serum. Aliquots of 10^6 cells were then centrifuged and resuspended in 1% fetal calf serum containing phosphate- buffered saline in the presence of anti- αv primary antibody. After 30min incubation on ice, the cells were pelleted, washed once, and incubated for 30 min with the secondary antibody. Cells were then pelleted, resuspended in 0.5 ml phosphate-buffered saline containing 1%BSA, and analyzed on a fluorescence-activated cell sorter analyzer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) using Cell Quest acquisition and analysis software. A fluorescence threshold separating the αv -negative cells (M1) from αv -positive cells (M2) was set using autofluorescence of unlabeled/untransfected cells as negative control. In each experiment, the relative αv content

in cell populations was estimated as the product of the percentage of αv -positive cells (M2, Figure 5C, table, column head: "% Gated") by the mean αv content per αv -positive cell. The mean αv content per αv -positive cell is assumed to be represented by the mean fluorescence level per cell (M2, Figure 5C, table, column head: "Mean") from which the mean autofluorescence of unlabeled cells (measured at a value of 12.9) was deducted. The value obtained for control siRNA-transfected cells was considered as the reference, normalized to a value of 100.

HUVEC proliferation

Two different methods were used:

1- WST-1 method

WST-1: 4-[3-[4-iodophenyl]-2-4(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio-1,3-benzene disulfonate].

WST-1-based cell proliferation reagent was from Roche Diagnostics (Meylan, France ; Cat. No. 05015944001). The measurement is based on the ability of mitochondrial dehydrogenases of viable cells to cleave tetrazolium salts (such as WST-1), the reaction product becoming absorbent at 450 nm (Bailey et al. 2004 ; Ishiyama et al. 1996). Briefly HUVEC were plated in fibronectin-coated 96-well microplates at 5×10^3 cells/well, in medium 199 containing 5% human serum and incubated at 37°C and 5% CO₂. After 2 hours, cells were treated with PF14 (1 µg/mL) or solvent alone for 48h. WST-1 reagent (10 µL/well) was added and incubated for 3 hours at 37°C and 5% CO₂. Absorbance of the samples, proportional to the viable cell number, was then measured at 450 nm using a microplate reader. The background absorbance (= absorbance of medium 199 + WST-1 in the absence of cells) was deducted before proliferation rates were calculated and comparisons were made.

The proliferation rate in each group was calculated as:

$(\text{ABSORBANCE at 48h} - \text{ABSORBANCE at 0h}) \times 100 / \text{ABSORBANCE at 0h}$

6 wells were studied in each group. 1-way ANOVA was used to statistically compare the proliferation rates in the two groups. The differences were considered as statistically significant at $P \leq 0.05$.

2- Trypsinization/cell count method: HUVEC were trypsinized and resuspended in deprived culture medium containing 5% human serum (instead of 22%), in order to limit spontaneous cell proliferation (Vailhé et al. 1996). Cells were then seeded at 4000 cells/cm² in fibronectin-coated dishes. Two hours after cell seeding, which is enough to allow cell attachment, the dishes were incubated with PF14 (1 µg/mL, which is ≈26 nM), or solvent of PF14. The time of addition of PF14 was considered to be the initial time (T₀). After 48 hours, cells were trypsinized and counted using a Kova cell count unit.

The proliferation rate in each group was calculated as:

$(\text{Cell number at 48h} - \text{Cell number at 0h}) \times 100 / \text{Cell number at 0h}$

Experiments were repeated twice in quadruplicate (n = 8). The values were then compared using a one-way ANOVA. The differences were considered as statistically significant at $P \leq 0.05$.

In vitro wound healing assay:

This in vitro assay aims at evaluating the cellular proliferation and migration capabilities when some cells are destroyed in a confluent monolayer, leading to replacement of the missing cells (Babbin et al. 2007). Cells were seeded on twelve-well tissue culture plates coated with fibronectin and grown to 100% confluence in complete culture medium. Cells were then incubated in deprived culture medium (5% human serum instead of 22%) overnight. Wounds were produced by scratching the cells with a 200-µL pipette tip then the wounded monolayers were washed twice with PBS to remove cell debris. Monolayers were

incubated in deprived cell culture medium and imaged at 0 and 8 hours using an Olympus inverted microscope with an attached CCD camera. Wound areas were measured from the images using Image J software (NIH). In each case, three measurements along the wound length were averaged to determine the wound area. Wound closure rate was calculated as:

$$(\text{Wound area at 0h} - \text{Wound area at 8h}) \times 100 / \text{Wound area at 0h}$$

The values were then compared using a one-way ANOVA. The differences were considered as statistically significant at $P \leq 0.05$.

HUVEC adhesion assay

96 wells microplates were coated with different concentrations of human fibronectin and fibrillin-1 recombinant fragments (PF14 and PF9) and kept at 4°C overnight. 10 mg/mL BSA was used as negative control. After removing the unbound peptides, the non-specific binding was blocked by 10 mg/mL BSA for 2 hours at room temperature. HUVEC were trypsinized and seeded at 3×10^4 cells / well in serum free medium and incubated for 1h30 min at 37°C, 5%CO₂. The wells were washed twice with PBS, to remove non-adherent cells and adherent cells were fixed with 10 % glutaraldehyde in Percoll for 5 min. The cells were washed four times with PBS and stained with crystal violet 0.1 % (w/v in water) for 30 min. The cells were washed with water and lysed in 0.2% TritonX-100 (w/v in water) for 2 hours. The absorbance was measured at 560 nm with an ELISA plate reader.

Cell migration/chemotaxis - transwell assay:

Cell migration was assayed using a modified Boyden chamber as previously described (Lamouille et al. 2002). The lower side of the transwell inserts (3µm pore; Falcon, Becton-Dickinson) was previously coated overnight with PF14 and PF9 fragments at 10 µg/ml.

Confluent monolayer of HUVEC was labeled in serum-free Medium 199 with CellTracker CMRA Orange (10 μ M) for 45 min at 37°C. Cells were rinsed and incubated in fresh medium for additional 45 min at 37°C to allow leakage of unbound fluorophore.

Fluorophore-labeled HUVECs were trypsinized and suspended at the final concentration of $2 \cdot 10^5$ cells/ml in Medium 199 containing 0.5% human serum. 100 μ l of the cell suspension was added to the upper side of the transwell inserts. The inserts were placed in 24-well plates (Becton-Dickinson) containing 500 μ l Medium 199 with 0.5% human serum (control) and incubated at 37°C. The migration of cells through the optically opaque insert membrane to the lower chamber was assessed by fluorescence measurement. The fluorescence (excitation 548 nm, emission 576 nm) of migrated cells through the optically opaque membrane was measured at 0 and 24 hours. The number of migrated cells was expressed as the difference of fluorescence between 0 and 24 hours.

REFERENCES

Audebert S, White D, Cosson J, Huitorel P, Eddé B, Gagnon C (1999) The carboxy-terminal sequence Asp427-Glu432 of beta-tubulin plays an important function in axonemal motility. *Eur J Biochem.* 261:48-56.

Babbin BA, *et al.* (2007) Annexin 2 regulates intestinal epithelial cell spreading and wound closure through Rho-related signaling. *Am J Pathol* 170(3):951-966.

Bailey SR, Polan JL, Munoz OC, Agrawal MC, & Goswami NJ (2004) Proliferation and beta-tubulin for human aortic endothelial cells within gas-plasma scaffolds. *Cardiovasc Radiat Med* 5(3):119-124.

Baldock C, *et al.* (2001) The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol* 152(5):1045-1056.

Bax DV, *et al.* (2003) Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Biol Chem* 278(36):34605-34616.

Bax DV, *et al.* (2007) Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation. *J Cell Sci* 120(Pt 8):1383-1392.

Cain SA, Morgan A, Sherratt MJ, Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM (2006) Proteomic analysis of fibrillin-rich microfibrils. *Proteomics* 6:111-122.

Cooper JA (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105(4):1473-1478.

El-Hallous E, *et al.* (2007) Fibrillin-1 interactions with fibulins depend on the first hybrid domain and provide an adaptor function to tropoelastin. *J Biol Chem* 282(12):8935-8946.

Faury G, Usson Y, Robert-Nicoud M, Robert L, & Verdetti J (1998a) Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(6):2967-2972.

Faury G, Garnier S, Weiss AS, Wallach J, Fulop T Jr., Jacob MP, Mecham RP, Robert L, Verdetti J (1998b) Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. *Circ Res* 82: 328-336.

Garnier-Raveaud S, *et al.* (2001) Identification of membrane calcium channels essential for cytoplasmic and nuclear calcium elevations induced by vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Growth Factors* 19(1):35-48.

Graef T, Steidl U, Nedbal W, Rohr U, Fenk R, Haas R, Kronenwett R (2005) Use of RNA interference to inhibit integrin subunit alphaV-mediated angiogenesis. *Angiogenesis*. 8:361-72.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 260:3440-3450.

Han S, Ritzenthaler JD, Sitaraman SV, Roman J (2006) Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 281: 29614-29624.

Ishiyama M, *et al.* (1996) A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19(11):1518-1520.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, & Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 52(11):2745-2756.

Jones NP, Peak J, Brader S, Eccles SA, & Katan M (2005) PLCgamma1 is essential for early events in integrin signalling required for cell motility. *J Cell Sci* 118(Pt 12):2695-2706.

Kuo CL, *et al.* (2007) Effects of fibrillin-1 degradation on microfibril ultrastructure. *J Biol Chem* 282(6):4007-4020.

Lamouille S, Mallet C, Feige JJ, Bailly S (2002) Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 100: 4495-4501.

- Leung PC, *et al.* (2006) Mechanism of non-capacitative Ca²⁺ influx in response to bradykinin in vascular endothelial cells. *J Vasc Res* 43(4):367-376.
- Lu Y, Sherratt MJ, Wang MC, Baldock C (2006) Tissue specific differences in fibrillin microfibrils analysed using single particle image analysis. *J Struct Biol* 155:285-293.
- Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, & Mikoshiba K (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release. *J Biochem* 122(3):498-505.
- Narahashi T & Herman MD (1992) Overview of toxins and drugs as tools to study excitable membrane ion channels: I. Voltage-activated channels. *Methods Enzymol* 207:620-643.
- Nilsson M, Ljungberg J, Richter J, Kiefer T, Magnusson M, Lieber A, Widegren B, Karlsson S, Fan X (2004) Development of an adenoviral vector system with adenovirus serotype 35 Tropism; efficient transient gene transfer into primary malignant hematopoietic cells. *J. Gene Med.* 6:631-41.
- Short SM, Derrien A, Narsimhan RP, Lawler J, Ingber DE, Zetter BR (2005) Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by beta1 integrins. *J Cell Biol.* 168:643-53.
- Tafer H, Ameres SL, Obernosterer G, Gebeshuber CA, Schroeder R, Martinez J, Hofacker IL (2008) The impact of target site accessibility on the design of effective siRNAs. *Nature Biotech.* 26:578-83.
- Thastrup O, *et al.* (1989) Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions* 27(1-2):17-23.
- Tsien RW, Hess P, McCleskey EW, & Rosenberg RL (1987) Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation, and block. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 16:265-290.
- Vailhe B & Tranqui L (1996) [The role of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) and of vascular endothelial growth factor (VEGF) on the in vitro angiogenesis process]. *C R Acad Sci III* 319(11):1003-1010.
- Vert JP, Foveau N, Lajaunie C, Vandenbrouck Y (2006) An accurate and interpretable model for siRNA efficacy prediction. *BMC Bioinformatics.* 7:520.
- Wang R, Sauve R, & de Champlain J (1995) Abnormal regulation of cytosolic free calcium in vascular endothelial cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 13(9):993-1001.
- Yule DI & Williams JA (1992) U73122 inhibits Ca²⁺ oscillations in response to cholecystokinin and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells. *J Biol Chem* 267(20):13830-13835.
-

2.2.3 Article 2

1 **Calcium signaling pathway, cellular dynamics and**
2 **extracellular matrix remodeling caused by elastin and**
3 **microfibrills fragments in human endothelial cells.**

4
5 Ghandour Z¹., Huber P²., Gulino D³, Scandolera A⁴, Duca L⁴, Debelle L⁴, Weiss AS⁵, Kielty CM⁶, Baldock
6 C⁶, Godin-Ribuot D¹, Faury G¹

- 7
8
- 9 1. Laboratoire Hypoxie: Physiopathologie Cardiovasculaire et Respiratoire (HP2), INSERM U 1042,
10 Université Joseph Fourier, Bâtiment Jean Roget, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Domaine de La
11 Merci, 38706 La Tronche, France.
 - 12 2. Laboratoire biologie du cancer et de l'infection, INSERM UMR-S 1036, Equipe Pathogène
13 Bactérienne et Réponses Cellulaires, iRTSV/GPC, 17 rue des Martyrs, CEA Grenoble, France.
 - 14 3. Laboratoire biologie du cancer et de l'infection, INSERM UMR-S 1036, Equipe Jonctions endothéliales
15 et Angiogenèse, iRTSV/GPC, 17 rue des Martyrs, CEA Grenoble, France.
 - 16 4. Laboratoire de Signalisation et Récepteurs Matriciels, FRE CNRS 3184, Université de Reims Champagne
17 Ardenne, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2,
18 France.
 - 19 5. School of Molecular Bioscience, University of Sydney, New South Wales 2006, Australia.
 - 20 6. Wellcome Trust Centre for Cell-Matrix Research, Faculty of Life Sciences, University of
21 Manchester, Manchester M13 9PT, UK.
- 22

23 **Corresponding author:**

24 Pr. Gilles FAURY- Laboratoire "Hypoxie : Physiopathologie Cardiovasculaire et Respiratoire"
25 (HP2)- INSERM U 1042- Université Joseph Fourier- Bâtiment Jean Roget- Facultés de Médecine
26 et de Pharmacie- Domaine de La Merci- 38706 La Tronche Cedex- France- Tél : (33) 4 76 63 75
27 39- E-mail : Gilles.Faury@ujf-grenoble.fr

28

29 **ABSTRACT**

30 Elastic fibers, made of elastin and fibrillin-rich microfibrils, provide deformable tissues with
31 elasticity. They are particularly important in vascular walls since many biological effects in
32 various cell types are triggered by elastin and microfibril components, whose mutations can
33 result in severe cardiovascular diseases such as Williams and Marfan syndromes, respectively.
34 In order to investigate whether elastin and microfibrils differently regulate vascular cell
35 functions, we studied the effect of elastin precursor or peptides and microfibril components
36 on human umbilical endothelial cell (HUVEC) signaling. Our study showed that the stimulation
37 of the elastin-laminin receptor and the integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ by these molecules elevate the
38 intracellular calcium level through the mobilization of both extracellular and intracellularly-
39 stored calcium. The activation of these receptors triggered several downstream pathways,
40 including Src, ERK1/2 and PLC, the latter leading to the release of calcium from the
41 endoplasmic reticulum through the stimulation of the IP3 and ryanodine receptors. All the
42 elastic fiber component signals applied induced increasing cell proliferation and adhesion
43 rate. The effects on cell migration were different, with a tendency to increase with elastin
44 peptides and opposed effects of microfibrils depending on the HUVEC state, i.e. adherent or
45 suspended. In addition, all elastic fiber components increased pro-MMP-2, collagen, fibrillin-1
46 and, particularly, elastin syntheses, and MMP-1 activity. Our results suggest that the
47 deficiency in one of the constituents of elastic fibers could alter the normal vascular cell
48 signaling and the endothelium-mediated regulation of the vascular wall structure and
49 function. This could contribute to the onset of Marfan and Williams syndromes.

50 **Key-words:** elastic fiber, elastin, microfibrils, fibrillin, collagen, MMPs, TIMPs, endothelial
51 cells, calcium signaling, proliferation/migration, extracellular matrix.

52

53 **INTRODUCTION**

54 Elastic fibers are abundant in dynamic vertebrate tissues such as arteries, lungs, skin and
55 ligaments, in which they are responsible for elasticity and resilience, therefore –regarding the
56 cardiovascular system- smoothing of the pulsatile blood flow and pressure delivered by the
57 heart (Kielty, Sherratt et al. 2002, Yanagisawa, Davis et al. 2002). The functionality of these
58 extracellular matrix (ECM) structures is crucial for normal tissue/organ function. Elastic fibers
59 are formed by progressive deposition of elastin (Eln) on a microfibril (MF) scaffold mainly
60 made of fibrillins –in particular fibrillin-1- and, to a lower extent, by many associated proteins
61 such as microfibril-associated glycoproteins (MAGPs), fibulins, and elastin microfibril
62 interface-located protein-1 (EMILIN-1) (Wagenseil and Mecham 2007). Evidence of the
63 importance of elastic fibers is provided by the severe genetic diseases caused by mutations in
64 several elastic fiber components. A variety of elastic-tissue-related diseases result from the
65 accumulation of dysfunctional or decreased content in normal elastic fiber components (Opitz
66 and Utkus 2001). Mice genetically deficient for fibulin-5 exhibit severe vascular malformations
67 (Xavier-Neto, Castro et al. 2007). Fibrillin-1 mutations cause Marfan syndrome, associated
68 with ocular (ectopia lentis) and skeletal defects and, at the cardiovascular level, aorta
69 dilatation, aneurysm and dissection (Judge and Dietz 2005, Lopes, Delezoide et al. 2006,
70 Ramaswamy, Lytrivi et al. 2006). On the contrary, mutations in the elastin gene do not cause wall
71 thinning/aneurysm and rather lead to vascular smooth muscle cell (VSMC) hyper-
72 proliferation, wall thickening and arterial stenosis, such as in supravalvular stenosis (SVAS)
73 and Williams syndrome (Williams, Barratt-Boyes et al. 1961, Beuren, Apitz et al. 1962, Broder,
74 Reinhardt et al. 1999, Giordano, Turchetta et al. 2001).

75 Although the mechanical roles and multiple actions on cells of both fibrillin-1 and elastin have
76 previously been demonstrated, the causes of the opposite consequences of genetic
77 deficiencies in these two components of the same elastic fibers are not elucidated. RGD-
78 containing fragments of fibrillin-1 induce intracellular calcium elevation, adherence and
79 migration in endothelial cells, fibroblasts and mesangial cells, through their interaction with
80 integrins. Also, fibrillin-1 stimulates integrin-mediated matrix metalloproteinase (MMP)
81 production –in particular MMP-1 and MMP-3-, which was observed in vitro and after
82 liberation of active fragments of fibrillin-1 resulting from fibrillin-1 mutation in Marfan
83 syndrome (Pfaff, Reinhardt et al. 1996, Bax, Bernard et al. 2003, Booms, Pregla et al. 2005, Bax,
84 Mahalingam et al. 2007, Mariko, Ghandour et al. 2010). Elastin peptides also increase intracellular
85 calcium level (Faury, Usson et al. 1998), increase MMP-2 production (Lindop, Boyle et al.
86 1995, Robinet, Fahem et al. 2005), influence migration (Ooyama, Fukuda et al. 1987) of many
87 cell types including endothelial cells. In addition, they reduce elastin production (Arribas,
88 Hinek et al. 2006) and stimulate proliferation of vascular smooth muscle cells (Ooyama,
89 Fukuda et al. 1987, Fox 1994, Arribas, Hinek et al. 2006). However, others studies evidenced
90 an inhibitory effect of elastin peptides on VSMC proliferation (Ito, Ishimaru et al. 1997, Karnik,
91 Brooke et al. 2003, Majesky, Dong et al. 2011), suggesting the existence of different
92 alternative pathways for elastin peptide signaling, possibly depending on the cell function or

93 environment, and potentially explaining the VSMC excessive proliferation observed in genetic
94 elastin deficiency-related diseases, i.e. SVAS and Williams syndrome (Urban, Riazi et al. 2002).
95 This is consistent with the previous suggestion of an age-dependent evolution of elastin
96 peptide signaling: in response to elastin peptides, calcium signaling decreases with age in
97 leukocytes (Mulligan-Kehoe 2010) and the dilatory response of the aorta of middle-aged rats
98 is lost in young and old animals (Faury, Chabaud et al. 1997).

99 Here, in order to shed light on the differences and similarities between elastin and microfibril-
100 component cell signaling, we have compared the effects of microfibrils, RGD-containing
101 fibrillin-1 fragments, elastin peptides and tropoelastin –the monomeric precursor of elastin
102 before polymerization- on human endothelial cell signaling, migration, proliferation, adhesion
103 and extracellular matrix production and degradation. Our results show that many cellular
104 events triggered by the application of the different tested molecules are close to each other,
105 although several differences could be observed.

106

107 **MATERIALS AND METHODS**

108 **Protein fragment production**

109 Kappa-elastin (kE) was obtained by hydrolysis of highly purified bovine ligamentum nuchae
110 elastin with 1 M KOH in 80% (v/v) ethanol (Kielty, Stephan et al. 2007). kE has an average
111 molecular weight of 75 kDa. It was dissolved prior to the experiments in PBS. In our
112 experiments, kE was used at concentrations of 0.01, 0.1 and 1 µg/ml (≈ 0.13 –13 nM).

113 rTE, recombinant human tropoelastin isoform SHELΔ26A (Synthetic Human Elastin without
114 domain 26A), corresponding to amino acid residues 27-724 of GenBank entry AAC98394 (gi
115 182020), was purified from bacteria on a multigram scale, as previously described (Mellander
116 1970, Farhi and Sheehan 1990). rTE molecular mass is 63490 kD. In our experiments, it was
117 used at concentrations of 10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} mg/ml (0.01, 0.1 and 1 µg/ml, about 0.1–10 nM).

118 Recombinant human tropoelastin isoform SHELΔ26A ΔRKRK (rTE ΔRKRK) is a derivative of
119 SHELΔ26A that is missing the last four amino acids (i.e. RKRK), which interferes with its ability
120 to bind to integrin $\alpha v \beta 3$ (Bax, Rodgers et al. 2009). It was used at 10^{-3} mg/ml (10nM).

121 Aorta microfibrils were isolated from bovine aorta, in native and non-denaturing conditions,
122 as described (Baile 1996, Pfaff, Reinhardt et al. 1996, Plante 2002, Frederic H. Martini 2004). A
123 piece of the aorta from a newborn calf was incubated for 18 hours at 4°C with 0.5mg/ml
124 purified bacterial collagenase 1A, in the presence of hyaluronidase (5U/mL) and freshly
125 prepared protease inhibitors. Microfibrils were collected after passage of the supernatant
126 through a CL-2B sepharose column. In our experiments, aortic microfibrils (average
127 MW \approx 15000 kDa) were used at 0.15µg/mL ($\approx 10^{-11}$ mol/L), 0.5µg/mL ($\approx 3.3 \times 10^{-11}$ mol/L) and
128 1.5µg/mL ($\approx 10^{-10}$ mol/L).

129 Microfibrils exempt of collagen VI were purified from bovine ciliary zonules as follows.
130 Samples were incubated in 400 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 5mM CaCl₂ with
131 chromatographically purified type VII collagenase (10µg/ml; Sigma Aldrich, Poole, UK) and
132 freshly prepared protease inhibitors (2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 5 mM N-
133 ethylmaleimide). The samples were incubated for 18 h at 4 °C, and they were then centrifuged
134 at 5000xg for 5 min. The supernatant was size-fractionated on a Sepharose CL-2B column in
135 400 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 5 mM CaCl₂. The excluded volume (V_o) contained
136 fibrillin-rich microfibrils. Microfibrils were used at 0.5µg/ml (Wang, Lu et al. 2009).

137 Rotary shadowed collagen VI (colVI) was prepared and visualised as described (Wagenseil and
138 Mecham 2009). Bovine corneal tissue (≈0.2 g of wet weight) was finely diced with a razor
139 blade (Wagenseil and Mecham 2009) and suspended in 2 ml buffer (400 mm NaCl, 20 mm
140 Tris-HCl (pH 7.4)) containing protease inhibitors (3 mm N-ethylmaleimide, 5 mm PMSF) and
141 0.1 mg/ml chromatographically purified bacterial collagenase (type VII, Sigma-Aldrich, Poole,
142 UK). The digestion was left at 4 °C overnight with gentle stirring. The digested tissue was
143 centrifuged at 1500xg for 3 min, and the supernatant was size-fractionated on a Sepharose
144 CL-2B column in the same buffer as used for the digest. The V_o contained collagen VI, which
145 was used in the experiments at 0.15µg/ml.

146 The cloning, expression and purification of RGD-containing recombinant human fibrillin-1
147 fragments PF14 (residues 1362-1688), using the mammalian expression vector pCEP-pu/AC7
148 and 293-EBNA cells, has been described previously (Bax, Bernard et al. 2003, Bax, Mahalingam
149 et al. 2007). A PF14 mutant in which RGD was replaced by RGA (PF14-RGA) was produced
150 using a site-directed mutagenesis of aspartic acid 1541 to alanine, as previously described
151 (Bax, Bernard et al. 2003). Validation of the purity and folding of all the fragments used were
152 performed as described (Bax, Mahalingam et al. 2007).

153

154 **Cell culture**

155 Human umbilical venous endothelial cells (HUVEC) were isolated as described previously with
156 some adaptations (Faury, Usson et al. 1998, Mariko, Ghandour et al. 2010). Briefly, human
157 umbilical vein was washed with PBS (without Ca²⁺ and Mg²⁺), then cells were harvested by a
158 10min incubation with collagenase 1A from *Clostridium histolyticum* (Rocha applied science
159 10103586001) at 37°C, then mechanical massage and flushing of the vein first with culture
160 medium then with PBS. The collected cells were then cultured, in a 60mm dishes pre-coated
161 with 0.25 mg/mL human fibronectin, in medium 199 containing 20% fetal bovine serum,
162 streptomycin (0.1mg/mL), penicillin (100UI/mL) under standard cell culture conditions (37°C,
163 5% CO₂, humid atmosphere). The cell cultures were then amplified by trypsinization, cell
164 collection and re-seeding by thirds in 3 new dishes. In these experiments, the cells used were
165 only used at the first and second passages.

166

167 **Intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in adhering HUVEC**

168 Measurements were performed by classical microscopy (CellR system, Olympus, Rungis,
169 France) using the calcium-sensitive fluorescent dye Fluo-3/AM (excitation: 488nm; emission:
170 >510nm, F6142, Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France), as previously described (Mariko,
171 Ghandour et al. 2010). The cells were bathed in a physiological salt solution composed of:
172 NaCl (125mmol/L); KCl (5.6mmol/L); CaCl₂ (2.4mmol/L); MgCl₂ (1.2mmol/L); D-glucose
173 (11mmol/L); HEPES (10mmol/L); pH 7.4. Bradykinin (a molecule that induces receptor-
174 mediated increase in intracellular calcium) and calcium ionophore A23187 were used to verify
175 cell functionality, since they are reference agents elevating $[Ca^{2+}]_i$ in endothelial cells (Sadler
176 1997). In some experiments, different molecules were added : Cytochalasin-D, an actin
177 microfilament depolymerizer, was added at 10^{-5} mg.mL⁻¹ for 45 min before calcium
178 measurements. PLC inhibitor U73122, JBS5 and LM609 (blocking antibodies to integrins $\alpha_5\beta_1$
179 and $\alpha_v\beta_3$, respectively) were used at 50 μ M and 10 μ g/mL, respectively, and were added 30 min
180 before calcium measurements. NiCl₂ (a calcium channel blocker) and thapsigargin (agent that
181 induce the release of calcium from the endoplasmic reticulum and prevents the return of
182 calcium in the ER) were added 15 min before calcium measurements and were used at 1mM
183 and 1 μ M, respectively. IP₃-receptor inhibitor 2-APB (2-Aminoethoxydiphenyl borate) and
184 lactose (an elastin receptor blocker) used at 50 μ M and 10^{-4} M, respectively, were added 5 min
185 before calcium measurements. All other drugs used, Src inhibitor PP2, Erk1/2 inhibitor
186 PD98059, Dantrolen and Nifedipine were added 10 min before calcium measurements and
187 were used respectively at 10 μ M, 50 μ M, 10 μ M and 3 μ M. Analyses were performed by using
188 the Image J software (NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). In the figures, each tracing
189 represents the evolution of the Fluo-3 fluorescence in one cell.

190

191 **HUVEC adhesion assay**

192 Adhesion assay protocol was used as described previously with some modifications (de Graaf,
193 Banga et al. 1992). 96 wells microplates were coated with different concentrations of the
194 tested proteins and incubated overnight at 4°C. BSA (10mg/mL) was used as the negative
195 control. Alternatively, HUVECs were incubated with 1% FCS in M199 medium overnight. The
196 next day, HUVEC were trypsinized and seeded at 3×10^4 cells / well in a serum free medium
197 and incubated 2h at 37°C and 5% CO₂. Non-adherent cells were removed and adherent cells
198 were fixed with 70% ethanol for 10min. The wells were then washed with PBS and stained
199 with crystal violet 0.1% (w/v) in water for 30min. After washing with PBS, the cells were then
200 lysed in 0.2% TritonX-100 in water for 2 hours. The absorbance was measured at 460 nm with
201 an ELISA plate reader. Relative absorbance of product X = (absorbance at 2h with product X/
202 absorbance at 2h for BSA).

203

204 **Proliferation assay**

205 Cell proliferation rate was measured by using the WST-1 (4-[3-[4-iodophenyl]-2-4(4-
206 nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio-1,3-benzene disulfonate]) (Roche Diagnostics, Meylan, France)
207 coloration method as described previously (Mariko, Ghandour et al. 2010). HUVECs were
208 incubated overnight in M199 medium containing 1%FCS serum. The cells were then
209 trypsinized and seeded at 3×10^4 cells/well (medium volume per well: 100 μ L). Two hours after
210 cell plating, medium was removed and replaced by a 100 μ L medium containing the different
211 proteins. At the adequate time (16 h or 48h), 10 μ L/well cell proliferation reagent WST-1 was
212 added. Absorbance of the samples, proportional to the number of viable cells, was then
213 measured after 3 hours at 450nm using a microplate reader, while background absorbance
214 (absorbance of a blank well) was deducted.

215 Proliferation rate at time t for product X = [(Absorbance at time t - Absorbance at 0h)_{productX} X
216 100] / (Absorbance at time t - Absorbance0h)_{control}.

217

218 **Cell migration measurement**

219 Cell migration was assayed using a modified Boyden chamber as previously described (Mariko,
220 Ghandour et al. 2010). The lower side of the transwell inserts (3 μ m pore; Falcon, Becton-
221 Dickinson) was previously coated overnight with the different tested proteins. Confluent
222 monolayer of HUVEC was labeled in serum-free M199 Medium with CellTracker CMRA Orange
223 (10 μ M) for 45 min at 37°C. Cells were washed 3 times and incubated in fresh medium for an
224 additional 45min at 37°C to allow leakage of unbound fluorophore. Fluorophore-labeled
225 HUVECs were trypsinized and suspended at the final concentration of 2×10^5 cells/ml in
226 Medium 199 containing 0.5% human serum. 100 μ l of the cell suspension was then added to
227 the upper side of the transwell inserts which were then placed in 24-well plates (Becton-
228 Dickinson) containing 500 μ l Medium 199 with 0.5% human serum (control) and incubated at
229 37°C. The migration of cells through the optically opaque insert membrane to the lower
230 chamber was measured by fluorescence measurement at 0, 24 and 48 hours. The normalized
231 fluorescence value for product X = [(Fluorescence at time t - fluorescence0h)_{productX} X 100] /
232 (Fluorescence at time t - fluorescence0h)_{control}

233

234 **Wound healing assay**

235 HUVECs were grown in human plasma fibronectin-coated plates until confluence in a
236 complete culture medium. They were then incubated in deprived culture medium (0.5%FCS)
237 overnight. Wounds were produced in vitro by scratching the cell layer using a pipette tip and

238 wound closure was monitored over time, as described (Mariko, Ghandour et al. 2010). Cell
239 cultures were imaged at 0, 8, 12 and 25hours after wounding and addition of different
240 proteins. Wound areas were measured from the images using Image J software (NIH, USA).

241 Wound closure rate = [(Wound area at 0h - Wound area at 8h) x 100] / Wound area at 0h

242

243 **Measurement of the extracellular matrix protein content by ELISA**

244 The method described by Giro et al. (Vallet and Wiel 2001) was used in our experiments.
245 HUVEC were deprived of serum overnight in M199 containing only 1% FCS, to limit cell
246 proliferation, before trypsinization and seeding at 25000 cells/well in a P96 plate, where the
247 cells were left for another night for cell adhesion. The culture medium was then removed and
248 replaced by fresh 1% FCS-DMEM in which the molecules to be tested were added. For each
249 concentration of each molecule, 8-14 wells were used. In addition, the cells of 8 other wells
250 were bathed in 1% FCS-DMEM containing 0.1 μ M dexamethasone and the cells of 8 other
251 wells were bathed in 20% SVF DMEM medium. Dexamethasone has been shown to induce a
252 strong increase in production of extracellular elastin, fibrillin-1 and collagen type I, and was
253 used here as a positive control (Garland, Hiley et al. 2011). Cells used in our experiments
254 originated from several cell cultures. After 48h, i.e. the time to allow for elastin, fibrillin or
255 collagen I synthesis and excretion, the cells were washed 3 times with PBS (Invitrogen- Life
256 Technologies Ltd., reference #14040174), then fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde at
257 room temperature. The wells were washed again 3 times with PBS, before blockade of the
258 non-specific binding sites with 2%BSA containing-PBS for 30 min at 37°C, then washed 3 times
259 with 0.1% Tween-containing PBS. After this step, the cells were incubated in 2%BSA
260 containing-PBS for 1h at 37°C with the primary antibody at the concentration of 1/1000 for
261 anti-elastin and anti-fibrillin 1, and 1/4000 for anti-collagen type I antibody. The cells were
262 then washed 3 times with 0.1% Tween-containing PBS before incubation for 1h at 37°C in the
263 dark with the horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibodies. Secondary anti-
264 mouse antibody for elastin and fibrillin-1 synthesis assays was used at 1/10000, and anti-
265 rabbit antibody for collagen synthesis assay was used at 1/25000. The cells were then washed
266 3 times with 0.1% Tween-containing PBS, before 100 μ l TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine,
267 Millipore ES022) , the substrate of HRP, was added to each well for 30 min in the dark at room
268 temperature. The reaction was then stopped by the addition of 100 μ l 0.3 M-sulfuric acid to
269 each well. After 10 min, the absorbance of each well – a function of extracellular elastin,
270 fibrillin-1 or collagen type I quantities- was measured at 450 nm.

271

272 **Cell stimulation and medium extraction for zymographies**

273 Confluent cells in 60-mm dishes were serum-starved in 1% FCS in M199 for 24 hours prior to
274 stimulation by 1 μ g/mL of kE, rTE, MF and PF14, in order to use culture medium after

275 extraction for zymographies assays HUVECs were then stimulated with the tested proteins for
276 30min, 2, 16 and 30 hours. Since the tested proteins were diluted in PBS, PBS alone –in place
277 of proteins in solution in PBS- was systematically applied to control cells. Cell stimulation was
278 stopped and medium was collected and stored at -20°C.

279

280 **Gelatin and collagen zymography.**

281 MMP activities in cell culture supernatants were measured by substrate gel electrophoresis
282 (zymography). The culture supernatants were mixed with sample buffer (0.125M Tris HCl, 4%
283 sodium dodecyl sulfate [SDS], 20% glycerol, and 0.01% bromphenol blue) and deposited into
284 10% polyacrylamide gels containing 0.2% (w/v) gelatin or 0.5mg.mL⁻¹ collagen (BD 354236)
285 for gelatin or collagen zymographies, respectively, according to a previously reported
286 methods (Shadwick 1999, Dejana, Orsenigo et al. 2009, Huber 2009, Wilkesman and Kurz
287 2009). Electrophoresis was then performed at 100V for gelatin and 70V at 4°C for collagen
288 zymographies, before the gels were washed in 2.5% Triton X-100 for 40 minutes to remove
289 the SDS, then incubated in digestion buffer (50 mMTris HCl [pH 7.6], 0.15M NaCl, 10 mM
290 CaCl₂, and 0.02% NaN₃) overnight at 37°C. The gels were stained with 0.1% Coomassie
291 brilliant blue R250 before washing of the staining to visualize the clear bands. Clear bands
292 represent zones where gelatin or collagen metalloproteinases (MMPs) were present and
293 digested gelatin or collagen substrate after their activation. Molecular weight of the band
294 observed determine the corresponding MMP. Analyses of band intensities were performed by
295 using Image J software (NIH, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

296 The formula used to calculate the relative activity of each MMP with treatment X at time t
297 was: (band intensity at time t)_{product X} / (band intensity at time t)_{control}.

298

299 **Gelatin reversed zymography**

300 In order to analyze the presence and activity of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)
301 in cell culture supernatants, gelatin-reversed zymography was performed in 15%
302 polyacrylamide gels containing 0.1% (w/v) gelatin and 200ng/mL recombinant MMP-2
303 activated by treatment with 1 mM aminophenylmercuric acetate (APMA) overnight at 4°C.
304 The culture supernatants were mixed with sample buffer (0.125M Tris HCl, 4% sodium
305 dodecyl sulfate [SDS], 20% glycerol, and 0.01% bromophenol blue) and gels were treated as
306 described for gelatin zymography. The presence of tissue inhibitor of metalloproteases
307 (TIMPs) was visualized as Coomassie blue-stained bands. These bands represent the zones
308 where TIMPs are present, thus inhibiting the digestion and degradation of the gelatin by the
309 metalloproteinase MMP-2 (Shadwick 1999, Dejana, Orsenigo et al. 2009, Huber 2009,
310 Wilkesman and Kurz 2009). Analyses of band intensities were performed by using the Image J
311 software (NIH, USA).

312 The formula used to calculate the relative activity of TIMP2 with treatment X at time t was:
313 $(\text{band intensity at time } t)_{\text{product X}} / (\text{band intensity at time } t)_{\text{control}}$.

314

315 **Products and antibodies**

316 Unless otherwise indicated, physiological solutions and culture medium were purchased from
317 invitrogen (Saint Aubin, France) and other products and drugs were purchased from Sigma-
318 Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Anti-elastin antibody Sigma E4013 was purchased from
319 Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France) while anti-fibrillin antibody clone 11C1.3, anti-
320 collagen Type I antibody AB745, anti-Integrins antibodies LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) and JBS5 (anti-
321 $\alpha_5\beta_1$) were purchased from Millipore (Molsheim, France).

322

323 **Data analysis**

324 When applicable, groups were compared by using one-way ANOVAs followed by Fisher's Least
325 Significant Difference (LSD) test for paired comparisons, and presented values were mean \pm
326 SEM. $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant.

327

328

329 **RESULTS**

330

331 **Action of elastin and microfibrils on intracellular free calcium concentration**

332 Addition of kappa-elastin (kE) (Fig. 1A-C), recombinant human tropoelastin (rTE) (Fig. 1D-F)
333 and microfibrils (Fig. 1G-I) produced dose dependent elevations of intracellular free calcium
334 level in HUVEC, compared to the control (Figure 1J). With decreasing concentrations of kE, rTE
335 and MF, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peak amplitude was reduced, a lower number of cells responded and, for
336 kE and rTE only, the cell response was delayed. Since traces of collagen VI could be found in
337 classically-extracted microfibrils, purified microfibrils without collagen VI were also tested (Fig.
338 1K,L). Compared to classical microfibrils, collagen VI-free microfibrils produced $[\text{Ca}^{2+}]_i$
339 elevations in a reduced number of cells (Fig. 1K), while collagen VI alone induced a low
340 although significant effect (Fig. 1L). Hence, collagen VI contained in MF seem to be a minor
341 contributor $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevations induced by MF. Detailed results and statistics are represented in
342 online supplementary Tables 1-3.

343 In the following calcium measurements, kE and rTE at $1\mu\text{g}/\text{mL}$ and MF at $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ were used.

344

345 **Membrane receptors leading to the cellular calcium response to elastin and**
346 **microfibrils**

347 In order to induce an increase in intracellular calcium level, the tested proteins need to
348 interact with their receptors. Therefore, we investigated the potential involvement in the cell
349 response of the elastin receptor complex (ERC), the integrin $\alpha_v\beta_3$ -a receptor for both elastin
350 and fibrillin-1- and the integrin $\alpha_5\beta_1$ -a receptor for fibrillin-1 (Hinek, Wrenn et al. 1988,
351 Sakamoto, Broekelmann et al. 1996, Bax, Bernard et al. 2003, Rodgers and Weiss 2004, Guo,
352 Booms et al. 2006). Blockade of the ERC by lactose (Mecham 1991) abolished or strongly
353 inhibited the calcium peaks observed after stimulation by kE, rTE, MF and rTE Δ RKRK,
354 indicating that the elastin-ERC interaction is an essential step leading to intracellular calcium
355 elevation in HUVECs (Fig. 2A-D). Moreover, blocking the integrin $\alpha_v\beta_3$ also resulted in: i) an
356 abolition or dramatic reduction of the calcium peak amplitudes and number of responding
357 cells in cells stimulated by all the molecules tested, and ii) a 6-fold higher delay of the calcium
358 response in cells stimulated by rTE (Fig. 2E-H). Detailed results and statistics are presented in
359 online supplementary Tables 1-3. Besides, the use the blocking antibodies to integrins $\alpha_5\beta_1$
360 strongly delayed and reduced the number and amplitude of the calcium peaks triggered by
361 MF (Fig. 2I). Finally, it has to be noted that, compared to the cell response obtained with rTE,
362 rTE Δ RKRK induced a decreased number of responding cells and amplitude of the calcium
363 peaks (Figure 2J and online supplementary Table 2). These results suggest that the ERC and
364 integrin $\alpha_v\beta_3$ are both necessary for elastin signaling, while the three receptors studied here
365 are necessary to induce calcium release with cell stimulation by MF.

366

367 **Origin of calcium in the cellular response to elastin and microfibrils**

368 Endoplasmic reticulum (ER) is the main calcium store in endothelial cells (Bochaton-Piallat and
369 Gabbiani 2005). Therefore, we first used thapsigargin (Figure 3A-C), which empties and
370 prevents restoration of the intracellular calcium stores (ER) in HUVEC (Chang, Chi et al. 2002,
371 Enzerink and Vaheri 2011), in order to study whether the $[Ca^{2+}]_i$ peaks triggered by elastin or
372 MF originate from the ER-released calcium. Thapsigargin induced the abolition of the effect
373 triggered by kE, rTE and MF, indicating that calcium signaling is mediated by the mobilization
374 of ER intracellular calcium. Since the ER is not the only potential origin of the calcium peaking
375 in the cells, we investigated whether an extracellular calcium influx could also have a role in
376 the observed calcium increases. The use of free-calcium medium (Figure 3D-F), which makes it
377 impossible to trigger a calcium influx in the cells, also resulted in complete extinction (rTE) or
378 strong reduction (kE and MF) of the peaks observed following cell stimulation by all three
379 tested proteins. In this condition, only 1 out of 30 cells responded to kE and MF, while in
380 normal medium 8 out of 10 cells responded to kE and 6 out of 10 cells responded to MF
381 (detailed results and statistics in online supplementary Tables 1-3). These results indicate that

382 rTE, kE and MF calcium signaling involves both intracellular calcium stores and extracellular
383 calcium.

384

385 **Membrane calcium channels activated by elastin and microfibrils**

386 Since extracellular calcium played an important role in the occurrence of the calcium peaks
387 observed after the addition of our products, we investigated which type of membrane calcium
388 channels were involved. Involvement of T-type Ca^{2+} channels, originally called low-voltage-
389 activated (LVA) channels due to their ability to be activated by small depolarizations of the
390 plasma membrane, are one of these channels (McAnulty 2007) was investigated by using the
391 T-type channels blocker NiCl_2 (Moore and Thibeault 2012). NiCl_2 diminished i) the calcium
392 peak amplitude (kE and MF) and ii) the number of cells responding by $\approx 50\%$ (Figure 3G-I)
393 (detailed results and statistics in online supplementary Tables 1-3), although the reduction
394 observed with rTE and kE is less than that observed with MF. Another important type of
395 calcium channels is the L-type high-voltage-gated calcium channels. When vascular L-type
396 calcium channels were blocked by nifedipine (Karler, Calder et al. 1991), the HUVEC calcium
397 response to the tested proteins was strongly decreased (Figure 3J-L and detailed results and
398 statistics in online supplementary Tables 1-3). This suggested a more important role of high
399 voltage calcium channels compared to that of the low voltage calcium channels.

400

401 **Reticulum endoplasmic receptors implicated in response to cell stimulation by** 402 **elastin and microfibrils**

403 Since IP_3 receptors (IP_3R) and ryanodine receptors (RyR) are the two endoplasmic reticulum
404 receptors present in HUVECs, we use 2-APB to block the IP_3R (Swee, Parks et al. 1995) (Figure
405 4A-C) and dantrolen to block RyR (Nistratova and Pivovarov 2004) (Figure 4D-F). We showed
406 that cell response to kE and MF was dramatically decreased by dantrolen and abolished by 2-
407 APB. The response to rTE was differently modified by 2-APB and dantrolen, i.e. by preventing
408 the appearance of calcium peak and triggering in some cells the presence of slow and long-
409 lasting raises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$, respectively. However, blocking each one of these 2 receptors induced
410 the extinction of the calcium signal in more than 75% of the cells, supporting the hypothesis
411 that a synergy between these 2 receptors in the intracellular calcium stores leads. Detailed
412 results and statistics are presented in online supplementary Tables 1-3.

413

414

415

416 **Intracellular pathways inducing calcium peaks in HUVEC with elastin and** 417 **microfibrils**

418 The involvement of IP₃ and the endoplasmic reticulum (ER) suggested that phospholipase C is
419 a likely contributor to the studied calcium signaling, since a major reaction product of PLC is
420 IP₃, a second messenger acting on the ER to release calcium in the cytoplasm. Phospholipase C
421 (PLC) was shown to play an important role in elastic fiber component signaling, since blockade
422 of PLC with U73122 (Yule and Williams 1992) led to a dramatic reduction of the responsive cell
423 number and amplitude of response to kE and MF, and extinction of the calcium response to
424 rTE (Figure 4G-I). Since cytoskeleton-connected integrins were also demonstrated to mediate
425 the HUVEC responses to the tested elastic fiber components, we verified whether an actin
426 microfilament-related mechanotransduction could also be involved in cell signaling. Cell
427 treatment with cytochalasin D, an actin microfilament depolymerizer (Schliwa 1982), resulted
428 in the quasi-extinction of the calcium response to kE and rTE, whereas only a small reduction
429 of the response to MF was observed (online Fig. 1A-C). This confirmed the presence of
430 different cell signaling pathways triggered after HUVEC stimulation by the two different elastic
431 fiber components, i.e. elastin and microfibrils. MEK1, involved in elastin signaling in other cell
432 types (Duca, Lambert et al. 2005) and Src, were also shown to be involved in the pathways
433 activated by elastin and MF since their respective inhibitors, PD98059 (online Fig. 2A-C)
434 (Kanat, Kayaci et al. 2011) and PP2 (online Fig. 2D-F) (Hanke, Gardner et al. 1996), both
435 reduced the amplitude of the calcium peaks induced by all the tested proteins.

436

437 **Effects of elastin and microfibrils in proliferation, adhesion and migration**

438 Since kE, rTE and MF increased HUVEC intracellular calcium levels, mobilized the actin
439 microfilaments and triggered Src and MEK1 pathways in HUVECs, the potential functional
440 effects of these stimuli were then studied. In vascular walls, one of these functions is
441 angiogenesis (Kohn, Alessandro et al. 1995). So, we first investigated the role of the studied
442 proteins on major cell functions, i.e. proliferation, adhesion and migration.

443 After a 16hour treatment with different doses of kE and rTE (Fig. 5A,B), there was a general
444 tendency to increase proliferation rate, with a significant increase at 0.1µg/mL of kE and 1
445 µg/mL of rTE. After 48hours of treatment, kE and rTE increased significantly the cell
446 proliferation, at all three doses tested, and the proliferation rate was elevated by +50% and
447 +60%. 16hours and 48hours of MF treatment (Fig. 5C) generated an increase in the
448 proliferation rate with the three doses tested. However, the effect was of low and limit to
449 significance at the doses of 0.15 and 0.5 µg/mL, and became substantial -although lower than
450 that induced by elastin- only at the dose of 1.5µg/mL MF. PF14, a fragment of fibrillin-1
451 containing the RGD sequence elevating intracellular calcium in HUVEC, induced a significant
452 increase in proliferation rate after 16 hours only at low dose, while 48 hour PF14 treatment

453 induced maximum proliferation at all the tested doses similar to that obtained with the
454 control, namely 20% FBS (Fig. 5D).

455 Significant increases in HUVECs adhesion were observed after fibronectin (+1.07-1.14), kE
456 (+1.16-1.38) and rTE (+1.19-1.26) stimulation, compared to the control situation (value: 1), i.e.
457 the absence of these molecules (Figure 5E). kE and rTE were respectively 2-and 3-fold
458 significantly more effective than fibronectin at the highest dose. On the other hand, the
459 increase in adhesion promoted with MF was less effective (+1.19-1.30), compared to that
460 observed with fibronectin at the same dose (+1.14-1.17) (Figure 5F).

461 The ability of elastic fiber components to promote HUVEC migration was then investigated by
462 the means of 2 different assays. First, the trans-well migration assay revealed a dose-
463 dependent effect of elastin products. A general increase in migration triggered by kE was
464 identified (2-way ANOVA), including a particularly important elevation induced by 1µg/mL kE
465 after 48 hours (Fig. 6A). rTE triggered a general significant increase in migration after 24 and
466 48 hours of treatment at the doses 0.1 and 1 µg/mL, (Fig. 6B), up to values close to these
467 observed with 20% FBS, the reference stimulator for HUVEC migration. Regarding the effects
468 of MF components, only PF14 at 1µg/mL incubated for 24 hours, as previously shown (Mariko,
469 Ghandour et al. 2010), and the highest dose of MF (1.5µg/mL) incubated for 48hours induced
470 significant increase in migration (Figure 6D). Surprisingly, the wound healing assay led to
471 ambiguous or inconsistent results. While a slight trend towards elevation of wound closure
472 was also triggered by kE and rTE after 20-25 hours, 0.5µg/mL MF induced a significant
473 decrease in the wound closure (30%), i.e. a lower HUVEC migration, compared to the control
474 (37%) (Fig. 6E).

475

476 **Extracellular matrix levels after cell stimulation by elastin and microfibril** 477 **components**

478 Another important function of vascular cells is their contribution to vascular elasticity and
479 remodelling, through their ability to secrete and degrade extracellular matrix, especially
480 elastic fibers (generating wall elasticity) and collagen (generating wall rigidity) (Davis and
481 Senger 2005). We first investigated the contribution of our products on collagen and elastic
482 fibers synthesis by HUVECs. kE induced a significant increase in collagen level at 0.01µg/mL
483 (+22%) and 0.1µg/mL (+55%), while the highest dose (1µg/mL) did not produce a significant
484 increase in comparison to the control (Fig. 7A). The treatment with rTE induced a dose-
485 dependent increase in collagen level, with significant elevations at the doses 0.1µg/mL (+22%)
486 and 1µg/mL(+50%) (Fig. 7B). On the other hand, MF fragments enhanced collagen synthesis,
487 with values close to these observed with elastin fragments: collagen synthesis: +40% with
488 0.15µg/mL MF and +62% with 1.5µg/mL MF treatments (Fig. 7C). No major difference could
489 be observed when MF without collagen VI were used, whereas collagen VI did not present any
490 significant effect on collagen synthesis (online Fig. 3A), suggesting that the increase observed

491 was essentially due to microfibril components. Also, PF14 significantly and dose-dependently
492 increased collagen synthesis between +60% at the lowest concentration to +80% at 10 μ g/mL
493 (Fig. 7D).

494 Elastin fragments (rTE et kE) and MF clearly increased elastin synthesis at the three doses
495 used, in the range of +45 to +78% (Figure 7E-G). Regarding the effect of PF14 on elastin
496 synthesis, an increase was observed with the lowest (+68%) and the highest dose (+53%),
497 whereas no significant effect was observed at the intermediate concentration of 1 μ g/mL PF14
498 (Fig. 7H). rTE et kE also moderately increased fibrillin synthesis, in the range of 16-31%, with
499 significant elevations at kE doses 0.1 and 1 μ g/mL and rTE doses 0.01 and 1 μ g/mL (Fig. 7 I,J).
500 Regarding MF, a dose-dependent increase in fibrillin-1 synthesis was observed in the range of
501 27-39% (Fig. 7K), whereas only the highest concentration of PF14 (10 μ g/mL) produced a
502 significant increase (28%) in fibrillin-1 synthesis (Fig. 7L).

503 Finally, collagen VI significantly increased the synthesis of elastin and fibrillin in HUVECs,
504 suggesting a possible contribution of collagen VI in the elastin and fibrillin-1 synthesis
505 elevations triggered by classical MF (Fig. 7G,K and online Fig. 3B,C).

506

507 **Extracellular matrix degradation mechanisms induced by elastin and** 508 **microfibrils**

509 Gelatin zymography revealed that all the tested proteins increased pro-MMP2 production by
510 \approx 50% (30 min treatment) and \approx 40%, the only exception being the absence of effect of MF
511 after 16 hours (Fig. 8A). On the other hand, 30 min after treatment, the level of MMP-2
512 inhibitor TIMP-2 was significantly decreased by MF although a non significant decrease was
513 observed with kE, rTE and PF14. The elastic fiber component effects were the opposite after a
514 longer term treatment (16h), with significant increases (\approx 50%) in TIMP-2 levels induced by all
515 the tested proteins (Fig. 8B).

516 Collagen zymography revealed the presence of 2 bands of 57 and 52 kDa, representing the
517 pro-collagenase (pro-MMP1) and the collagenase (MMP1) detections, respectively. The
518 effects of the tested proteins on pro-collagenase levels and activation were different with
519 time (Fig. 8C,D). Two hours after treatment, a strong increase in pro-collagenase production
520 (around +100% for kE, rTE and MF and +230% for PF14) accompanied by a significant increase
521 in collagenase levels with kE, rTE and PF14 (between +60 to +100%) were observed. This
522 increased collagenolytic activity was conserved in long term treatment (30h) with rTE and
523 PF14 stimulations only, while KE and MF had no long term effect. At 30h, pro-collagenase
524 detection was significantly decreased by all the tested proteins (Fig. 8C,D).

525

526

527 **Discussion**

528 Elastic fibers provide blood vessels with elastic recoil and maintain their structural integrity by
529 counterbalancing mechanical strain (Maina, Jimoh et al. 2010). However, elastic fibers do not
530 only have mechanical functions, they can also interact with their extracellular matrix and
531 cellular environments, and act as major signals in the biology of the vascular wall (Raines
532 2000). The results obtained here suggest that the two major components of elastic fibers, i.e.
533 elastin and microfibrils (MF), activate cell membrane receptors and enhance intracellular
534 signalling as well as adhesion, migration and proliferation of endothelial cells (HUVECs). These
535 results are consistent with earlier findings in vascular smooth muscle and endothelial cells
536 suggesting a major involvement of elastic fibers in these mechanisms (Sakamoto,
537 Broekelmann et al. 1996, Faury, Usson et al. 1998, Mariko, Ghandour et al. 2010, Majesky,
538 Dong et al. 2011, Patel, Vandromme et al. 2012), despite the fact that some proteins
539 associated with microfibrils were shown to reduce proliferation and/or migration of
540 endothelial cells, such as fibulin-5 (Albig and Schiemann 2004).

541 Interaction between elastic fibers and cells was previously demonstrated as mediated by
542 multiple intracellular pathways. In endothelial cells, PI3K/Akt/NOS and NO/GMPc/Erk1/2
543 pathways were shown to be induced by elastin peptides (Fahem, Robinet et al. 2008). Here, it
544 has been shown that all the tested proteins induced substantial elevations of HUVEC
545 intracellular free calcium levels. Although integrins partly contributed to the HUVEC response
546 to MF, the ERC was unexpectedly found to be a major receptor involved in MF signalling,
547 which could explain that, regarding some cellular functions tested, MF acted more like elastin
548 products than like the fibrillin-1 fragment PF14. PF14 was demonstrated to generate an
549 elevation of HUVEC calcium level through the mobilization of integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$, PLC
550 activation, IP₃ production and intracellular calcium store release in the cytoplasm, and no
551 extracellular calcium influx (Mariko, Ghandour et al. 2010). However, intracellular calcium
552 response to entire MF was slightly different, and was closer to that observed with elastin
553 products. In addition to intracellular calcium stores, extracellular calcium was also involved in
554 MF-induced intracellular calcium elevation, through the involvement of R- and L-type calcium
555 channels. Similar major involvement of membrane calcium channels has previously been
556 shown for elastin peptide signaling in HUVECs (Faury, Usson et al. 1998). In addition to PLC,
557 the major contributor, Src and Erk1/2 were also found to be implicated in MF-induced calcium
558 signalling. Moreover, as already shown with PF14, actin cytoskeleton was not clearly involved
559 in the cell calcium response to MF. On the opposite, the presence of actin cytoskeleton was
560 essential to generate HUVEC intracellular calcium elevation -originating from both
561 intracellular stores and extracellular calcium- stimulated by both elastin products kE and rTE.
562 In our experiments, ERC was not the only receptor involved in the response to kE and rTE: the
563 integrin $\alpha_v\beta_3$ was also involved and accelerated the cell response. Although many studies have
564 demonstrated the importance of one or the other receptor in elastin-cell interaction (Albig
565 and Schiemann 2004, Majesky, Dong et al. 2011, Patel, Menon et al. 2011, Patel, Vandromme
566 et al. 2012), our results suggest for the first time a synergetic activity of these two receptors in

567 elastin signalling in endothelial cells. This correlates with recent findings in smooth muscle
568 cells which showed an important synergetic activity between these two receptors, enhancing
569 adhesion and elastin deposition (Patel, Menon et al. 2011). Elastin-mediated calcium signaling
570 in HUVEC also involved PLC, IP₃, Src and Erk1/2 pathways and, regarding rTE, the ryanodine
571 receptor (RyR). To explain the double involvement of the ERC and integrins in elastin signaling
572 and the virtual abolition of the calcium elevation when one or the other receptor is blocked,
573 two possible mechanisms could be postulated. First, a concomitant interaction of rTE with its
574 two receptors ERC and integrin $\alpha_v\beta_3$, and subsequent simultaneous/synergetic activation of
575 both downstream signalling pathways, could be necessary to trigger the generation of the
576 intracellular calcium response. An alternative hypothesis would be that rTE only binds to the
577 ERC whereas the integrin could then be activated by the activated ELR or by a second
578 messenger produced by ERC activation, such as IP₃ kinase (Horowitz, Menice et al. 1996,
579 Matchkov, Kudryavtseva et al. 2012). The fact that rTE Δ RKRK -a synthetic human elastin
580 truncated for the RKRK site which is responsible for the interaction with the integrin $\alpha_v\beta_3$ - also
581 triggers [Ca²⁺]_i elevation in HUVECs suggests that direct interaction of elastin with the integrin
582 $\alpha_v\beta_3$ is not necessary to trigger calcium signaling in HUVECs. This is supported by the finding
583 that both lactose -blocker of the ERC- and antibody LM609 -blocker of the integrin $\alpha_v\beta_3$ -
584 virtually abolished the cell calcium response to rTE Δ RKRK. It is then likely that calcium
585 mobilization in HUVEC is mainly due to the fact that integrin $\alpha_v\beta_3$ is mobilized by the elastin-
586 activated ERC, although the lower [Ca²⁺]_i elevations generated by rTE Δ RKRK also suggest a
587 contribution of the direct elastin-integrin $\alpha_v\beta_3$ interaction.

588 Regarding the effects of elastic fiber components on cell functions, we have shown that kE,
589 rTE and MF enhanced HUVEC adhesion, which is in accordance with previous studies on
590 fibrillin-1 and elastin effect on cell adhesion (Pfaff, Reinhardt et al. 1996, Sakamoto,
591 Broekelmann et al. 1996, Fulop, Douziech et al. 2001, Bax, Bernard et al. 2003, Mariko,
592 Ghandour et al. 2010). MF, PF14, kE and rTE also enhanced HUVEC proliferation, which is
593 consistent with previous studies showing that proliferation is stimulated by fibrillin-1 in
594 different cell types (Porst, Plank et al. 2006, Mariko, Ghandour et al. 2010) and by elastin in smooth
595 muscle cells (Mochizuki, Brassart et al. 2002, Arribas, Hinek et al. 2006). However, other studies
596 have also indicated that elastin peptides could also decrease the proliferation rate of smooth
597 muscle cells (Ito, Ishimaru et al. 1997, Spofford and Chilian 2001, Karnik, Wythe et al. 2003) or have no
598 effect on the proliferation of tumor cells (Lindop, Boyle et al. 1995). The effect of elastin on cell
599 proliferation could depend on cell type and vary between cells of the same type, such as
600 smooth muscle cells, depending on the phenotype acquired by these cells (Yamamoto,
601 Akazawa et al. 2002).

602 While earlier works have demonstrated an inhibition of smooth muscle cell migration by
603 elastin products (Ooyama, Fukuda et al. 1987), the present experiments have shown that elastin
604 enhanced HUVEC migration, supporting previous results obtained in endothelial and epithelial
605 cells and monocytes (Lindop, Boyle et al. 1995, Robinet, Fahem et al. 2005). By contrast, the
606 other main component of elastic fibers, MF, or its constituent fibrillin-1, exhibits variable

607 effects on endothelial cell migration. PF14, a fragment of fibrillin-1 containing the RGD
608 sequence, was previously proved to enhance migration of suspended and adhering HUVECs
609 (Mariko, Ghandour et al. 2010) while another fibrillin-1 fragment containing an elastin-binding
610 protein (EBP) recognition sequence also enhanced chemotaxis of macrophages (Booms, Ney
611 et al. 2006). Here, MF -probably containing different fragments of fibrillin-1, other associated
612 proteins and possibly collagen VI- enhanced migration of suspended HUVECs and inhibited it
613 in adhering cells. The inhibition of migration in adhering cells can be caused by other
614 components present in MF. More generally, differences in cell environments, cell cycle or cell
615 phenotype in particular conditions may explain why microfibrils or elastin have sometimes
616 opposite effects.

617 The interaction between elastic fiber components and vascular cells can also affect the
618 composition of the extracellular matrix and, in particular, elastic fiber through their actions on
619 ECM component or proteinase syntheses by cells. Here, both elastin and microfibrillar
620 products induced a limited elevation of collagen and fibrillin-1 expressions and an important
621 elevation of elastin expression by HUVECs. This is different from the mechanisms present in
622 smooth muscle cells, in which elastin expression is inhibited and collagen expression is
623 unchanged by elastin peptides (Arribas, Hinek et al. 2006). The increase in collagen synthesis
624 produced by elastin and fibrillin-1 fragment treatment is likely to increase the vessel wall
625 stiffness. On the other hand, the increases in elastin and fibrillin-1 synthesis triggered by the
626 treatment with kE, rTE, MF and PF14 probably provide the vessel walls with elasticity. Because
627 the enhancement of elastin synthesis is more important than that of collagen synthesis,
628 equilibrium of the tested protein effect appears to be enhancing wall elasticity rather than
629 rigidity. However, the impact of these phenomena on the vascular mechanics could be
630 moderate since endothelial cells only contribute to the constitution of the inner part of the
631 walls. In parallel, the effect of the elastic fiber components on extracellular matrix
632 degradation was also evaluated by assessing proteinase status in the extracellular medium.
633 Our results show that HUVEC stimulation by kE, rTE, MF and PF14 induces an elevation of pro-
634 MMP2 levels, consistent with previous observations indicating that elastin peptides enhance
635 pro-MMP2 expression in endothelial cells (Robinet, Fahem et al. 2005). However, our findings
636 differ from those described in fibroblasts, in which fibrillin-1 fragments did not modify MMP2
637 expression (Booms, Pregla et al. 2005). Our experiments also showed that elastic fiber
638 components have inverse biphasic effects on the levels of MMP-2 inhibitor TIMP-2 and
639 procollagenase: TIMP-2 decreased and pro-collagenase increased shortly after cell stimulation
640 whereas, at later time-points, TIMP-2 raised and pro-collagenase levels dropped. However,
641 collagenase activity was generally increased by cell stimulation by rTE at both early and late
642 time-points, while MF stimulation was inactive and kE stimulation was active only at early
643 time-points. These results are consistent with previous observations showing that fibrillin-1
644 up-regulates MMP1 expression in fibroblasts (Booms, Pregla et al. 2005, Booms, Ney et al.
645 2006, Fahem, Robinet et al. 2008). Also, at later time points, the substantial decrease
646 observed in pro-collagenase levels, suggest that the long-lasting increase in collagenase
647 activity after rTE treatment could be due to the stabilisation over time of highly-activated pro-

648 collagenase produced at early time-points, as previously shown in fibroblasts stimulated by
649 RGD-containing fibrillin-1 fragments (Booms, Pregla et al. 2005) and macrophages treated
650 with fibrillin-1-containing the elastin binding protein GxxPG consensus sequence (Booms, Ney
651 et al. 2006).

652 Because i) elastic fibers are mainly interacting with smooth muscle cells in vascular walls and
653 ii) several studies in smooth muscle cells showed results similar to these obtained here
654 (Ooyama, Fukuda et al. 1987, Pugsley and Tabrizchi 2000), it is likely that the few opposite actions of
655 elastin and MF components on cell signalling could have consequences in the physiology of the vessel
656 walls. They can explain, at least in a part, why in Marfan syndrome fibrillin-1 mutation results
657 in endothelial dysfunction (Chung, Au Yeung et al. 2007). However, many major intracellular
658 signaling pathways were similarly triggered by all the elastic fiber components tested,
659 suggesting that the opposed cardiovascular features of Marfan syndrome and Williams
660 syndrome are not only due to differences between the direct signaling of elastin and
661 microfibrils on cells. The opposed features of these pathologies could also indirectly result
662 from a difference in the "free soluble elastic fiber component / mature insoluble elastic fiber
663 structure" ratio: in the case of partial fibrillin-1 lack, elastin could not be properly deposited
664 on the abnormal MF scaffold while, in case of decreased elastin content, fibrillin-1 could still
665 be excreted and deposited into microfibrillars structure.

666

667 **Références**

- 668 Albig, A. R. and W. P. Schiemann (2004). "Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor
669 (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells." DNA Cell Biol **23**(6): 367-379.
- 670 Arribas, S. M., A. Hinek and M. C. Gonzalez (2006). "Elastic fibres and vascular structure in
671 hypertension." Pharmacol Ther **111**(3): 771-791.
- 672 Baile, E. M. (1996). "The anatomy and physiology of the bronchial circulation." J Aerosol Med **9**(1): 1-6.
- 673 Bax, D. V., S. E. Bernard, A. Lomas, A. Morgan, J. Humphries, C. A. Shuttleworth, M. J. Humphries and C.
674 M. Kielty (2003). "Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1
675 and alpha v beta 3 integrins." J Biol Chem **278**(36): 34605-34616.
- 676 Bax, D. V., Y. Mahalingam, S. Cain, K. Mellody, L. Freeman, K. Younger, C. A. Shuttleworth, M. J.
677 Humphries, J. R. Couchman and C. M. Kielty (2007). "Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an
678 Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion
679 formation." J Cell Sci **120**(Pt 8): 1383-1392.
- 680 Bax, D. V., U. R. Rodgers, M. M. Bilek and A. S. Weiss (2009). "Cell adhesion to tropoelastin is mediated
681 via the C-terminal GRKRK motif and integrin alphaVbeta3." J Biol Chem **284**(42): 28616-28623.
- 682 Beuren, A. J., J. Apitz and D. Harmjanz (1962). "Supravalvular aortic stenosis in association with mental
683 retardation and a certain facial appearance." Circulation **26**: 1235-1240.
- 684 Bochaton-Piallat, M. L. and G. Gabbiani (2005). "Modulation of smooth muscle cell proliferation and
685 migration: role of smooth muscle cell heterogeneity." Handb Exp Pharmacol(170): 645-663.
- 686 Booms, P., A. Ney, F. Barthel, G. Moroy, D. Counsell, C. Gille, G. Guo, R. Pregla, S. Mundlos, A. J. Alix
687 and P. N. Robinson (2006). "A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG
688 consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational
689 analysis." J Mol Cell Cardiol **40**(2): 234-246.
- 690 Booms, P., R. Pregla, A. Ney, F. Barthel, D. P. Reinhardt, A. Pletschacher, S. Mundlos and P. N. Robinson
691 (2005). "RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell
692 culture: a potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome." Hum Genet **116**(1-2): 51-61.
- 693 Broder, K., E. Reinhardt, J. Ahern, R. Lifton, W. Tamborlane and B. Pober (1999). "Elevated ambulatory
694 blood pressure in 20 subjects with Williams syndrome." Am J Med Genet **83**(5): 356-360.
- 695 Chang, H. Y., J. T. Chi, S. Dudoit, C. Bondre, M. van de Rijn, D. Botstein and P. O. Brown (2002).
696 "Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts." Proc Natl Acad
697 Sci U S A **99**(20): 12877-12882.
- 698 Chung, A. W., K. Au Yeung, S. F. Cortes, G. G. Sandor, D. P. Judge, H. C. Dietz and C. van Breemen
699 (2007). "Endothelial dysfunction and compromised eNOS/Akt signaling in the thoracic aorta during the
700 progression of Marfan syndrome." Br J Pharmacol **150**(8): 1075-1083.
- 701 Davis, G. E. and D. R. Senger (2005). "Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and
702 functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization." Circ Res **97**(11): 1093-1107.
- 703 de Graaf, J. C., J. D. Banga, S. Moncada, R. M. Palmer, P. G. de Groot and J. J. Sixma (1992). "Nitric
704 oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions." Circulation **85**(6): 2284-
705 2290.
- 706 Dejana, E., F. Orsenigo, C. Molendini, P. Baluk and D. M. McDonald (2009). "Organization and signaling
707 of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees." Cell
708 Tissue Res **335**(1): 17-25.
- 709 Duca, L., E. Lambert, R. Debret, B. Rothhut, C. Blanchevoye, F. Delacoux, W. Hornebeck, L. Martiny and
710 L. Debelle (2005). "Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 via a Ras-
711 independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in
712 human skin fibroblasts." Mol Pharmacol **67**(4): 1315-1324.
- 713 Enzerink, A. and A. Vaheri (2011). "Fibroblast activation in vascular inflammation." J Thromb Haemost
714 **9**(4): 619-626.

715 Fahem, A., A. Robinet, J. H. Cauchard, L. Duca, M. Soula-Rothhut, B. Rothhut, C. Soria, M. Guenounou,
716 W. Hornebeck and G. Bellon (2008). "Elastokine-mediated up-regulation of MT1-MMP is triggered by
717 nitric oxide in endothelial cells." Int J Biochem Cell Biol **40**(8): 1581-1596.

718 Farhi, L. E. and D. W. Sheehan (1990). "Pulmonary circulation and systemic circulation: similar
719 problems, different solutions." Adv Exp Med Biol **277**: 579-586.

720 Faury, G., A. Chabaud, M. T. Ristori, L. Robert and J. Verdeti (1997). "Effect of age on the vasodilatory
721 action of elastin peptides." Mech Ageing Dev **95**(1-2): 31-42.

722 Faury, G., Y. Usson, M. Robert-Nicoud, L. Robert and J. Verdeti (1998). "Nuclear and cytoplasmic free
723 calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A
724 **95**(6): 2967-2972.

725 Fox, S. I. (1994). "Human Physiology." Wm. C. Brown Publishers,, Dubuque, Iowa **4**.

726 Frederic H. Martini , J. L. N., Edwin F. Bartholomew (2004). "Fundamentals of Anatomy and
727 Physiology."

728 Fulop, T., Jr., N. Douziech, M. P. Jacob, M. Hauck, J. Wallach and L. Robert (2001). "Age-related
729 alterations in the signal transduction pathways of the elastin-laminin receptor." Pathol Biol (Paris)
730 **49**(4): 339-348.

731 Garland, C. J., C. R. Hiley and K. A. Dora (2011). "EDHF: spreading the influence of the endothelium." Br
732 J Pharmacol **164**(3): 839-852.

733 Giordano, U., A. Turchetta, A. Giannotti, M. C. Digilio, F. Virgili and A. Calzolari (2001). "Exercise testing
734 and 24-hour ambulatory blood pressure monitoring in children with Williams syndrome." Pediatr
735 Cardiol **22**(6): 509-511.

736 Guo, G., P. Booms, M. Halushka, H. C. Dietz, A. Ney, S. Stricker, J. Hecht, S. Mundlos and P. N. Robinson
737 (2006). "Induction of macrophage chemotaxis by aortic extracts of the mgR Marfan mouse model and
738 a GxxPG-containing fibrillin-1 fragment." Circulation **114**(17): 1855-1862.

739 Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok and P.
740 A. Connelly (1996). "Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor.
741 Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation." J Biol Chem **271**(2): 695-701.

742 Hinek, A., D. S. Wrenn, R. P. Mecham and S. H. Barondes (1988). "The elastin receptor: a galactoside-
743 binding protein." Science **239**(4847): 1539-1541.

744 Horowitz, A., C. B. Menice, R. Laporte and K. G. Morgan (1996). "Mechanisms of smooth muscle
745 contraction." Physiol Rev **76**(4): 967-1003.

746 Huber, P. (2009). "[Endothelial cell-cell junctions in vessel formation]." J Soc Biol **203**(2): 119-123.

747 Ito, S., S. Ishimaru and S. E. Wilson (1997). "Inhibitory effect of type 1 collagen gel containing alpha-
748 elastin on proliferation and migration of vascular smooth muscle and endothelial cells." Cardiovasc
749 Surg **5**(2): 176-183.

750 Judge, D. P. and H. C. Dietz (2005). "Marfan's syndrome." Lancet **366**(9501): 1965-1976.

751 Kanat, A., S. Kayaci, U. Yazar, Y. Sahin, O. Yaman and A. R. Guvercin (2011). "One of the giants of
752 neurological surgery left us more than a decade ago, and neurosurgical literature did not show much
753 interest." Neurol Neurochir Pol **45**(1): 63-67.

754 Karler, R., L. D. Calder and S. A. Turkanis (1991). "Calcium channel blockers and excitatory amino
755 acids." Brain Res **551**(1-2): 331-333.

756 Karnik, S. K., B. S. Brooke, A. Bayes-Genis, L. Sorensen, J. D. Wythe, R. S. Schwartz, M. T. Keating and D.
757 Y. Li (2003). "A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease." Development
758 **130**(2): 411-423.

759 Karnik, S. K., J. D. Wythe, L. Sorensen, B. S. Brooke, L. D. Urness and D. Y. Li (2003). "Elastin induces
760 myofibrillogenesis via a specific domain, VGVAPG." Matrix Biol **22**(5): 409-425.

761 Kielty, C. M., M. J. Sherratt and C. A. Shuttleworth (2002). "Elastic fibres." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2817-
762 2828.

763 Kielty, C. M., S. Stephan, M. J. Sherratt, M. Williamson and C. A. Shuttleworth (2007). "Applying elastic
764 fibre biology in vascular tissue engineering." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **362**(1484): 1293-1312.

765 Kohn, E. C., R. Alessandro, J. Spoonster, R. P. Wersto and L. A. Liotta (1995). "Angiogenesis: role of
766 calcium-mediated signal transduction." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(5): 1307-1311.

767 Lindop, G. B., J. J. Boyle, P. McEwan and C. J. Kenyon (1995). "Vascular structure, smooth muscle cell
768 phenotype and growth in hypertension." J Hum Hypertens **9**(6): 475-478.

769 Lopes, K. R., A. L. Delezoide, C. Baumann, E. Vuillard, D. Luton, Y. Chitrit and A. Azancot (2006).
770 "Prenatal Marfan syndrome: report of one case and review of the literature." Prenat Diagn **26**(8): 696-
771 699.

772 Maina, J. N., S. A. Jimoh and M. Hosie (2010). "Implicit mechanistic role of the collagen, smooth
773 muscle, and elastic tissue components in strengthening the air and blood capillaries of the avian lung."
774 J Anat **217**(5): 597-608.

775 Majesky, M. W., X. R. Dong, V. Hognlund, W. M. Mahoney, Jr. and G. Daum (2011). "The adventitia: a
776 dynamic interface containing resident progenitor cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(7): 1530-
777 1539.

778 Mariko, B., Z. Ghandour, S. Raveaud, M. Quentin, Y. Usson, J. Verdeti, P. Huber, C. Kielty and G. Faury
779 (2010). "Microfibrils and fibrillin-1 induce integrin-mediated signaling, proliferation and migration in
780 human endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **299**(5): C977-987.

781 Matchkov, V. V., O. Kudryavtseva and C. Aalkjaer (2012). "Intracellular Ca(2)(+) signalling and
782 phenotype of vascular smooth muscle cells." Basic Clin Pharmacol Toxicol **110**(1): 42-48.

783 McAnulty, R. J. (2007). "Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease." Int J
784 Biochem Cell Biol **39**(4): 666-671.

785 Mecham, R. P. (1991). "Elastin synthesis and fiber assembly." Ann N Y Acad Sci **624**: 137-146.

786 Mellander, S. (1970). "Systemic circulation: local control." Annu Rev Physiol **32**: 313-344.

787 Mochizuki, S., B. Brassart and A. Hinek (2002). "Signaling pathways transduced through the elastin
788 receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells." J Biol Chem **277**(47): 44854-44863.

789 Moore, J. and S. Thibeault (2012). "Insights into the role of elastin in vocal fold health and disease." J
790 Voice **26**(3): 269-275.

791 Mulligan-Kehoe, M. J. (2010). "The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries." Am J Physiol
792 Heart Circ Physiol **298**(2): H295-305.

793 Nistratova, V. L. and A. S. Pivovarov (2004). "[Inositoltriphosphate receptors and ryanodine receptors
794 in regulation of cholin sensitivity of Helix lucorum neurones by Na,K-pump during habituation]." Zh
795 Vyshsh Nerv Deiat Im I P Pavlova **54**(4): 554-564.

796 Ooyama, T., K. Fukuda, H. Oda, H. Nakamura and Y. Hikita (1987). "Substratum-bound elastin peptide
797 inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro." Arteriosclerosis **7**(6): 593-598.

798 Opitz, J. M. and A. Utkus (2001). "Comments on biological asymmetry." Am J Med Genet **101**(4): 359-
799 369.

800 Patel, D., R. Menon and L. J. Taite (2011). "Self-assembly of elastin-based peptides into the ECM: the
801 importance of integrins and the elastin binding protein in elastic fiber assembly." Biomacromolecules
802 **12**(2): 432-440.

803 Patel, D., S. E. Vandromme, M. E. Reid and L. J. Taite (2012). "Synergistic activity of alphavbeta3
804 integrins and the elastin binding protein enhance cell-matrix interactions on bioactive hydrogel
805 surfaces." Biomacromolecules **13**(5): 1420-1428.

806 Pfaff, M., D. P. Reinhardt, L. Y. Sakai and R. Timpl (1996). "Cell adhesion and integrin binding to
807 recombinant human fibrillin-1." FEBS Lett **384**(3): 247-250.

808 Plante, G. E. (2002). "Vascular response to stress in health and disease." Metabolism **51**(6 Suppl 1): 25-
809 30.

810 Porst, M., C. Plank, B. Bieritz, E. Konik, H. Fees, J. Dotsch, K. F. Hilgers, D. P. Reinhardt and A. Hartner
811 (2006). "Fibrillin-1 regulates mesangial cell attachment, spreading, migration and proliferation." Kidney
812 Int **69**(3): 450-456.

813 Pugsley, M. K. and R. Tabrizchi (2000). "The vascular system. An overview of structure and function." J
814 Pharmacol Toxicol Methods **44**(2): 333-340.

815 Raines, E. W. (2000). "The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and
816 survival: relationships to vascular disease." Int J Exp Pathol **81**(3): 173-182.

817 Ramaswamy, P., I. D. Lytrivi, K. Nguyen and B. D. Gelb (2006). "Neonatal Marfan syndrome : in utero
818 presentation with aortic and pulmonary artery dilatation and successful repair of an acute flail mitral
819 valve leaflet in infancy." Pediatr Cardiol **27**(6): 763-765.

820 Robinet, A., A. Fahem, J. H. Cauchard, E. Huet, L. Vincent, S. Lorimier, F. Antonicelli, C. Soria, M. Crepin,
821 W. Hornebeck and G. Bellon (2005). "Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting
822 endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP." J Cell Sci **118**(Pt 2):
823 343-356.

824 Rodgers, U. R. and A. S. Weiss (2004). "Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-
825 terminus of human tropoelastin." Biochimie **86**(3): 173-178.

826 Sadler, J. E. (1997). "Thrombomodulin structure and function." Thromb Haemost **78**(1): 392-395.

827 Sakamoto, H., T. Broekelmann, D. A. Cheresch, F. Ramirez, J. Rosenbloom and R. P. Mecham (1996).
828 "Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1." J
829 Biol Chem **271**(9): 4916-4922.

830 Schliwa, M. (1982). "Action of cytochalasin D on cytoskeletal networks." J Cell Biol **92**(1): 79-91.

831 Shadwick, R. E. (1999). "Mechanical design in arteries." J Exp Biol **202**(Pt 23): 3305-3313.

832 Spofford, C. M. and W. M. Chilian (2001). "The elastin-laminin receptor functions as a
833 mechanotransducer in vascular smooth muscle." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(3): H1354-1360.

834 Swee, M. H., W. C. Parks and R. A. Pierce (1995). "Developmental regulation of elastin production.
835 Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels." J
836 Biol Chem **270**(25): 14899-14906.

837 Urban, Z., S. Riaz, T. L. Seidl, J. Katahira, L. B. Smoot, D. Chitayat, C. D. Boyd and A. Hinek (2002).
838 "Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with
839 supravalvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome." Am J Hum Genet **71**(1): 30-44.

840 Vallet, B. and E. Wiel (2001). "Endothelial cell dysfunction and coagulation." Crit Care Med **29**(7 Suppl):
841 S36-41.

842 Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2007). "New insights into elastic fiber assembly." Birth Defects Res
843 C Embryo Today **81**(4): 229-240.

844 Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2009). "Vascular extracellular matrix and arterial mechanics."
845 Physiol Rev **89**(3): 957-989.

846 Wang, M. C., Y. Lu and C. Baldock (2009). "Fibrillin microfibrils: a key role for the interbead region in
847 elasticity." J Mol Biol **388**(1): 168-179.

848 Wilkesman, J. and L. Kurz (2009). "Protease analysis by zymography: a review on techniques and
849 patents." Recent Pat Biotechnol **3**(3): 175-184.

850 Williams, J. C., B. G. Barratt-Boyes and J. B. Lowe (1961). "Supravalvular aortic stenosis." Circulation **24**:
851 1311-1318.

852 Xavier-Neto, J., R. A. Castro, A. C. Sampaio, A. P. Azambuja, H. A. Castillo, R. M. Cravo and M. S. Simoes-
853 Costa (2007). "Parallel avenues in the evolution of hearts and pumping organs." Cell Mol Life Sci **64**(6):
854 719-734.

855 Yamamoto, M., K. Akazawa, M. Aoyagi, N. Yamamoto and K. Yamamoto (2002). "Changes in elastin-
856 binding protein in fibroblasts derived from cardinal ligaments of patients with prolapsus uteri." Cell
857 Biol Int **26**(5): 441-449.

858 Yanagisawa, H., E. C. Davis, B. C. Starcher, T. Ouchi, M. Yanagisawa, J. A. Richardson and E. N. Olson
859 (2002). "Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo." Nature
860 **415**(6868): 168-171.

861 Yule, D. I. and J. A. Williams (1992). "U73122 inhibits Ca²⁺ oscillations in response to cholecystokinin
862 and carbachol but not to JMV-180 in rat pancreatic acinar cells." J Biol Chem **267**(20): 13830-13835.

863

864

865 **Figure legends:**

866 **Figure 1: Effect of elastic fiber components on cytoplasmic calcium concentration of**
867 **human umbilical venous endothelial cells (HUVECs).** Dose-effect of kE (A-C), rTE (D-F), MF
868 (G-I) in comparison to the effect of control (J). K,L: 0.5µg/mL microfibrils without colVI
869 solution induced also high calcium response (K) and 0.15µg/mL colVI (L) also moderately
870 participated in the calcium increasing level. B, bradykinin (1 µM). Representative
871 experiments are presented. In each case, n=50-60 cells from at least 5 different cell cultures.

872

873 **Figure 2: Elastic fiber receptors involved in the calcium response to kE, rTE and MF.** HUVEC
874 responses to kE (1µg/mL), rTE (1µg/mL), MF (0.5µg/mL) and rTE ΔRKRK (truncated rTE
875 without sequence RKRK, which interferes with the binding to integrin αvβ3, 1µg/mL) 5min
876 after cell treatment with 10⁻⁴M lactose (ERC inhibitor) (A, B, C, D) and 30min after cell
877 treatment with 10µg/mL LM609 (blocking antibody to αvβ3) (E, F, G, H). I: cell response to
878 0.5µg/mL MF after 30 min treatment with 10µg/mL JBS5 (blocking antibody to α5β1) (G). J:
879 cell response to 1µg/mL rTE ΔRKRK (control). Control responses to kE, rTE and MF are
880 presented in Fig. 1. B, bradykinin (1 µM). Representative experiments are presented. In each
881 case, n=30-50 cells from at least 3 different cell cultures.

882

883 **Figure 3: Calcium origin and role of membrane calcium channels in kE-, rTE- and MF-**
884 **induced [Ca²⁺]_i elevations in HUVECs.** Effect of kE (1µg/mL), rTE (1µg/mL) and MF
885 (0.5µg/mL) after 15 min treatment with 1µM thapsigargin (A-C); bathing in free calcium
886 medium (D-F); 15 min treatment with 1mM NiCl₂ (G-I) and 10 min treatment with 3µM
887 Nifedipine (J-L). Control responses to kE, rTE and MF are presented in Fig. 1. B, bradykinin (1
888 µM). Representative experiments are presented. In each case, n=30-50 cells from at least 3
889 different cell cultures.

890

891 **Figure 4: Signaling pathways mediating [Ca²⁺]_i elevations in HUVECs.** kE (1µg/mL), rTE
892 (1µg/mL) and MF (0.5µg/mL) addition after treatment with 50µM 2-APB (IP3Receptor
893 inhibitor, 5min) (A-C), 10µM Dantrolen (10min) (D-F) and 50µM U73122 (PLC inhibitor,
894 30min) (G-I). Control responses to kE, rTE and MF are presented in Fig. 1. B, bradykinin (1
895 µM). Representative experiments are presented. In each case, n=30-40 cells from at least 3
896 different cell cultures.

897

898 **Figure 5: Dose-effect of kE, rTE, MF and PF14 on HUVECs proliferation and adhesion.**
899 Proliferation rate was measured by using WST-1 colorimetric method, 16H and 48H after
900 treatment of HUVECs with different concentrations of kE (A), rTE (B), MF (C) and PF14 (D)

901 (n=12-15 dishes per group). *Significantly different from corresponding control (one-way
902 ANOVA, $P \leq 0.05$, variable: dose of the elastic fiber component). A generally significant effect
903 of kE, rTE and MF was shown by 2-way ANOVA test, $P \leq 0.05$ (variables: dose and time of
904 application). Adhesion rate are measured by relative absorbance, 2H after cells passages and
905 treatment with different concentrations of FN (fibronectin), kE and rTE (E) or FN and MF (F).
906 Values are means \pm SE. * Significant difference of rTE and MF results and the corresponding
907 controls (0 μ g/mL rTE or MF); Δ significant difference between kE result and the
908 corresponding control (0 μ g/mL kE) (one-way ANOVA, $P \leq 0.05$). A generally significant effect
909 of kE, rTE and MF was deduced after 2-way anova test, $P \leq 0.05$.

910

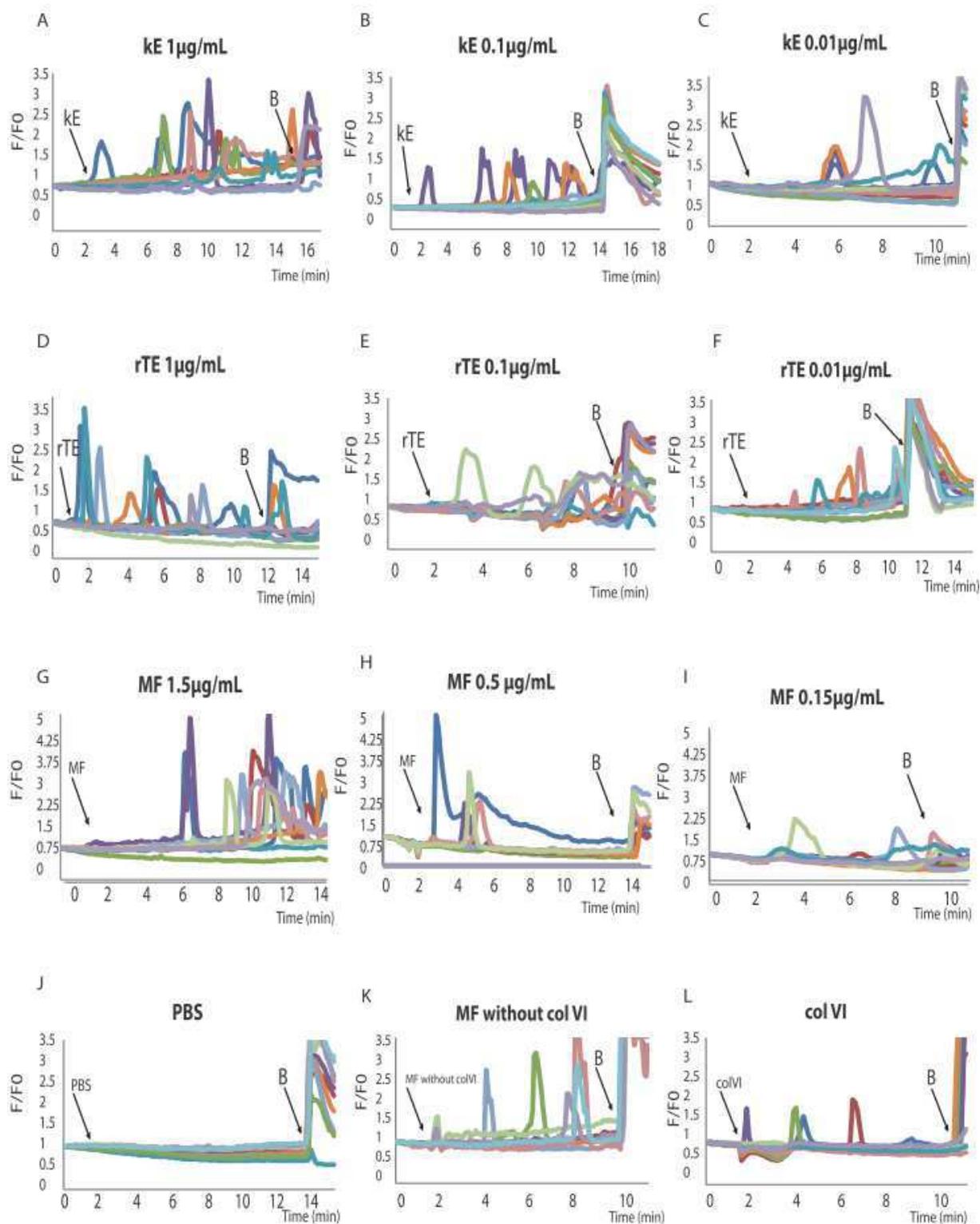
911 **Figure 6: Transmigration and wound healing closure of HUVECs in response to kE, rTE and**
912 **MF.** A-D Transmigration of HUVEC 24 and 48H after incubation when the underside of the
913 Boyden chamber inserts was precoated with 20%FBS and different concentrations of kE (A),
914 rTE (B), MF (C) and PF14 (D) (n=9-12 in each case). A generally significant effect of kE was
915 revealed by 2-way ANOVA test, $P \leq 0.05$ (variables: dose and time of application). (E): kinetic
916 evolution on wound closure in HUVEC cultures (n=5-7) incubated with solvent or 1 μ g/mL of
917 kE, rTE and MF. Values are means \pm SE.*MF result significantly different from the control.
918 (one-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

919

920 **Figure 7: Collagen, elastin and fibrillin levels after cell stimulation by kE, rTE, MF and PF14.**
921 Measurements of the effects of kE, rTE, MF and PF14 on HUVEC production of collagen (A-
922 D), elastin (E-H) and fibrillin (I-L) were performed. Dexamethasone (Dexa) and Fetal Bovine
923 Serum (FBS) were used as positive controls (n=12-16 in each group). Values are means \pm
924 SE.*Significantly different from the negative control (0 μ g/mL protein added) (one-way
925 ANOVA, $P \leq 0.05$). For each treatment, one-way ANOVA test ($P \leq 0.05$) applied to deduce the
926 treatment general effect (independently on the treatment dose) revealed generally
927 significant effects in collagen synthesis with rTE and PF14 and in elastin and fibrillin synthesis
928 with kE, rTE and MF.

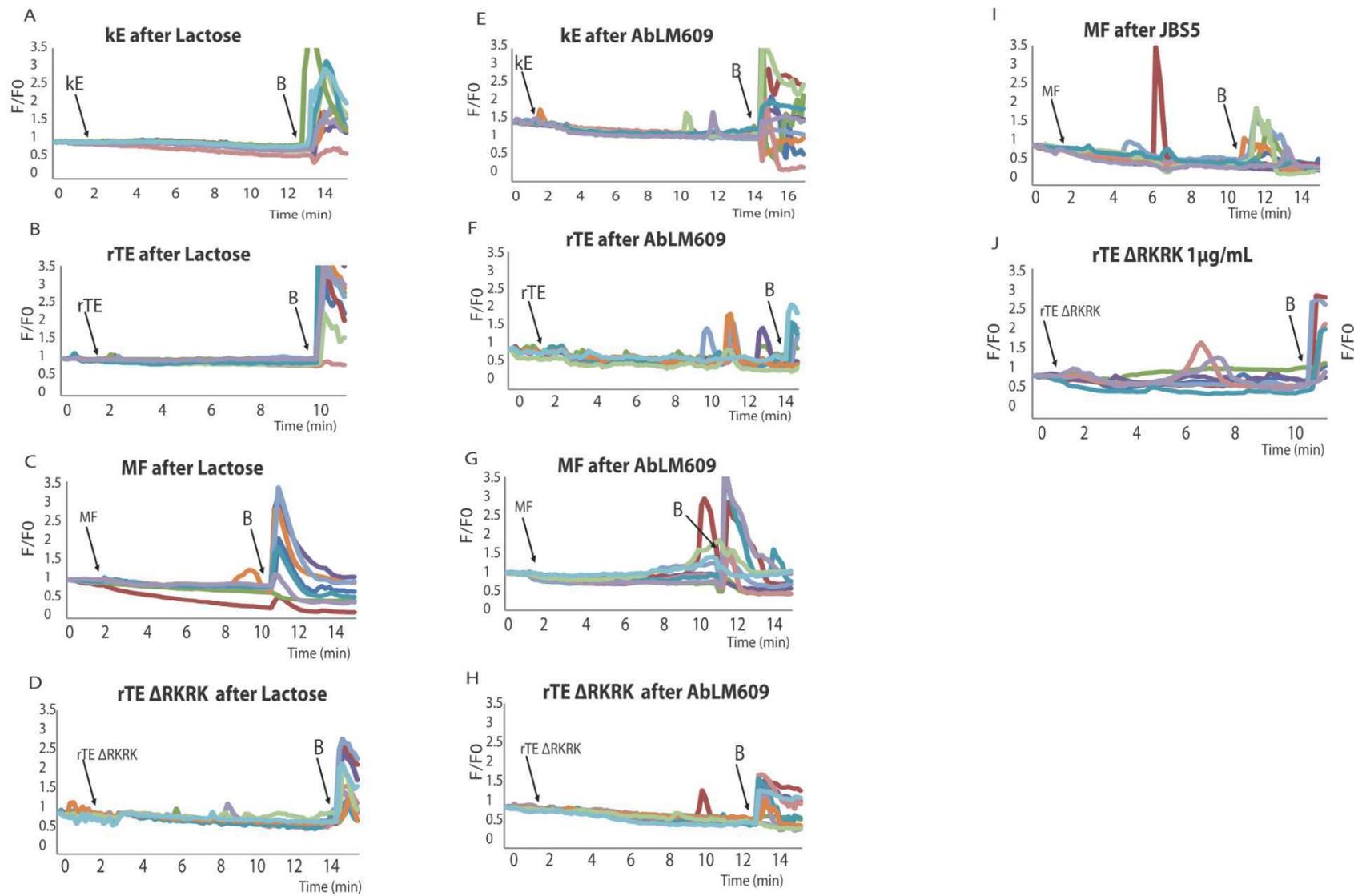
929 **Figure 8: Matrix degradation mechanisms induced by kE, rTE, MF and PF14.** Band intensity
930 measured after gelatin zymography (A), gelatin reverse zymography (B) and collagen
931 zymography (C,D) of HUVEC medium collected after treatment with 1 μ g/mL kE, 1 μ g/mL rTE,
932 0.5 μ g/mL MF and 1 μ g/mL PF14. N=3-4 in each group. Values are means \pm SE. *Significantly
933 different from the control (one-way ANOVA, $P \leq 0.05$).

934



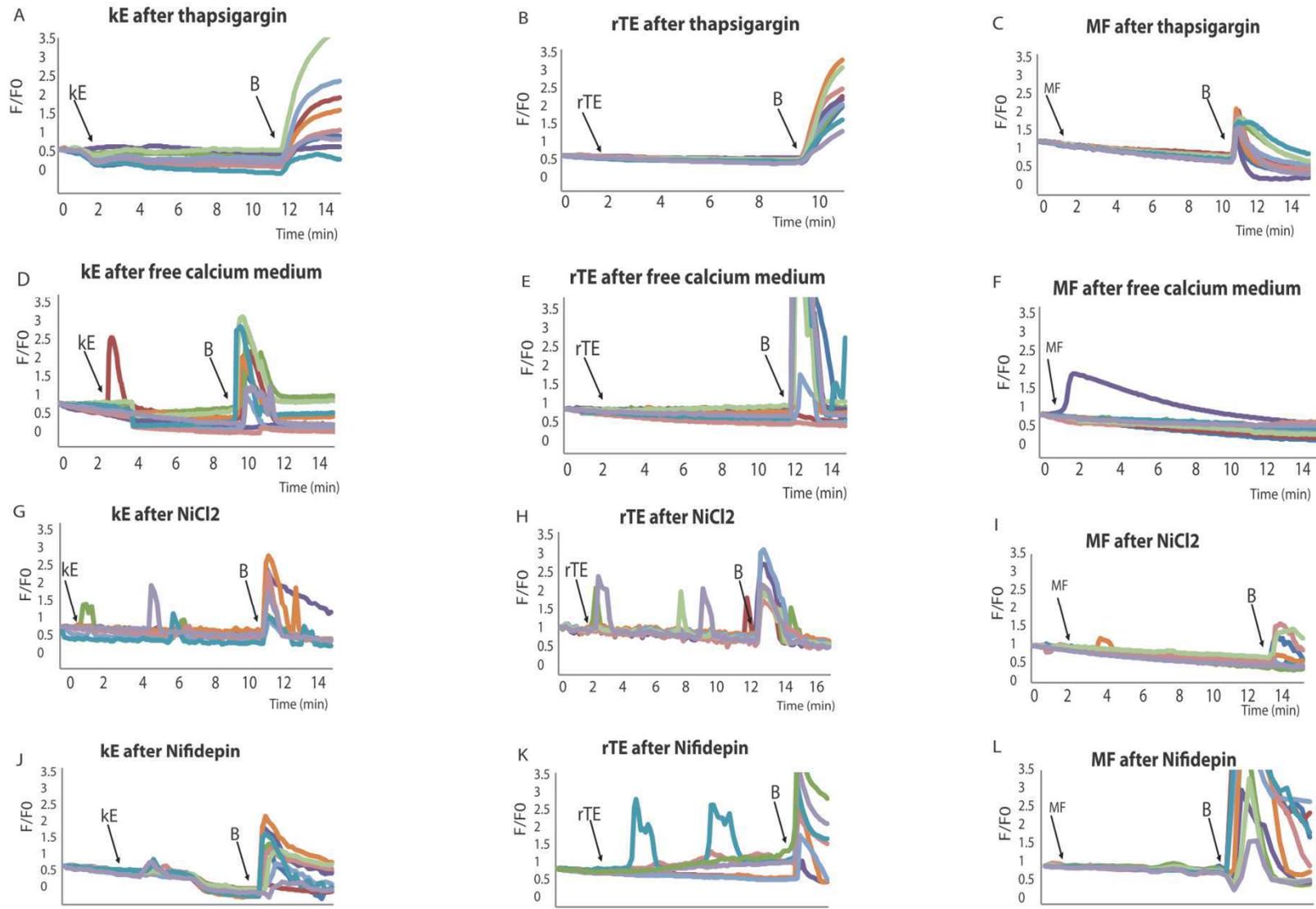
935

936 Figure 1



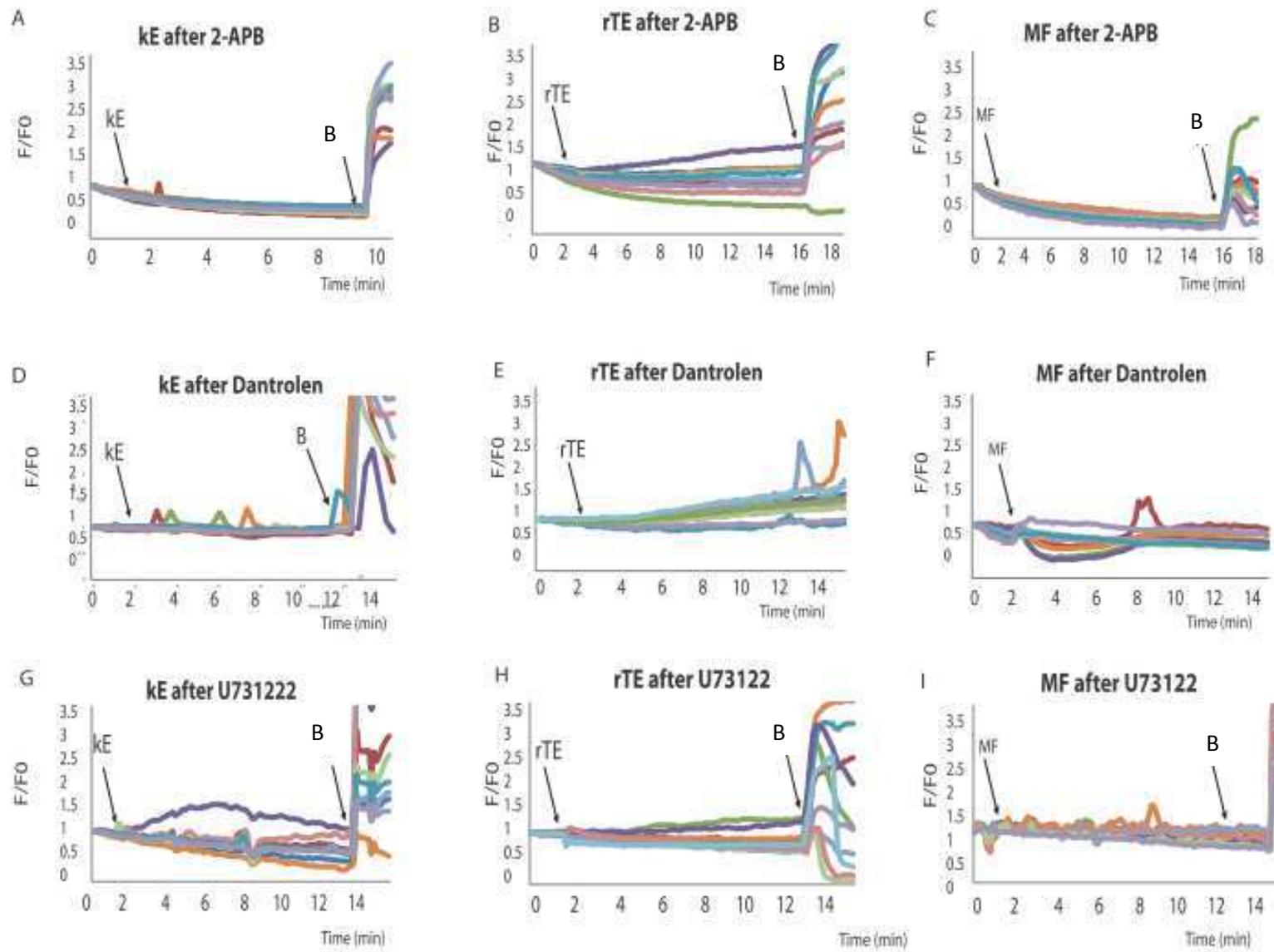
937

938 Figure 2

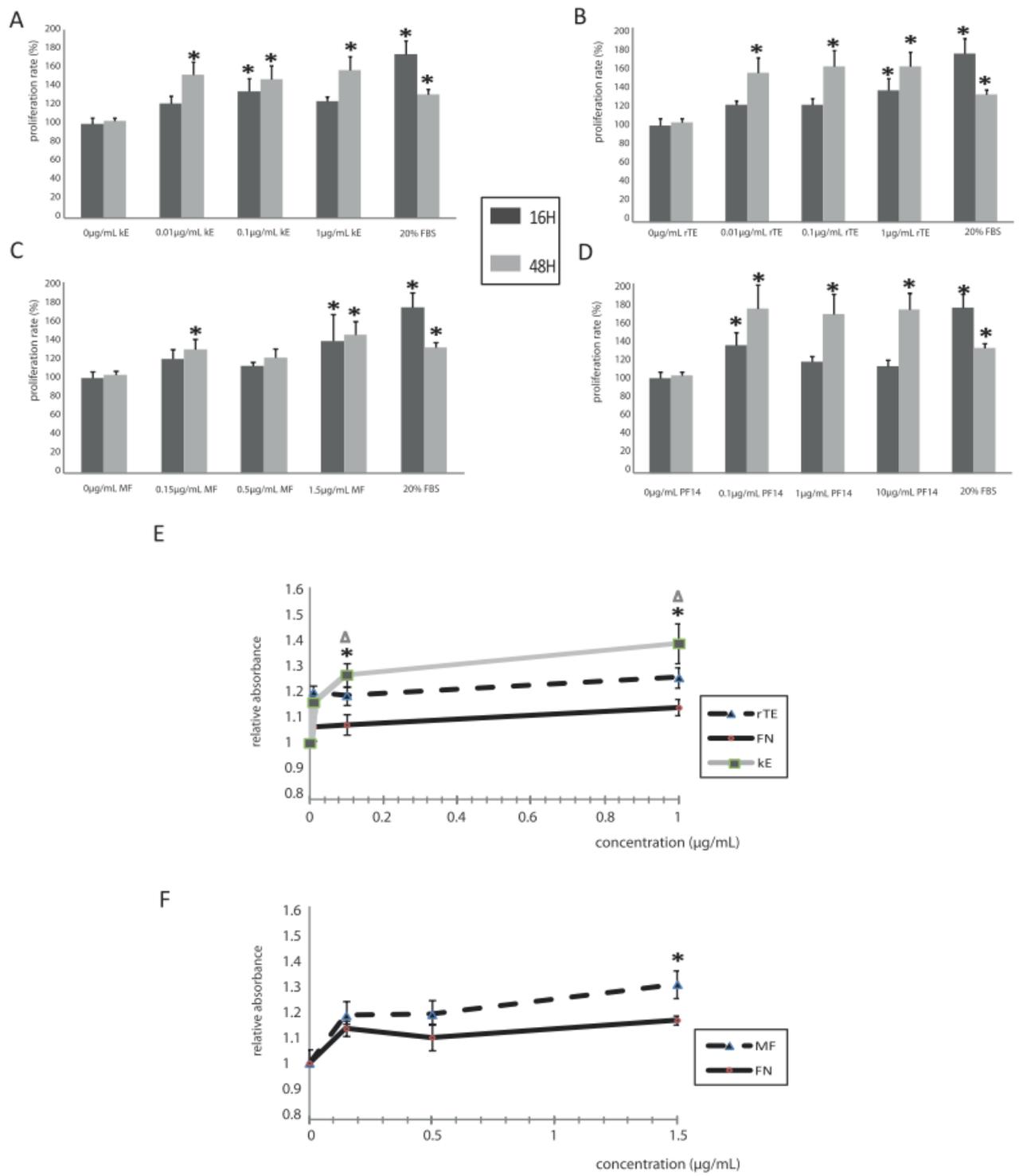


939

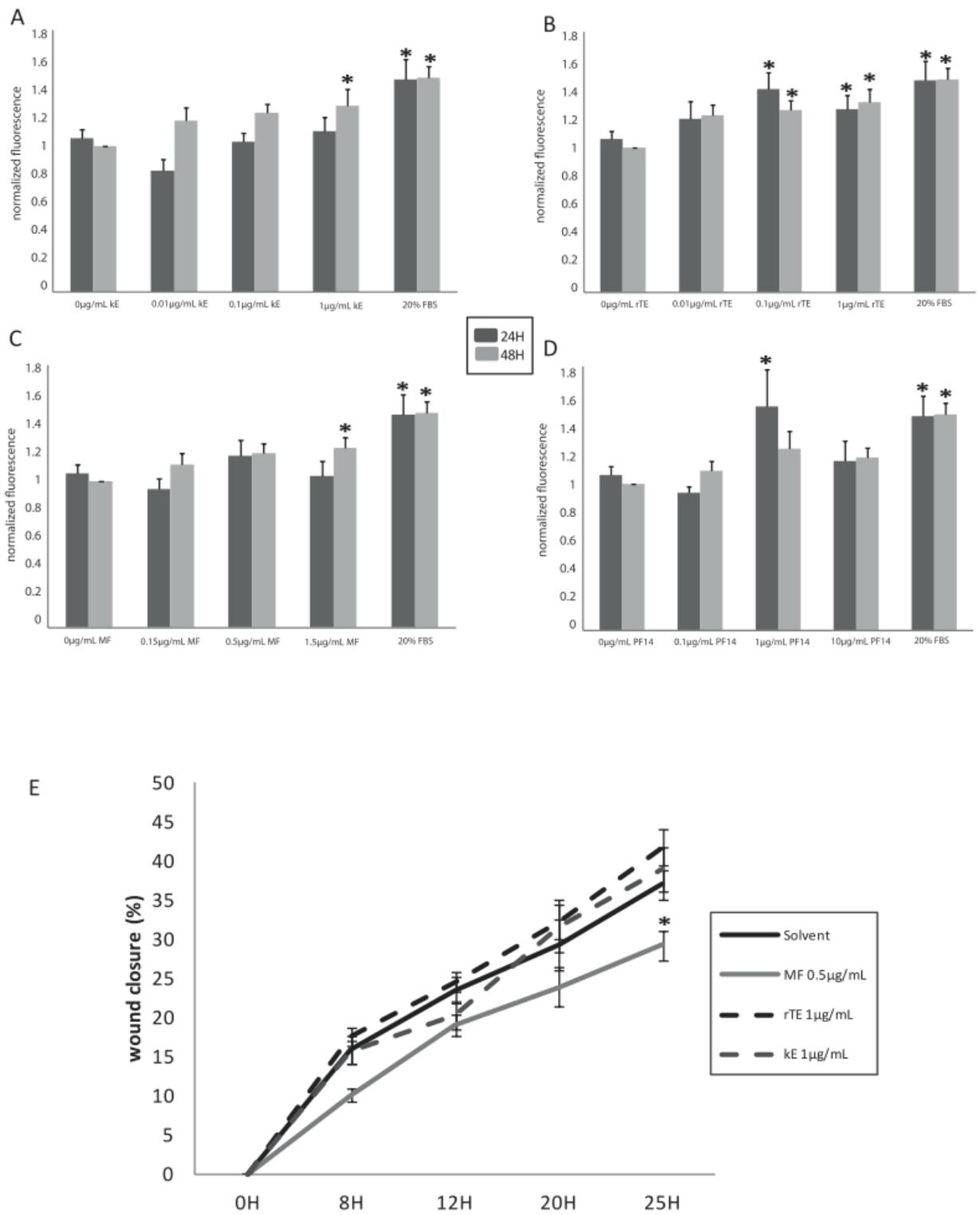
940 Figure 3



941
942 Figure 4

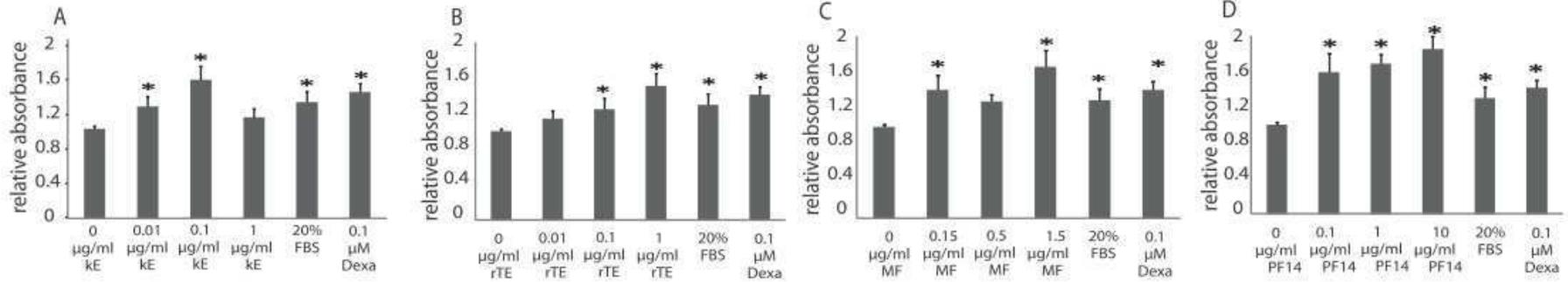


943
944 Figure 5

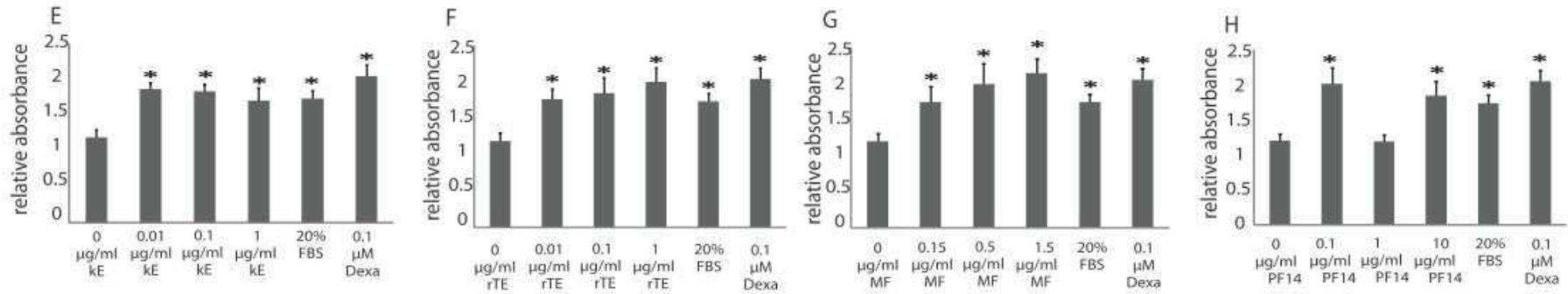


945
946 Figure 6

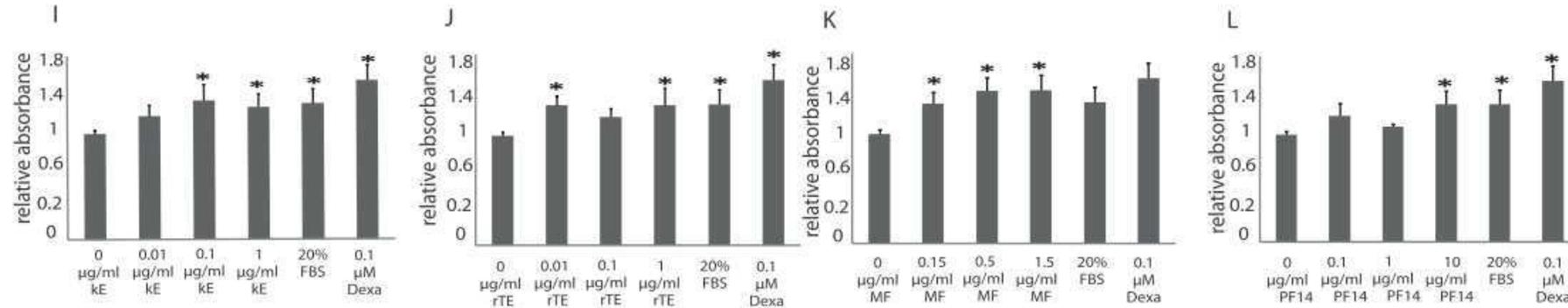
Collagen synthesis



Elastin synthesis

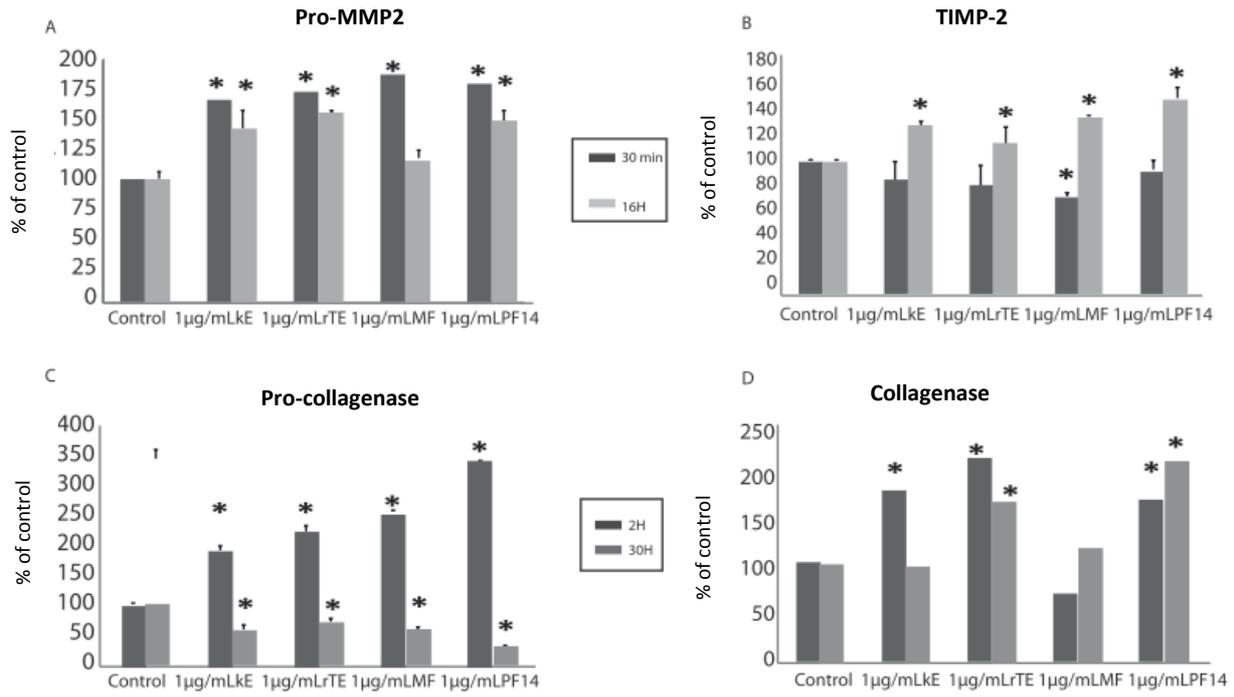


Fibrillin synthesis



947

948 Figure 7



949

950 Figure 8

951 **Online supplementary results:**

952 **Figure legends:**

953 **Table 1: Values of the HUVEC calcium response observed after kE addition.** Average values of
954 calcium peaks, delay time to first peak and percentage of peaks repetition after addition of kE
955 and different treatments to HUVECs. Data are means \pm SEM.

956 **Table 2: Values of the HUVEC calcium response observed after rTE addition. Average values**
957 **of calcium peaks, delay time to first peak and percentage of peaks repetition after addition**
958 **of rTE and different treatments to HUVECs. Data are means \pm SEM.**

959 **Table 3: Values of the HUVEC calcium response observed after MF addition. Average values**
960 **of calcium peaks, delay time to first peak and percentage of peaks repetition after addition**
961 **of MF and different treatments to HUVECs. Data are means \pm SEM..**

962 **Figure 1: Cytochalasin-D effect on kE, rTE and MF inducing $[Ca^{2+}]_i$ elevations in HUVECs.**
963 Intracellular calcium level elevations after addition of kE (1 μ g/mL) (A), rTE (1 μ g/mL) (B) and
964 MF (0.5 μ g/mL) (C) to HUVECs treated 45 min with 10⁻⁵mg/mL cytochalasin-D. B, bradykinin (1
965 μ M). Representative experiments are presented. In each case, n=30-40 cells from at least 3
966 different cell cultures.

967 **Figure 2: Erk1/2 and Src participation on kE, rTE and MF inducing $[Ca^{2+}]_i$ elevations in**
968 **HUVECs.** Effect of addition of kE (1 μ g/mL), rTE (1 μ g/mL) and MF (0.5 μ g/mL) after 10 min
969 treatment of HUVEC with 50 μ M PD98059 (Erk1/2 inhibitor) (A-C) and 10 μ M PP2 (Src inhibitor)
970 (D-F). B, bradykinin (1 μ M). Representative experiments are presented. In each case, n=30-40
971 cells from at least 3 different cell cultures.

972 **Figure 3: Collagen, Elastin and fibrillin levels induced by MF, MF without col VI and col VI.**
973 MF (0.5 μ g/mL), MF without colVI (0.5 μ g/mL) and colVI (0.15 μ g/mL) were used to test
974 modulation in HUVECs synthesis level of collagen (A), elastin (B) and fibrillin (C).
975 Dexamethasone (Dexa) and FBS were used as positive controls (n=12-16 in each group).
976 Values are means \pm SE. *Significantly different from the control (0 μ g/mL) (one-way ANOVA, P
977 \leq 0.05).

Product	Concentration	Treatment	Number of cells responding (Mean value)	Average values of calcium peaks observed	Time delay to the first peak observed (second)	Repetition of peaks
PBS			1/50	1.3	45	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹		8-9/10	2.71 \pm (0.21)	140.38 \pm (27.33)	80%
kE	0.1 μ g.mL ⁻¹		4-5/10	1.97 \pm (0.17)	88.57 \pm (13.11)	14.%
kE	0.01 μ g.mL ⁻¹		3/10	1.67 \pm (0.18)	71.67 \pm (23.24)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Thapsigargin	1/40	1.2	300	1%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	free-calcium medium	2/30	1.85 \pm (0.65)	27.5 \pm (2.5)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	NiCl ₂	4-5/10	2.06 \pm (0.16)	51.538 \pm (16.78)	23%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Nifedipin	3/50	2.1 \pm (0.45)	43.33 \pm (15.90)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Lactose	0			
kE	1 μ g.mL ⁻¹	LM609	7/50	1.53 \pm (0.20)	125.71 \pm (12.89)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Cytochalasin-D	1/10	2.14 \pm (0.04)	44 \pm (17.78)	40%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	U73122	2/40	1.45 \pm (0.05)	57.5 \pm (17.5)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	PD98059	3/50	2.4 \pm (0.38)	66.67 \pm (21.67)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	PP2	5/20	1.92 \pm (0.10)	69 \pm (13.76)	60%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	2-APB	1/30	1.3	45	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Dantrolen	7/40	1.88 \pm (0.29)	86.43 \pm (26.16)	14%

978

979 Table 1

Product	Concentration	Treatment	Number of cells responding (Mean value)	Average values of calcium peaks observed	Time delay to the first peak observed (second)	Repetition of peaks
PBS			1/50	1.3	45	0%
rTE	1 μ g.mL ⁻¹		5-6/10	2.18 \pm (0.20)	55.88 \pm (12.55)	67%
rTE	0.1 μ g.mL ⁻¹		3-4/10	1.87 \pm (0.12)	118.64 \pm (21.364)	27%
rTE	0.01 μ g.mL ⁻¹		2/10	2.35 \pm (0.41)	115 \pm (17.84)	33%
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	Thapsigargin	0			
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	free-calcium medium	0			
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	NIcI2	4/10	2.59 \pm (0.17)	135.83 \pm (20.91)	67%
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	Nifedipin	3/40	2.13 \pm (0.13)	90 \pm (30)	67%
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	Lactose	0			
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	LM609	11/50	1.7 \pm (0.19)	309.10 \pm (28.59)	0%
rTE Δ RKRK	1 μ g.mL ⁻¹		3/10	2.03 \pm (0.28)	211.67 \pm (21.35)	25%
rTE Δ RKRK	1 μ g.mL ⁻¹	Lactose	2/40	2.1 \pm (0.7)	180	0%
rTE Δ RKRK	1 μ g.mL ⁻¹	LM609	6/40	2 \pm (0,26)	268 \pm (52)	50%
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	Cytochalasin-D	4/70	1.17 \pm (0,04)	42.5 \pm (13.77)	1%
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	U73122	0			
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	PD98059	5/30	1.92 \pm (0,20)	221.11 \pm (25.41)	0%
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	PP2	1/10	1.96 \pm (0,26)	160 \pm (88.18)	20%
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	2-APB	3/40	1.75 \pm (0,10)	10	0%
rTE	1 μ g.mL ⁻¹	Dantrolen	4/50	1.83 \pm (0,40)	95 \pm (20.62)	0%

980
981 Table 2

982

983

984

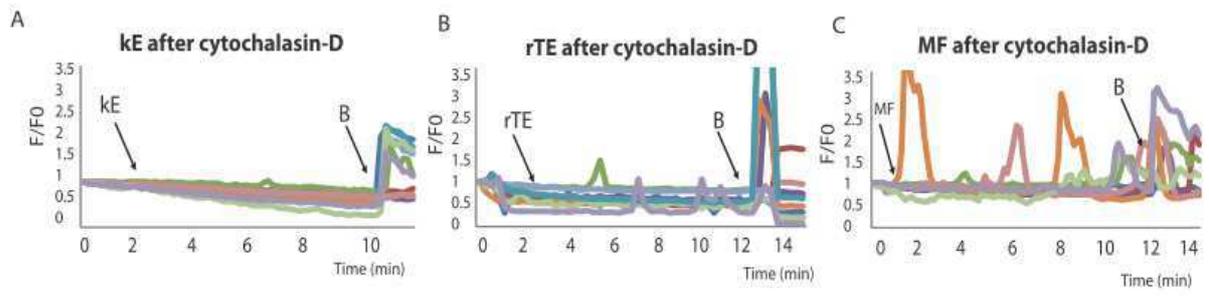
985

Product	Concentration	Treatment	Number of cells responding (Mean value)	Average values of calcium peaks observed	Time delay to the first peak observed (second)	Repetition of peaks
PBS			1/50	1.3	45	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹		8-9/10	2.71 \pm (0.21)	140.38 \pm (27.33)	80%
kE	0.1 μ g.mL ⁻¹		4-5/10	1.97 \pm (0.17)	88.57 \pm (13.11)	14%
kE	0.01 μ g.mL ⁻¹		3/10	1.67 \pm (0.18)	71.67 \pm (23.24)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Thapsigargin	1/40	1.2	300	1%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	free-calcium medium	2/30	1.85 \pm (0.65)	27.5 \pm (2.5)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	NiCl ₂	4-5/10	2.06 \pm (0.16)	51.538 \pm (16.78)	23%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Nifedipin	3/50	2.1 \pm (0.45)	43.33 \pm (15.90)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Lactose	0			
kE	1 μ g.mL ⁻¹	LM609	7/50	1.53 \pm (0.20)	125.71 \pm (12.89)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Cytochalasin-D	1/10	2.14 \pm (0.04)	44 \pm (17.78)	40%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	U73122	2/40	1.45 \pm (0.05)	57.5 \pm (17.5)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	PD98059	3/50	2.4 \pm (0.38)	66.67 \pm (21.67)	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	PP2	5/20	1.92 \pm (0.10)	69 \pm (13.76)	60%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	2-APB	1/30	1.3	45	0%
kE	1 μ g.mL ⁻¹	Dantrolen	7/40	1.88 \pm (0.29)	86.43 \pm (26.16)	14%

986

987 Table 3

988

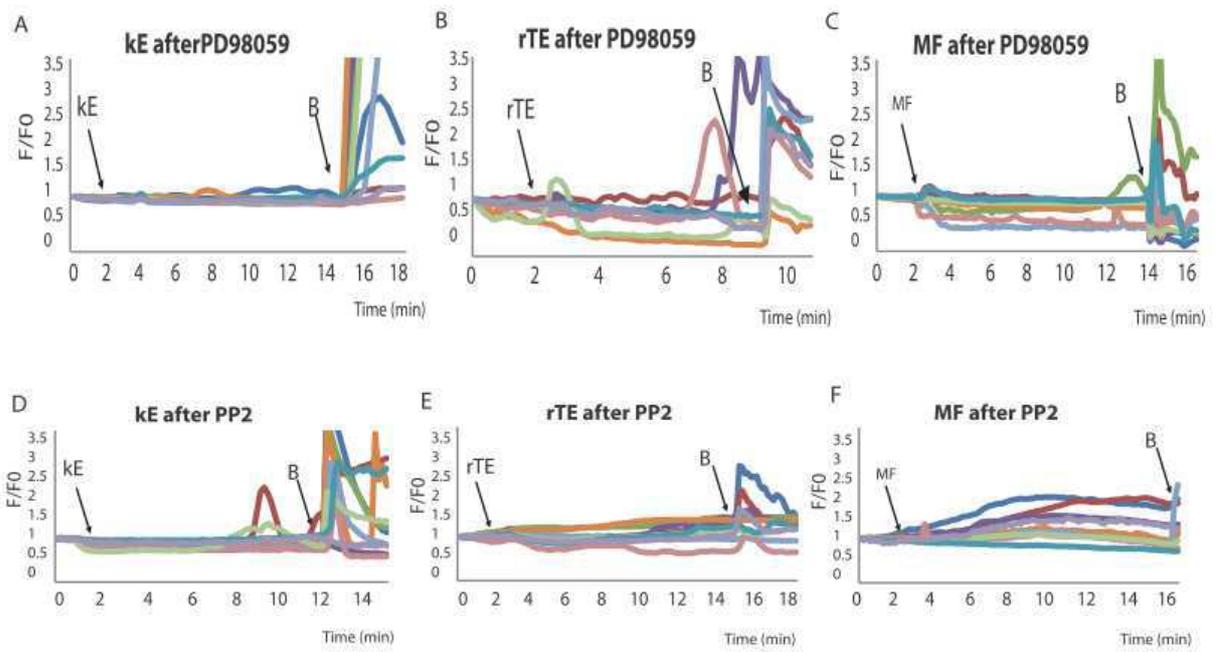


989
990 Online Figure 1

991

992

993

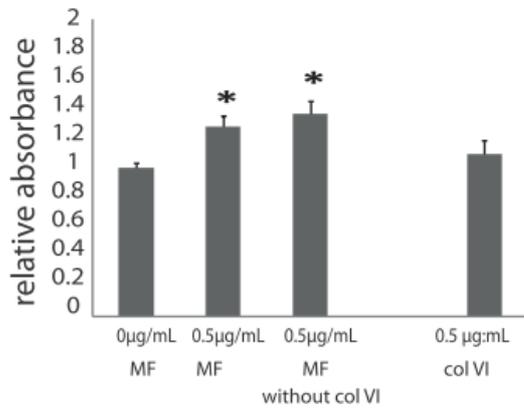


994

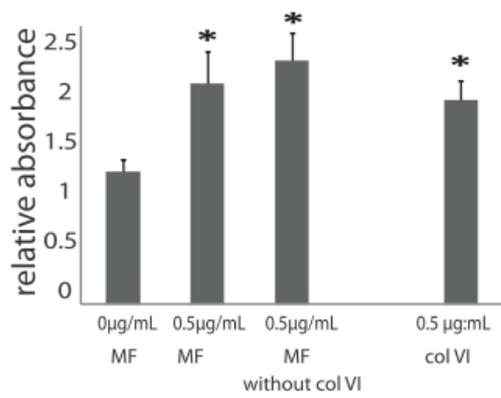
995 Online Figure 2

996

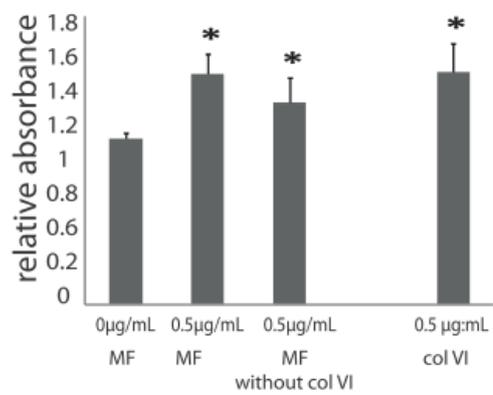
A- Collagen synthesis



B- Elastin synthesis



C- Fibrillin synthesis



997

998 Online Figure 3

2.2.4 Discussion des articles 1 et 2 :

Notre étude sur les composants des fibres élastiques, ainsi que les études précédentes ont révélé que ces fibres ne sont pas inertes vis-à-vis des cellules endothéliales et qu'elles interagissent avec ces cellules en y provoquant des processus de signalisation.

Une importante signalisation intracellulaire est induite dans les HUVECs par les composants des fibres élastiques, impliquant en particulier une augmentation du niveau de calcium intracellulaire qui pourrait être responsable par la suite de nombreux phénomènes modifiant la signalisation ou/et les fonctions des cellules endothéliales. Ainsi, la kE, la rTE, et les MF augmentent de 2 à 3 fois le niveau calcique cytoplasmique de la plupart des cellules endothéliales (HUVEC) d'une manière dépendante de la dose. Cette augmentation trouve son origine à la fois dans le calcium du milieu extracellulaire et dans les réserves de calcium du réticulum endoplasmique, qui sont tous les deux indispensables pour déclencher cette augmentation. Des canaux calciques de la membrane plasmique -de type T et L- interviennent chacun partiellement dans ces élévations de la concentration calcique cytoplasmique. De plus, au niveau du réticulum endoplasmique, les récepteurs et canaux répondant à l'IP3 et à la ryanodine sont aussi stimulés. Les activateurs de ces canaux sont produits via l'activation de signaux intracellulaires générés suite à la liaison de la rTE, la kE et les MF au moins à deux récepteurs membranaires. En effet, nos travaux ont montré que le récepteur de l'élastine-laminine et les intégrines $\alpha\beta3$ interviennent dans les signalisations décrites, travaillant en synergie pour activer les messagers intracellulaires. En plus de ces récepteurs, les MF se lient aussi à l'intégrine $\alpha5\beta1$. En revanche, le fragment de la fibrilline-1 PF14 a été montré comme déclenchant une signalisation intracellulaire endothéliale médiée par les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$, mais aucune interaction de PF14 avec le récepteur de l'élastine n'a encore été montrée (Mariko, Ghandour et al. 2010). La liaison des composants des fibres élastiques avec ces récepteurs activent des messagers intracellulaires tels que la PLC/IP3, Src et MEK1. De plus, le cytosquelette d'actine intervient dans cette signalisation dans le cas d'une stimulation cellulaire par la rTE et de la kE. Cette intervention des microfilaments d'actine est essentielle pour le déclenchement de l'augmentation du signal calcique dans le cas de ces 2 composés dérivés de l'élastine mais pas dans le cas des MF qui, comme cela a déjà été démontré pour PF14 (Mariko, Ghandour et al. 2010), ne nécessitent pas la participation de l'actine pour transduire le signal. Ceci constitue la principale différence entre signalisation de l'élastine et signalisation des microfibrilles/fibrilline-1 qui a été mise en évidence dans cet article.

Ces événements de signalisation s'ajoutent à d'autres événements de signalisation déjà démontrés et qui seraient responsables de l'induction de changements dans les fonctions cellulaires (Faury, Usson et al. 1998, Robinet, Fahem et al. 2005, Fahem, Robinet et al. 2008, Sengle, Charbonneau et al. 2008, Mariko, Ghandour et al. 2010). Nous avons montré ici que la rTE, la kE, les MF et PF14 stimulent la prolifération et l'adhésion des HUVEC. En revanche, l'effet migratoire de ces molécules est variable. La kE et la rTE et PF14 augmentent la migration des HUVECs en suspension dans des chambres de Boyden alors que ceci n'est pas observé pour des HUVECs adhérentes pour la kE et la rTE (mais est observé avec PF14) après une blessure faite sur des HUVECs adhérentes. En revanche, de manière surprenante, les MF, qui dans des chambres de Boyden augmentent le pouvoir migratoire des cellules, diminuent significativement la migration

des cellules adhérentes en test de blessure. Ceci met en relief un rôle important des MF sur les cellules vasculaires, variable suivant l'état de cellules.

D'autre part, les composants des fibres élastiques interagissant avec les HUVECs exercent un effet de rétroaction positive sur leur propre synthèse. L'ajout de chacun de ces composants sur des HUVECs induit l'augmentation de la synthèse de l'élastine et de la fibrilline-1, ce qui peut contribuer *in vivo* à augmenter l'élasticité vasculaire. Cependant, cet effet pourrait être compensé par l'augmentation de la synthèse du collagène et des MMPs intervenant dans la dégradation des fibres élastiques, pouvant contribuer soit à une élévation de la rigidité vasculaire. Cependant, l'augmentation de la dégradation de la MEC -en particulier des fibres élastiques- pourrait aussi permettre de libérer des peptides d'élastine et de microfibrilles, qui pourrait exercer une rétroaction positive sur la synthèse des fibres élastiques et donc augmenter l'élasticité vasculaire. L'étude *in vivo* de l'effet des composants des fibres élastiques sur l'élasticité vasculaire pourrait permettre de mieux identifier l'effet physiologique global de ces molécules sur la structure de la MEC et la fonction vasculaires.

Tous ces résultats démontrent que les composants essentiels des fibres élastiques, les microfibrilles, surtout la fibrilline-1, et l'élastine, interagissent fortement avec les cellules endothéliales. Cette conclusion est étayée avec l'effet vasomoteur endothélium-dépendant de ces mêmes composants des fibres élastiques, qui a été décrit dans le chapitre précédent de ces composants avec les anneaux aortiques de rats adultes.

Il reste de nombreuses voies de signalisation intracellulaires à étudier en lien avec ces interactions. La mise à jour de ces voies pourrait clarifier plus avant le rôle effectif des fibres élastiques sur les cellules vasculaires, en plus de son rôle mécanique dans les vaisseaux sanguins. De même, l'étude des effets cellulaires et des signalisations sur d'autres modèles cellulaires vasculaires -comme les CMLV- est importante pour pouvoir intégrer les multiples effets cellulaires des fibres élastiques dans les parois vasculaires et tirer une conclusion physiologique. De plus, ceci pourrait contribuer à comprendre les symptômes observés dans les pathologies liées à des déficiences de ces composés comme le syndrome de Williams-Beuren et le syndrome de Marfan. Le peu de différences découvertes entre l'action de la fibrilline-1 et de l'élastine ne permet pas d'expliquer à elles seules la contradiction des symptômes présents dans ces pathologies. D'autres hypothèses d'explication de ces différences seront à établir. Une de ces hypothèses pourrait être une différence dans l'expression, dans le cas de ces pathologies, des récepteurs des fibres élastiques comme le récepteur de l'élastine-laminine capable d'interagir avec les microfibrilles et l'élastine. Cette différence d'expression de l'ERC a déjà été démontrée auparavant dans les CMLV qui, suivant leur phénotype, expriment différentes sous-unités de l'ERC (Yamamoto, Aoyagi et al. 1995). Une autre hypothèse d'explication de cette différence pourrait être liée à une différence de rapport (composants libres des fibres élastiques/fibres élastiques matures) qui pourrait augmenter en cas du WBS et diminuer en cas du syndrome de Marfan. Ce rapport pourrait être en fait le signal perçu par les cellules. Cette hypothèse, décrite dans l'article, sera détaillée plus loin dans cette thèse, dans le chapitre discussion.

2.3 Article 3: Mise au point d'un protocole de culture de cellules musculaires lisses (CMLV) à partir d'aortes de souris

2.3.1 Introduction de l'article 3 :

Après l'étude de l'effet des composants des fibres élastiques sur les cellules endothéliales, une étude similaire sur les effets de ces molécules sur les CMLV était nécessaire dans le but de comparer les actions respectives des fibres élastiques sur les 2 principaux types cellulaires des parois des vaisseaux sanguins. Il est à noter que, *in vivo*, les CMLV vont être encore plus en contact avec les fibres élastiques que les cellules endothéliales puisque, dans la média, on observe une alternance d'unités lamellaires composées chacune d'une couche de CMLV et d'une lame élastique composée de fibres élastiques synthétisées par les CMLV adjacentes.

Pour débiter cette étude sur les CMLV, il était important de trouver un modèle cellulaire de CMLV. Au début de cette thèse, il existait au laboratoire deux protocoles d'isolement de CMLV, le premier concernant les CMLV de l'aorte de rat et le deuxième concernant les CMLV de l'aorte de souris. L'avantage du deuxième modèle de CMLV est qu'un champ d'étude plus vaste est ouvert par le modèle souris : en plus de la très large utilisation du modèle souris en recherche et de la facilité d'élevage de ces animaux, l'existence de nombreuses souris génétiquement modifiées permet la production de diverses CMLV, en particulier invalidées pour un gène donné. Dans le cas des souris modifiées pour des gènes intervenant dans l'équilibre de la fonction vasculaire, comme c'est le cas pour les composants des fibres élastiques, les CMLV isolées permettent d'étudier le rôle de ces protéines sur la fonction de ces cellules dans les vaisseaux sanguins.

Cependant, le protocole d'isolement initial des CMLV à partir des aortes des souris utilisé au laboratoire (Grote 2003, Kobayashi, Inoue et al. 2005, Payne, Fogelgren et al. 2005) n'était pas assez efficace : i) il nécessitait l'utilisation d'au moins deux aortes de souris au départ pour chaque protocole de mise en culture, ii) il n'était pas systématiquement opérationnel puisque, même chez les souris jeunes, une part importante des mises en culture échouait, iii) avec des souris âgées, la mise en culture aboutissait très rarement, et enfin iv) dans le cas de souris modifiées génétiquement pour les composants des fibres élastiques, le résultat de la mise en culture était au moins aussi peu efficace qu'avec les souris âgées. Ce protocole reposait sur l'utilisation de l'aorte abdominale et thoracique de deux souris du même groupe. L'adventice de chacune de ces 2 aortes était prélevée par raclage, méthode mécanique consistant à forcer l'adventice par étirement, libérant ainsi l'intima et la média. L'intima-média était alors digérée avec une solution de collagénase et élastase, libérant les CMLV, qui étaient alors mises en culture. Le problème principal de ce protocole était le faible nombre de cellules récoltées, d'où une faible densité d'ensemencement. Dans les cas où la mise en culture aboutissait, il était observé systématiquement que ceci correspondait à des cas où quelques centaines de cellules au moins étaient mises en culture dans un puits. Sur ces cellules, une partie seulement réussissait à adhérer et débiter des divisions cellulaires. La culture démarrait ainsi assez lentement et arrivait à confluence au moins

3 semaines après le moment de la mise en culture. De plus, les passages suivants nécessitaient aussi un temps long de croissance cellulaire, sans doute par épuisement/début de sénescence de celles-ci après de trop nombreuses divisions.

Tous ces inconvénients nous ont poussés à mettre au point un nouveau protocole de culture de CMLV optimisé à partir d'aorte de souris, protocole qui aurait un meilleur rendement, serait rapide et répétitif et qui fonctionnerait pour toutes les tranches d'âges et tous les génotypes des souris utilisées. Nous avons cherché à développer ce protocole à partir des protocoles préexistants dans la littérature et testés au laboratoire (Grote 2003, Kobayashi, Inoue et al. 2005, Payne, Fogelgren et al. 2005). Dans tous ces protocoles, les étapes essentielles sont communes. Il s'agit de disséquer la souris, d'extraire l'aorte de la souris, qui est ensuite débarrassée de son adventice, libérant l'intima et la média ou bien seulement la média, qui est digérée par des enzymes pour libérer les CMLV et les mettre en culture dans des puits recouverts avec différents supports avec le milieu de culture adéquat. Cependant, des différences existent dans les détails de ces étapes, concernant la technique de séparation de l'adventice, les enzymes de digestion et leurs concentrations et enfin les protéines recouvrant (« coating ») le plastique de culture. Nous avons donc modifié les valeurs de chacun de ces paramètres afin de trouver la combinaison qui donnerait le protocole global le plus efficace :

- concernant la technique de séparation de l'adventice, nous avons testé l'efficacité d'une nouvelle étape de prédigestion enzymatique par la collagénase, avant le raclage ou la séparation mécanique,
- concernant les enzymes de digestion, nous avons testé l'efficacité de différentes solutions de digestion contenant des mélanges à plusieurs concentrations de collagénase, d'élastase, d'inhibiteur de trypsine et ceci en présence ou en absence de sérum de veau foetal (qui limite l'activité enzymatique),
- concernant les protéines recouvrant (coating) le plastique de culture, nous avons testé les collagènes I, V, VI, le Matrigel, la fibronectine, le sérum de veau foetal et la gélatine.

Le résultat de tous ces tests est le protocole qui est détaillé dans l'article qui suit.

2.3.2 *Article 3*

1 **Optimized protocol for the primary culture of smooth**
2 **muscle cells from mouse thoracic aortas.**

3

4 Ghandour Z.¹, Huber P.², Fhayli W.¹, Jacob M.P.³, Godin-Ribuot D.¹, Faury G.¹

5

6 1. Laboratoire Hypoxie: Physiopathologie Cardiovasculaire et Respiratoire (HP2), INSERM U 1042,
7 Université Joseph Fourier, Bâtiment Jean Roget, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Domaine de
8 La Merci, 38706 La Tronche, France.

9 2. Laboratoire biologie du cancer et de l'infection, INSERM UMR-S 1036, Equipe Pathogénèse
10 Bactérienne et Réponses Cellulaires, iRTSV/GPC, 17 rue des Martyrs, CEA Grenoble, France.

11 3. (i) INSERM, U698, Paris, F-75877, France; (ii) Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, F-75877, France.

12

13 **Corresponding author:**

14 Pr. Gilles FAURY- Laboratoire "Hypoxie : Physiopathologie Cardiovasculaire et Respiratoire"

15 (HP2)- INSERM U 1042- Université Joseph Fourier- Bâtiment Jean Roget- Facultés de

16 Médecine et de Pharmacie- Domaine de La Merci- 38706 La Tronche Cedex- France- Tél :

17 (33) 4 76 63 75 39- E-mail : Gilles.Faury@ujf-grenoble.fr

18

19 **Abstract**

20 Vascular smooth muscle cells (VSMCs) are essential contractile and/or synthetic components
21 of the vascular wall, and they play a crucial role in the adequate functioning of the
22 vasculature. Consequently, the culture of VSMCs is an important procedure that allows for
23 direct evaluation of VSMC signaling, functions and contributions to disease onset. Different
24 protocols of VSMCs from different species exist in the literature, such as in humans, rats and
25 pigs. These procedures are easily operational in large size species because of the abundance
26 of cellular material in their vessels. However, harvesting functional VSMCs from small
27 animals, for instance mice, is a bigger challenge. The particularity and interest of choosing
28 mice is that this model is widespread and the effect of genetic engineering of mice on
29 smooth muscle cell functions can be effectively studied. Several published protocols make it
30 possible to culture VSMCs from mouse artery, although the yield of the cell collection is
31 rather low, particularly in the fibrotic vessels of aged animals and in some knock-out mice
32 that have fragile VSMCs. Moreover, the existing methods require the use of at least two
33 aortas, i.e. two mice, per culture and the delay to reach first cell confluence is long. Here, we
34 propose a new protocol for the extraction of VSMCs from a single mouse, which includes a
35 new additional step that substantially improves the efficiency of the procedure. After
36 dissection of the mouse and extraction of the aorta, pre-digestion of the artery greatly
37 facilitates adventitia elimination in order to digest the media and separate VSMCs. This
38 protocol, also applicable in aged mice, generates confluent cells only 7-10 days after
39 extraction.

40

41 **Key-words:** Vascular smooth muscle cells (VSMCs), artery, adventitia, intima, media, mice.

42

43

44 **Introduction**

45 The vascular system makes it possible to appropriately distribute blood throughout the
46 organism, with possible variations of the local blood flow depending on the specific needs of
47 each organ at a given time. The local blood flow is controlled by the adaptation of the
48 diameter of arteries and arterioles -determining the resistance to flow- which is adjusted by
49 active constriction or relaxation of the vessel (Fox 1994, Frederic H. Martini 2004). Vessel
50 motricity is provided by the presence, in the vascular walls, of contractile vascular smooth
51 muscle cells (VSMCs) whose function is regulated by the nervous system and hormones
52 (Thomas and Segal 2004, Birk, Burstein et al. 2005). Because, in certain conditions, VSMCs
53 are able to proliferate, migrate, and synthetise and secrete extracellular matrix components
54 and various signaling molecules, VSMCs also exert an important role in the development,
55 physiopathology and remodeling of the vascular wall (Raines 2000).

56 Under the influence of various stimuli, VSMCs can switch from their contractile phenotype to
57 their synthetic/proliferative phenotype, and vice-versa (Halayko and Solway 2001). Because
58 of these two important functions, VSMCs regulate both the short and long term physiology
59 and structure of the vessel, and play a key role in the wall biology dysregulations leading to
60 the onset of vascular pathologies (Touyz and Schiffrin 2004). For this reason, the culture of
61 VSMCs is an important tool to understand *in vitro* how VSMCs can switch from the
62 contractile to synthetic phenotype, the mechanisms and signaling pathways underlying the
63 different VSMCs functions and how alterations in these functions contribute to many
64 observed diseases in the course of life and during ageing.

65 Many existing protocols describe methods to culture VSMCs from different large size species
66 such as humans, pigs and even rats (Wang, Liu et al. 2007, Cairrao, Santos-Silva et al. 2009,
67 Xu, Fu et al. 2009). The methods for VSMC culture from smaller size species are more rare
68 and difficult to use because of the low quantity of cellular material available. Nevertheless,
69 the study of cultured mouse VSMCs is of particular importance since this animal model is
70 widely used in research and many genetically-engineered mouse models give access to the
71 particular role of selected proteins and/or gene promoters in the VSMCs response and
72 function. Several approaches and protocols designed to isolate VSMCs from mouse aorta are
73 described in quite a few articles (Moyer and Reinisch 1984, Guo, Van Remmen et al. 2001,

74 Ray, Leach et al. 2001, Kobayashi, Inoue et al. 2005, Golovina and Blaustein 2006). These
75 protocols, although useful, present disadvantages: i) several animals are often needed in
76 order to get a cell culture ; in their majority, they require the use of at least two aortas –i.e.
77 two mice- per culture, ii) the cell culture preparation until cell seeding is long -between
78 7hours and 2 days-, iii) the time required to get a usable cell culture –i.e. first cell
79 confluence- after the initial cell seeding is rather long -in the range of 2-3 weeks. In this
80 paper, we have tested these protocols in view of culturing VSMCs from aging and
81 genetically-engineered mice, in which VSMCs proliferate slowly. Our results showed that
82 these protocols barely work in these conditions and after the first passage, cultured VSMCs
83 die. We have adapted a new protocol for the easy culture of aortic smooth muscle cells from
84 a single mouse and applied it to aged and genetically-modified mice. Our results show that
85 our protocol is operational and efficient in all types of mice (young, old, wild-type and
86 genetically-engineered) and leads to usable VSMC cultures responding to reference signals
87 after only 7-10 days following the initial cell seeding.

88

89 **Materials**

90 **Reagents**

91 The following paragraph indicates, for each product used, the reference and provider name
92 and location. Gelatin (MERCK cat No 104078; Darmstadt, Allemagne), Sodium Pentobarbital
93 (CEVA Santé animale ; Libourne, France), Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)
94 without calcium and magnesium (Invitrogen cat No 14190; Saint Aubin, France), Hank's
95 Balanced Salt Solution (HBSS), Calcium, Magnesium, no Phenol Red (Invitrogen cat. No
96 14025; Saint Aubin, France), Fungizone Antimycotic, Liquid (Invitrogen cat. No. 15290; Saint
97 Aubin, France), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, cat. No. 31966021;
98 Saint Aubin, France), Fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, cat. No.1600; Saint Aubin, France),
99 MEM Non-Essential Amino Acids Solution, 100X (NEAA, Invitrogen, cat. No. 1140; Saint
100 Aubin, France), Penicillin/streptomycin, 100 X stock solution (Invitrogen, cat. No. 10378;
101 Saint Aubin, France), 0.25% Trypsin-EDTA (1X), Phenol Red (Invitrogen, cat. No 25200; Saint
102 Aubin, France), Dimethyl sulfoxide for cell culture (DMSO) (Sigma Aldrich CAS number 67-68-
103 5; St Quentin-Fallavier, France), Collagenase, type 2, (Worthington Biochemical

104 Corporation, cat. No. 4174; New Jersey, USA), Elastase (Worthington Biochemical
105 Corporation, cat. No. LS002290; New Jersey, USA). Collagenase and elastase can be used for
106 at least 1 year and 6 months respectively after vial opening.

107

108 **Culture solutions preparation:**

109 Gelatin solution: Dissolve 0.1g gelatin in 100mL distilled water and sterilize the solution by
110 autoclaving it.

111 Washing solution: Add $2.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ fungizone to HBSS solution.

112 Pre-digestion solution: Add 2mg collagenase type 2 to 2mL DMEM, mix gently, incubate for
113 5min at 37°C to dissolve collagenase and filter by using a 0.22 μm filter unit.

114 Digestion solution: Add 2mg collagenase type 2 and 1mg elastase to 2mL DMEM, mix gently,
115 dissolve it for 5 min at 37°C, and then filter by using a 0.22 μm filter unit.

116 Once prepared, storage of these products was made at 4°C for 24h.

117 Culture medium (DMEM + 20% (v/v) FBS + 1% (v/v) penicillin/streptomycin
118 solution+1%NEAA): Pour 400 ml DMEM into the top of a 0.22 mm filter unit, add 100 ml FBS,
119 5 ml penicillin/streptomycin solution and 5mL NEAA solution and filter. Culture medium can
120 be stored at 4°C for at least 1 month.

121

122 **Instruments**

123 24- and 48-well cell culture plates (Dutscher cat No 353047, Brumath, France)

124 Small sharp scissors, toothed forceps, straight and angled fine forceps, and microdissecting
125 scissors were purchased from Dutscher (Brumath, France).

126 To dissect the mouse aorta, a binocular microscope is required.

127

128 **Antibodies**

129 Rat anti-mouse antibody to CD31 (MEC13), a marker of endothelial cells, was a gift from Dr
130 A. Vecchi (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Milano, Italy) (Vecchi, Garlanda et
131 al. 1994, Bouillot, Rampon et al. 2006) and was used as undiluted hybridoma supernatant.
132 Monoclonal antibody to anti- α -smooth muscle actin, a marker of smooth muscle cells, clone
133 1A4 was from Sigma Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

134

135 **Mice**

136 2, 6 and 24 month-old wild-type C57B1/6J mice, as well as mice bearing a heterozygous
137 deletion of exon 1 in the elastin gene (Eln+/-) or hypomorphic mice in-frame deletion in
138 fibrillin-1 (Fbn1 +/mg Δ). Eln+/- and Fbn-1 +/mg Δ mice were backcrossed for more than five
139 generations into the C57B1/6J background (Pereira, Andrikopoulos et al. 1997, Faury, Usson
140 et al. 1998, Li, Faury et al. 1998, Sandra, Tienpont et al. 2001, Neptune, Frischmeyer et al.
141 2003, Pezet, Jacob et al. 2008).

142

143 **Methods**

144 **Culture of VSMCs from mouse artery**

145 The starting point of our procedure is a pre-existing protocol of culture of smooth muscle
146 cells from rats (Shoulders and Raines 2009). For this protocol, we changed different
147 conditions, according to adaptations appearing in several published articles describing
148 mouse VSMCs culture (adventitia elimination technique, digestion solution constitution and
149 time, solution to STOP the digestion step, centrifugation time and speed and coating
150 substrat) (Kobayashi, Inoue et al. 2005, Golovina and Blaustein 2006). After many
151 experimentations, one protocol proved to be the most operational (Table 1, 2, 3 and 4). We
152 then applied this protocol for different mouse genotype and age groups in order to verify
153 that this protocol is efficient in multiple conditions, i.e. for different mouse ages and
154 genotypes.

155 **Defined operational protocol**

- 156 1. Coat a well with 500µL for 2 hours of a 24-well cell culture plate with gelatin solution
157 at 37°C.
- 158 2. Anesthetize the mouse by intra-peritoneal injection of 0.25 ml of sodium
159 pentobarbital.
- 160 3. Immobilize the mouse under the binocular microscope.
- 161 4. Sterilise instruments with 70% ethanol.
- 162 5. Wipe the mouse skin with a 70% ethanol or another antiseptic, incise and remove
163 skin from the thorax and abdomen region with sharp scissors and toothed forceps.
164 After the skin is removed, sterilize again the instruments with 70% ethanol.
- 165 6. Open the thorax and abdomen with sharps scissors and toothed forceps, and wash
166 the aorta external surface with 1mL DPBS solution.
- 167 7. Remove intestines, stomach, pancreas, rate, lungs and heart and re-sterilize
168 instruments with 70% ethanol.

169

170 In the next steps, microdissecting scissors and straight and angled fine forceps should
171 be used.

- 172
- 173 8. Isolate the aorta from its cardiac origin to the iliac bifurcation. Leave it attached to
174 the backbone, wash its external surface with 5mL washing solution.
- 175 9. Remove adjacent tissues surrounding the artery, finely dissect the aorta and place it
176 in a 35 mm Petri Dish containing 2mL washing solution.
- 177 10. Predigest the entire aorta in 2mL pre-digestion solution in a 35mm Petri dish for
178 30minutes at 37°C. After this step, the external envelope of the extracted aorta, i.e.
179 the adventitia, becomes visibly altered and easily separable.
- 180 11. Transfer the artery in another 35mm Petri dish containing 2mL washing solution to
181 eliminate the pre-digestion solution.
- 182 12. In 3-4 different points on the length of the artery, make small incisions in the
183 adventitia layer with scissors. Then, with only two straight forceps, mechanically
184 remove the adventitia: hold the intima-media with the first forcep and then hold the
185 adventitia with the other forceps and gently remove it from the artery.

186 13. Cut the rest of the artery, i.e. the intima-media, into small pieces of approximately 1-
187 2 mm in length.

188

189 The next steps have to be performed under a sterile hood.

190

191 14. Transfer aorta pieces with a sterile Pasteur pipette in a conical 5ml polypropylene
192 tube containing 2mL digestion solution. Place the tube well closed for 40minutes in a
193 water bath set at 37°C.

194 15. Under the hood, using a sterile flame-polished glass Pasteur pipette, mechanically
195 dissociate the rest of tissue following digestion by gently triturating the solution for
196 10min in the same tube. Avoid the formation of air bubbles.

197 16. Transfer the cell suspension solution to a 15mL conical centrifugation tube, and add
198 3mL culture medium, then centrifuge at 600xg for 10minutes.

199 17. Discard the supernatant, then add 3mL washing solution to the cell pellet and re-
200 centrifuge at 600xg for another 10 minutes.

201 18. Discard the supernatant, resuspend cells in 150µL culture medium and place the cell
202 suspension in the gelatin-precoated well of the 24-well cell culture plate.

203 19. Allow 30 minutes for cell attachment in a standard culture incubator at 37°C, 5%CO₂.

204 20. Gently add 500µL culture medium to the well and leave the plate undisturbed for 3-4
205 days.

206 21. After 3-4 days, remove all culture medium, gently wash the well bottom with
207 washing solution, add 750 µL fresh medium , then replace the medium every 2 days.

208 22. 7-10 days after initial cell seeding, VSMCs reach confluence.

209

210 **Cell passage**

211 To passage cells after confluence, remove the culture medium from the culture well or dish,
212 wash 2 times for 10 minutes with DPBS (without Ca²⁺ and Mg²⁺), then add an adequate
213 volume of 0.25%trypsin-EDTA for 5minutes at 37°C. After this step, some cells are detached
214 from the plate surface while many other cells remain attached to the dish bottom although

215 they become round: flush up and down the medium several times to induce mechanical
216 detachment of the remaining attached cells. Then add the double volume of culture
217 medium, transfer the cell suspension to a centrifugation tube and spin 10 minutes at 600xg.
218 Remove the supernatant and resuspend cells in the adequate volume of culture medium,
219 then place them into an adequate culture well or dish pre-coated with gelatin. Cells can be
220 used between passage numbers 1 to 6-7.

221

222 **VSMC characterization - Immunofluorescence staining**

223 VSMCs were processed for immunofluorescence according to previously described
224 procedures (Golovina and Blaustein 2006). Briefly, cells in culture were washed 3 times with
225 PBS, then fixed with 4% paraformaldehyde for 10min, permeabilized by 4%
226 paraformaldehyde- 0.2% Triton X-100 for 5 min, blocked 30min in PBS/BSA2% solution, and
227 incubated for 1h with appropriate concentrations of primary antibodies (1/400 for anti- α -
228 smooth muscle actin antibody, 1/2 for anti-MEC13 antibody, 1/200 for anti-vimentin
229 antibody), washed 3 times for 5min with PBS/Tween 0.1% solution, incubated for 1h with
230 secondary antibodies (diluted at 1/500), and finally washed 3 times for 5min with
231 PBS/Tween0.1% and fixed. Stained cells were observed with a Axioplan epifluorescence
232 microscope (Zeiss, Iena, Germany).

233

234 **Intracellular free calcium ($[Ca^{2+}]_i$) in adhering VSMCs**

235 Measurements were performed by classical microscopy (CellR system, Olympus, Rungis,
236 France) using the calcium-sensitive fluorescent dye Fluo-3/AM (excitation: 488nm; emission:
237 >510 nm, purchased from Sigma-Aldrich, St Quentin-Fallavier, France), as previously
238 described (Mariko, Ghandour et al. 2010). Briefly, the cells were washed and bathed in a
239 physiological salt solution composed of: NaCl (125mmol/L); KCl (5.6mmol/L); $CaCl_2$
240 (2.4mmol/L); $MgCl_2$ (1.2mmol/L); D-glucose (11mmol/L); HEPES (10mmol/L); pH 7.4.
241 Phenylephrine and acetylcholine at $1\mu M$ final concentration were used to verify cell
242 functionality, as they are reference agents elevating $[Ca^{2+}]_i$ in smooth muscle cells. Image

243 analyses were performed by using the Image J software (NIH, USA). In the figures, each
244 tracing represents Fluo-3 fluorescence in one cell.

245

246 **General Notes**

- 247 1. Sterilised instruments are necessary to avoid contamination, mainly by intestinal
248 bacterias, of artery and harvested cells to be cultured.
- 249 2. Other culture techniques, separating the adventitia by scraping without chemical
250 pre-digestion step, were found to be ineffective (see Table 2 and 4 results). The
251 scraping step, avoiding strength on vessel, can damage arterial smooth muscle cells
252 and may results in less viable cells after extraction.
- 253 3. Different digestion solutions were used using different concentration of collagenase,
254 elastase, with or without adding Soybean trypsin inhibitor, FBS or
255 penicillin/streptomycin to the digestion solution, and different times of incubation
256 with digestion solution were tested. Many conditions led to less harvested VSMCs or
257 less healthy cells that could not adhere on cell surface. The protocol described here
258 describes the conditions allowing for collection of a maximum number of functional
259 VSMCs which can adhere after 3-4 days (see detailed results in Tables 1 and 2 and
260 Figure 1).
- 261 4. After enzymatic and mechanical digestion, small residues of tissues containing VSMCs
262 remain. During initial cell seeding, these residues are cultured together with
263 dissociated cells in 24-well cell plate, and cells attached to these residues can migrate
264 during 3-4 days and adhere on cell surface well. This increases the yield of the
265 procedure.
- 266 5. Different types of coatings were tested: fibronectin, FBS, matrigel, collagen I,
267 collagen IV, collagen V, gelatin and no coating. Collagen IV and gelatin showed the
268 maximum number of adhering cells and allowed the cells to more rapidly reach
269 confluence (see detailed results in Table 1).
- 270 6. Our protocol allowed cells to reach confluence within 10 days whatever the age of
271 the mice used, 1 week-old to 24 month-old (Table 3).

272 7. Application of our protocole to mice with different genotypes (Eln+/- and Fib-1
273 +/mgΔ) also led to VSMC cultures which reached confluence after 7-10 days (Table
274 3).

275

276 **Results**

277 **Number of harvested VSMCs**

278 By using our protocol, we collected from one mouse aorta in the range of 100 viable cells
279 (adhering cells). This is several times more than the number allowed by the use of other
280 protocols (Fig. 1 and Tables 1-3) (Protocol C corresponds to our new method described in the
281 present article).

282

283 **VSMCs characterization**

284 In order to verify that the cell cultures are only constituted of VSMCs and are not
285 contaminated by fibroblasts or endothelial cells from different tunicas of the vessel,
286 immunofluorescence staining with anti- α smooth muscle actin was used and all the
287 examined cells reacted with this antibody specific to smooth muscle cells. This showed that
288 the cells obtained were VSMCs. In addition, labelling with anti-CD31 antibody -an antibody
289 specific to endothelial cell- and anti-vimentin antibody -which can react with fibroblasts-,
290 revealed no labelled cells, confirming that our cell culture is quasi-exclusively composed of
291 VSMCs (Figure 2).

292

293 **VSMCs reactivity**

294 In VSMCs extracted with our new operational culture protocol, adding phenylephrine or
295 acetylcholine produced normal transient elevations of the intracellular calcium level,
296 reaching 3.1- and 1.8-fold the initial level, respectively (Figure 3A, B). The fact that the
297 VSMCs react appropriately to these 2 neurotransmitters indicates that these cells are

298 functional. Moreover, it has to be noted that VSMCs extracted from other culture protocols
299 reacted similarly to those extracted with the defined culture protocol (Figure 3C, D), in
300 accordance with previous results (Golovina and Blaustein 2006).

301

302 **Discussion**

303 There are different approaches to extract vascular smooth muscle cells (VSMCs) from an
304 artery (Kobayashi, Inoue et al. 2005, Golovina and Blaustein 2006, Okuyama 2008). The
305 common steps among these protocols are to dissect the mouse, extract the artery, and
306 separate the adventitia -rich in fibroblasts- from the other tunics of the vessel, i.e. the
307 intima and media in which the VSMCs are located. In order to remove the adventitia, two
308 methods are frequently used: i) simple mechanical separation using scrapers: in this method,
309 the artery is held with a first scraper and the ensemble intima-media is pushed away with
310 another scraper, so that the adventitia is discarded (Ray, Leach et al. 2001, Chen, Chiang et
311 al. 2004, Brodsky and Persikov 2005, Payne, Fogelgren et al. 2005), and ii) to limit damaging
312 of smooth muscle cells during scratching of the adventitia, vessel enzymatic digestion with
313 collagenase preceding the mechanical separation of the adventitia (Golovina and Blaustein
314 2006), which was preferred and used here as a basis for our experiments. In order to limit
315 endothelial contamination of the culture, some protocols additionally extract the intima with
316 cotton rubbing of the endothelium, after exposition of the endothelium by longitudinal
317 section of the artery (Golovina and Blaustein 2006). However, this step is probably not
318 necessary since it can damage some VSMCs, and endothelial cells are limited in number and
319 fragile, so they can easily be eliminated with the digestion step and culture conditions. Once
320 the adventitia removed, two approaches then allow for culture of VSMCs collected from the
321 artery residue. The first one consists in the preparation of culture explants (Brodsky and
322 Persikov 2005) by incubation of the artery residue on a pre-coated culture surface and
323 waiting for VSMC migration onto the culture dish bottom. However, this technique is not
324 optimal for VSMCs because of the abundance of the extracellular matrix inhibiting this
325 migration. The second approach -the most common- consists in an enzymatic digestion of
326 the arterial tissue to degrade the extracellular matrix and release the cells from the
327 surrounding tissue (Golovina and Blaustein 2006). The enzymatic digestion phase is the

328 critical step in this approach. If it does not work properly, due to non-functional enzymes or
329 a lack of digestion time, extracellular matrix cannot be degraded. On the other hand, if the
330 enzymes used are too active or if digestion lasts for too long, the VSMCs liberated from their
331 surrounding extracellular matrix can be damaged by the action of the enzymes. This is why
332 we evaluated the efficiency of different digestion solutions with different times of
333 incubation, to establish the most suitable conditions. We showed that if digestion is
334 performed in a relatively short time with higher concentration of enzymes, extracellular
335 matrix can be degraded enough. At this moment, enzyme digestion can be stopped in order
336 not to avoid damage cells, and the VSMC release procedure can then be continued by a
337 mechanical treatment allowing for final cell separation from the extracellular matrix. Even if
338 residues persist, they can be deposited on cell culture surface without any alteration in order
339 to allow for VSMC migration during the incubation time on the cell culture surface.

340 The protocol described here presents several advantages. First, it makes it possible to get a
341 VSMC culture from a single mouse artery, this being applicable for young, aged -in which
342 VSMCs proliferation rate is decreased- or even genetically-modified mice. Another interest
343 of the present protocol is that cell extraction takes less time: in 3 hours, VSMCs can be
344 extracted and seeded on culture surfaces. Also, this method permits to obtain much higher
345 numbers of viable cells, compared to the other protocols, and also allows cultured cells to
346 reach confluence faster.

347

348 **References**

349 Birk, R. Z., E. Burstein and A. Wiznitzer (2005). "Placental angiopoietin-1 and angiopoietin-2
350 expression and correlation with birth weight in twins." J Matern Fetal Neonatal Med **17**(5): 337-342.

351 Bouillot, S., C. Rampon, E. Tillet and P. Huber (2006). "Tracing the glycogen cells with protocadherin
352 12 during mouse placenta development." Placenta **27**(8): 882-888.

353 Brodsky, B. and A. V. Persikov (2005). "Molecular structure of the collagen triple helix." Adv Protein
354 Chem **70**: 301-339.

355 Cairrao, E., A. J. Santos-Silva, E. Alvarez, I. Correia and I. Verde (2009). "Isolation and culture of
356 human umbilical artery smooth muscle cells expressing functional calcium channels." In Vitro Cell
357 Dev Biol Anim **45**(3-4): 175-184.

358 Chen, Y. M., W. C. Chiang, S. L. Lin, K. D. Wu, T. J. Tsai and B. S. Hsieh (2004). "Dual regulation of
359 tumor necrosis factor-alpha-induced CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 expression in
360 vascular smooth muscle cells by nuclear factor-kappaB and activator protein-1: modulation by type III
361 phosphodiesterase inhibition." J Pharmacol Exp Ther **309**(3): 978-986.

362 Faury, G., Y. Usson, M. Robert-Nicoud, L. Robert and J. Verdetti (1998). "Nuclear and cytoplasmic free
363 calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S
364 A **95**(6): 2967-2972.

365 Fox, S. I. (1994). "Human Physiology." Wm. C. Brown Publishers,, Dubuque, Iowa **4**.

366 Frederic H. Martini , J. L. N., Edwin F. Bartholomew (2004). "Fundamentals of Anatomy and
367 Physiology."

368 Golovina, V. A. and M. P. Blaustein (2006). "Preparation of primary cultured mesenteric artery
369 smooth muscle cells for fluorescent imaging and physiological studies." Nat Protoc **1**(6): 2681-2687.

370 Guo, Z., H. Van Remmen, H. Yang, X. Chen, J. Mele, J. Vijg, C. J. Epstein, Y. S. Ho and A. Richardson
371 (2001). "Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and
372 oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(7): 1131-
373 1138.

374 Halayko, A. J. and J. Solway (2001). "Molecular mechanisms of phenotypic plasticity in smooth
375 muscle cells." J Appl Physiol **90**(1): 358-368.

376 Kobayashi, M., K. Inoue, E. Warabi, T. Minami and T. Kodama (2005). "A simple method of isolating
377 mouse aortic endothelial cells." J Atheroscler Thromb **12**(3): 138-142.

378 Li, D. Y., G. Faury, D. G. Taylor, E. C. Davis, W. A. Boyle, R. P. Mecham, P. Stenzel, B. Boak and M. T.
379 Keating (1998). "Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin." J Clin Invest
380 **102**(10): 1783-1787.

381 Mariko, B., Z. Ghandour, S. Raveaud, M. Quentin, Y. Usson, J. Verdetti, P. Huber, C. Kielty and G.
382 Faury (2010). "Microfibrils and fibrillin-1 induce integrin-mediated signaling, proliferation and
383 migration in human endothelial cells." Am J Physiol Cell Physiol **299**(5): C977-987.

384 Moyer, C. F. and C. L. Reinisch (1984). "The role of vascular smooth muscle cells in experimental
385 autoimmune vasculitis. I. The initiation of delayed type hypersensitivity angiitis." Am J Pathol **117**(3):
386 380-390.

387 Neptune, E. R., P. A. Frischmeyer, D. E. Arking, L. Myers, T. E. Bunton, B. Gayraud, F. Ramirez, L. Y.
388 Sakai and H. C. Dietz (2003). "Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in
389 Marfan syndrome." Nat Genet **33**(3): 407-411.

390 Okuyama, K. (2008). "Revisiting the molecular structure of collagen." Connect Tissue Res **49**(5): 299-
391 310.

392 Pereira, L., K. Andrikopoulos, J. Tian, S. Y. Lee, D. R. Keene, R. Ono, D. P. Reinhardt, L. Y. Sakai, N. J.
393 Biery, T. Bunton, H. C. Dietz and F. Ramirez (1997). "Targetting of the gene encoding fibrillin-1
394 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome." Nat Genet **17**(2): 218-222.

395 Pezet, M., M. P. Jacob, B. Escoubet, D. Gheduzzi, E. Tillet, P. Perret, P. Huber, D. Quagliano, R. Vranckx,
396 D. Y. Li, B. Starcher, W. A. Boyle, R. P. Mecham and G. Faury (2008). "Elastin haploinsufficiency
397 induces alternative aging processes in the aorta." Rejuvenation Res **11**(1): 97-112.

398 Raines, E. W. (2000). "The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and
399 survival: relationships to vascular disease." Int J Exp Pathol **81**(3): 173-182.
400 Ray, J. L., R. Leach, J. M. Herbert and M. Benson (2001). "Isolation of vascular smooth muscle cells
401 from a single murine aorta." Methods Cell Sci **23**(4): 185-188.
402 Sandra, P., B. Tienpont, J. Vercaemmen, A. Tredoux, T. Sandra and F. David (2001). "Stir bar sorptive
403 extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine." J Chromatogr A **928**(1):
404 117-126.
405 Shoulders, M. D. and R. T. Raines (2009). "Collagen structure and stability." Annu Rev Biochem **78**:
406 929-958.
407 Thomas, G. D. and S. S. Segal (2004). "Neural control of muscle blood flow during exercise." J Appl
408 Physiol **97**(2): 731-738.
409 Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in
410 hypertension." Histochem Cell Biol **122**(4): 339-352.
411 Vecchi, A., C. Garlanda, M. G. Lampugnani, M. Resnati, C. Matteucci, A. Stoppacciaro, H. Schnurch, W.
412 Risau, L. Ruco, A. Mantovani and et al. (1994). "Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of
413 mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium."
414 Eur J Cell Biol **63**(2): 247-254.
415 Wang, D. G., Z. Y. Liu, Y. S. Bi, S. Z. Sun, L. Shi, X. Wang and X. H. Zhang (2007). "Culture of smooth
416 muscle cells from guinea pig mesenteric lymphatic vessels." Lymphology **40**(1): 14-18.
417 Xu, S., J. Fu, J. Chen, P. Xiao, T. Lan, K. Le, F. Cheng, L. He, X. Shen, H. Huang and P. Liu (2009).
418 "Development of an optimized protocol for primary culture of smooth muscle cells from rat thoracic
419 aortas." Cytotechnology **61**(1-2): 65-72.

420

421

422 **Figure and Tables legends**

423 **Table 1:** First series of assays applied to determine the operational protocol to culture of
424 VSMCs from mouse aorta. The effect of the modification of the following parameters were
425 studied: incubation time with digestion solution and its composition, STOP solution used to
426 finish digestion step, centrifugation speed and time after digestion step, and coating applied
427 to cell culture surface. For all these experiences, 2 mice from the group 5-7 month-old wild-
428 type C57B1/6J mice were used per culture. Adventitia was eliminated by scraping and cells
429 were seeded in 24-well cell culture. STI= Soybean Trypsin Inhibitor purchased from
430 Invitrogen (Saint Aubin, France); FBS= Foetal bovin serum; BSA= Bovine serum albumin;
431 d=days. In each condition, the total numbers of extracted cells were counted (using Thomas
432 lame) after centrifugation and before first seeding, then numbers of remaining adherent
433 cells per well 3 days after seeding were counted by direct microscope observation and time
434 to reach confluence was monitored. These series of experiments permitted to determine the
435 adequate values of the studied parameters. For each experiment, n=3-5 different VSMCs
436 extraction.

437

438 **Table 2:** Second series of assays applied to determine the operational protocol to culture of
439 VSMCs from mouse aorta. The effect of the modification of the following parameters were
440 studied: number of mice used, endothelium and adventitia elimination techniques,
441 incubation time with digestion solution and its composition, cell culture surface and type of
442 applied coating. For all these experiences, 5-7 month-old wild-type C57B1/6J mice were used
443 per culture. To stop the enzymatic digestion, culture medium was added, and the final
444 solution was centrifuged for 10 min at 600xg. STI= Soybean Trypsin Inhibitor purchased from
445 Invitrogen (Saint Aubin, France); FBS= Foetal bovin serum, BSA= Bovine serum albumin. In
446 each condition, the total numbers of extracted cells were counted (using Thomas lame) after
447 centrifugation and before first seeding, then numbers of remaining adherent cells per well 3
448 days after seeding were counted by direct microscope observation and time to reach
449 confluence was monitored. These series of experiments permitted to determine the
450 adequate values of the studied parameters. For each experiment, n=3-5 different VSMCs
451 extraction.

452

453 **Table 3:** Results obtained after application of our operational protocol to different
454 genotypes, age groups of mice. In each condition, the total numbers of extracted cells were
455 counted (using Thomas lame) after centrifugation and before first seeding, then numbers of
456 remaining adherent cells per well 3 days after seeding were counted by direct microscope
457 observation and time to reach confluence was monitored. For each experiment, n=3-5
458 different VSMCs extraction.

459

460 **Table 4:** Results obtained after application of published protocols and our operational
461 protocol to culture VSMCs from 2 mouse aortas. In each condition, the total numbers of
462 extracted cells were counted (using Thomas lame) after centrifugation and before first
463 seeding, then numbers of remaining adherent cells per well 3 days after seeding were
464 counted by direct microscope observation and time to reach confluence was monitored. For
465 each experiment, n=3-5 different VSMCs extraction.

466

467 **Figure 1:** Images of VSMCs taken 2h, 3days and 21 days after seeding in cell culture surface
468 (A). Conditions A, B and C are described in details in the associated table (B). Condition A and
469 B correspond to alternative protocols assayed in Table 2. Condition C corresponds to our
470 new protocol.

471

472 **Figure 2:** Fluorescence of VSMCs extracted from conditions A, B and C (described in details
473 in the associated table of Figure 1). Cells are labelled with the smooth muscle α -actin
474 antibody (Green). Labelling with CD31 (revealing endothelial cells) and with vimentin
475 (revealing fibroblasts) showed no fluorescence in slides (results not shown).

476

477 **Figure 3:** Reactivity to phenylephrine (PE) and achetylcholine (Ach) of VSMCs extracted
478 following our new protocol - condition C (A,B) and a pre-existing protocol -condition B (C,D)
479 (protocols detailed in the associated table of figure 1). Representative experiments are
480 presented. In each case, n=30-40 cells from at least 3 different cell cultures.

Time of centrifugation	Speed centrifugation	Digestion solution	Incubation time with digestion solution	Coating	STOP solution	Number of cells after centrifugation and before first seeding	Number of adherent cells 3 days after VSMCs extraction	Time to reach confluence
5min	180 g	1.24 mg/ml collagenase type 2 + 0,117 mg/ml Elastase	1h	No coating	culture medium + 100mM EGTA	5-10	0-3	
5min	180 g	1.24 mg/ml collagenase type 2 + 0,117 mg/ml Elastase	1h30min	No coating	culture medium + 100mM EGTA	5-10	0-3	
5min	180g	1.24 mg/ml collagenase type 2 + 0,117 mg/ml Elastase	3h	No coating	culture medium + 100mM EGTA	5-10	0-3	
10min	180 g	1.24 mg/ml collagenase type 2 + 0,117 mg/ml Elastase	1h	No coating	culture medium + 100mM EGTA	5-10	0-3	
10min	250g	1.24 mg/ml collagenase type 2 + 0,117 mg/ml Elastase	1h	No coating	culture medium + 100mM EGTA	30-40	3-7	35d
10min	600g	1.24 mg/ml collagenase type 2 + 0,117 mg/ml Elastase	1h	No coating	culture medium + 100mM EGTA	30-50	5-10	30d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 10%SVF	1h30min	No coating	culture medium + 100mM EGTA	30-50	5-10	21 d

481

482 Table 1 part 1

10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 10%SVF	1h30min	7.5µg/mL Fibronectin	culture medium + 100mM EGTA	30-50	5-10	21 d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 10%SVF	1h30min	50µg/mL Collagen VI	culture medium + 100mM EGTA	30-50	5-10	21 d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 10%SVF	1h30min	FBS	culture medium + 100mM EGTA	30-50	5-10	21 d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 10%SVF	1h30min	5mg/mL Matrigel	culture medium + 100mM EGTA	30-50	5-10	21 d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 10%SVF	1h30min	50µg/mL Collagen I	culture medium + 100mM EGTA	30-50	5-10	15d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 10%SVF	1h30min	0.1% Gelatin	culture medium + 100mM EGTA	30-50	5-10	15d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 2mg/mL BSA	1h30min	50µg/mL Collagen I	culture medium + 100mM EGTA	30-50	10-15	15d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 2mg/mL BSA	1h30min	0.1% Gelatin	culture medium + 100mM EGTA	30-50	10-15	15d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 2mg/mL BSA	1h30min	50µg/mL Collagen I	culture medium	80-100	30-40	13d
10min	600g	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 2mg/mL BSA	1h30min	0.1% Gelatin	culture medium	80-100	30-40	13d

483

484 Table 1 part 2

485

Endothelium elimination	Adventitia elimination	Digestion solution	Incubation time with digestion solution	Cell culture surface	Number of mice (aortas) used per culture	Coating	Number of cells after centrifugation and before first seeding	Number of adherent cells 3 days after VSMCs extraction	Time to reach confluence
YES	scraping	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 2mg/mL BSA	1h30min	24-well	2	50µg/mL Collagen I	80-100	30-40	13d
YES	scraping	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 2mg/mL BSA	1h30min	24-well	2	0.1% Gelatin	80-100	30-40	13d
NO	scraping	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 2mg/mL BSA	1h30min	24-well	2	50µg/mL Collagen I	150-200	45-60	10d
NO	scraping	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 2mg/mL BSA	1h30min	24-well	2	0.1% Gelatin	150-200	45-60	10d

486

487 Table 2 part 1

NO	scraping	1.36mg/mL collagenase type 2	4h	24-well	2	50µg/mL Collagen I	150-200	45-60	10d
NO	scraping	1.36mg/mL collagenase type 2	4h	24-well	2	0.1% Gelatin	150-200	45-60	10d
NO	Predigestion with 1mg/mL collagenase type 2	1mg/mL collagenase type 2 + 0.5 mg/mL elastase	40min	24-well	2	50µg/mL Collagen I	250-300	80-100	7 d
NO	Predigestion 1mg/mL collagenase type 2	1mg/mL collagenase type 2 + 0.5 mg/mL elastase	40min	24-well	2	0.1% Gelatin	250-300	80-100	5 d
NO	Predigestion with 1mg/mL collagenase type 2	1mg/mL collagenase type 2 + 0.5 mg/mL elastase	40min	48-well	2	0.1% Gelatin	250-300	80-100	5 d
NO	Predigestion with 1mg/mL collagenase type 2	1mg/mL collagenase type 2 + 0.5 mg/mL elastase	40min	24-well	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	7d

488

489 Table 2 part 2

Mice genotype	Age mice	Number of mice (aortas) used per culture	Coating	Number of cells after centrifugation and before first seeding	Number of adherent cells 3 days after VSMCs extraction	Time to reach confluence
ELN+/-	1-2 months	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	7d
Fbn+/mgΔ	1-2 months	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	10d
C57B1/6J	1-2 months	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	7 d
ELN+/-	5-7 months	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	7d
Fbn+/mgΔ	5-7 months	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	10d
C57B1/6J	5-7 months	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	7 d
ELN+/-	23-27 months	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	10d
Fbn+/mgΔ	23-27 months	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	10d
C57B1/6J	23-27 months	1	0.1% Gelatin	150-200	70-80	10d

490

491 Table 3

492

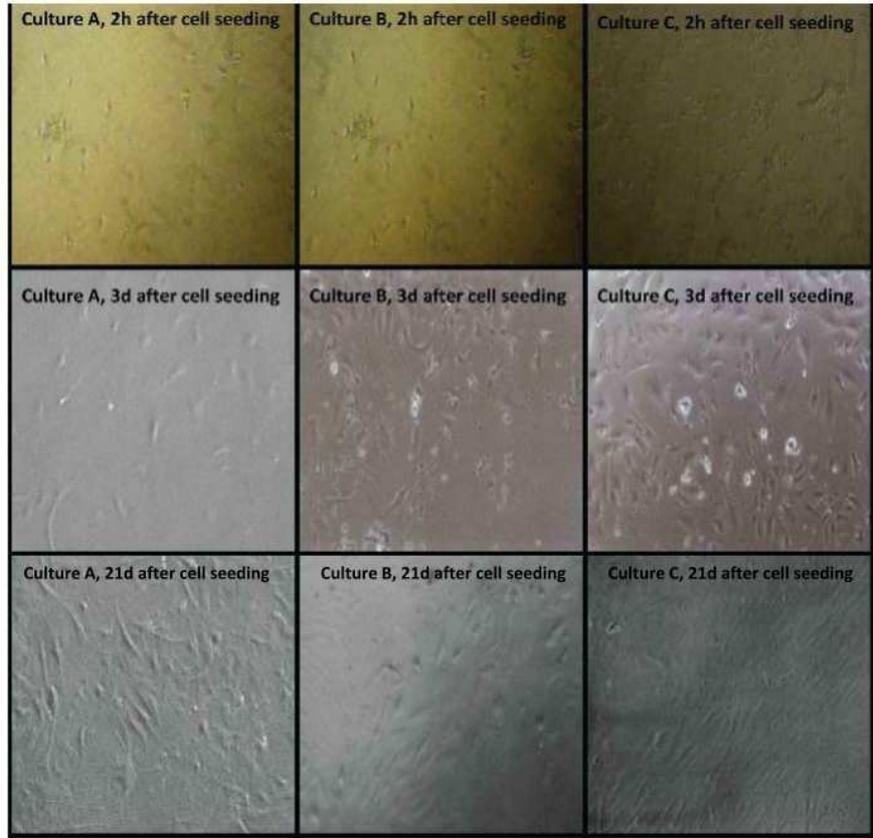
493

Reference of Protocol used	Mice genotype	Age mice	Number of mice (aortas) used per culture	Number of cells after centrifugation and before first seeding	Number of adherent cells 3 days after VSMCs extraction	Time to reach confluence
Kobayashi, Inoue et al. 2005	C57B1/6J	5-7 months	2	70-90	20-40	15d
Ray, Leach et al. 2001	C57B1/6J	5-7 months	2	90-120	30-45	12d
Golovina and Blaustein 2006	C57B1/6J	5-7 months	2	100-150	50-60	10d
<i>Our operationnel Protocol</i>	C57B1/6J	5-7 months	2	250-300	80-100	5 d

494

495 Table 4

496



497

498 A

Condition	Adventitia elimination	Digestion solution	Incubation time with digestion solution	Number of mice used per culture	Coating	Number of cells after centrifugation	Number of adherent cells 3 days after VSMCs extraction	Time to reach confluence
A	scraping	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 10%SVF	1h30min	2	No coating	<50	<10	21 d
B	scraping	1.25 mg/mL collagenase type 2 + 0.125mg/mL Elastase + 0.25mg/mL STI + 15mM HEPES + 10%SVF	1h30min	2	0.1% Gelatin	<50	<10	15d
C	Predigestion with 1mg/mL collagenase type 2	1mg/mL collagenase type 2 + 0.5 mg/mL elastase	40min	1	0.1% Gelatin	<300	<100	7d

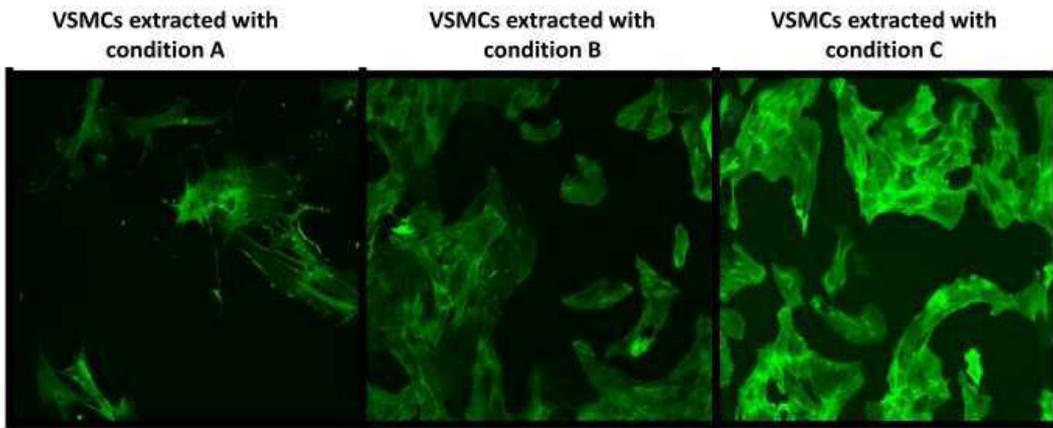
499

500 B

501

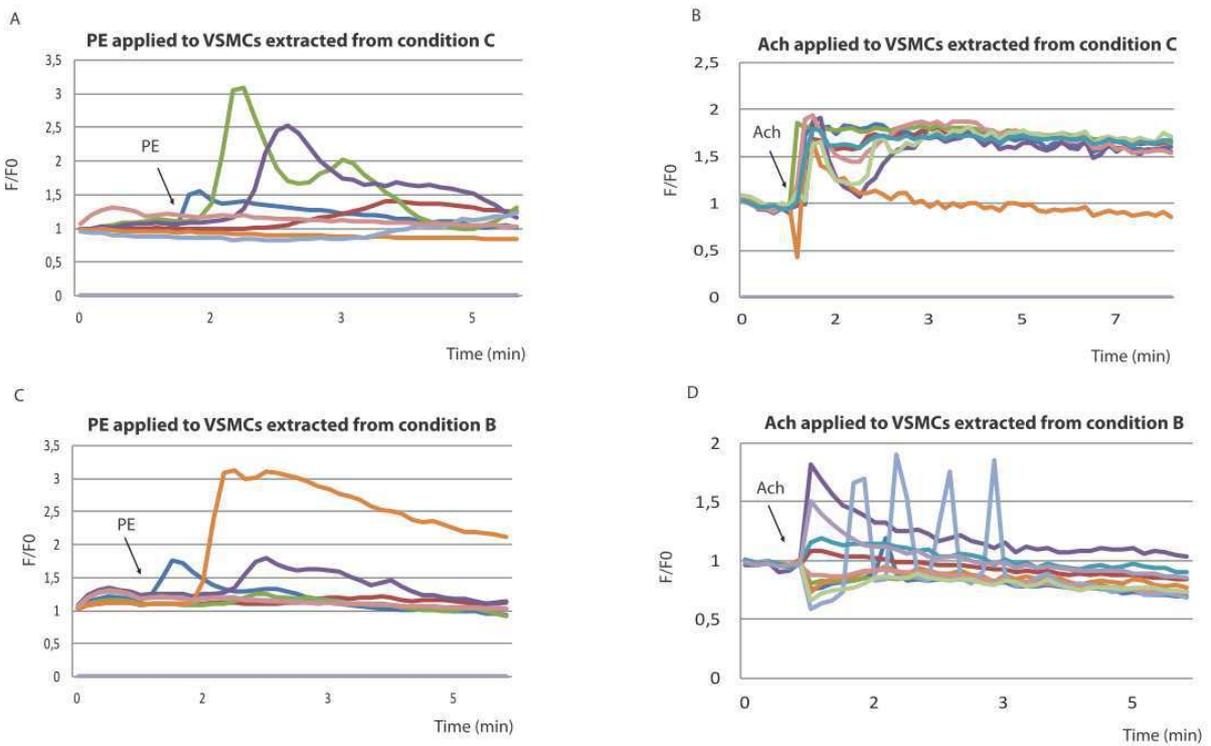
502 Figure 1

503



504
505
506
507
508
509
510

Figure 2



511
512
513

Figure 3

2.3.3 *Discussion de l'article 3 :*

Nous avons pu établir avec les différents essais pratiqués un protocole de culture de CMLV. Ce protocole repose sur plusieurs étapes clefs qui semblent des plus importantes. La souris est disséquée, l'aorte abdominale et thoracique est extraite et nettoyée, passée dans une solution de lavage permettant de la décontaminer. Elle est ensuite passée sous une solution de collagénase, une pré-digestion visant à faciliter la séparation mécanique de l'adventice par les pinces, séparation plus douce de l'adventice qui permet de conserver mieux les CMLV de la média en état. De plus, durant cette pré-digestion, les cellules endothéliales de l'intima, qui sont exposées aussi à l'action de la collagénase, perdent de leur vitalité. Le reste de l'aorte, composé essentiellement de la média et du reste de l'intima, est digéré par la collagénase et de l'élastase, ce qui dégrade les fibres élastiques et les fibres de collagène, les composants majeurs de la matrice entourant les CMLV et qui permettent de soutenir dans l'état les CMLV. Il s'en suit une libération facilitée des CMLV, les CMLV périphériques passent facilement en solution alors que celles qui sont plus profondes arrivent plus difficilement à se libérer de la matrice sous-jacente. L'action mécanique d'aspiration-refoulement leur permet alors de se libérer de cette matrice, et les CMLV en solution sont centrifugées à une vitesse optimale, permettant ainsi la récupération du maximum de cellules fonctionnelles. Ces cellules mises en suspension dans le milieu de culture adéquat sontensemencées dans le puits de culture pré-coaté à la gélatine et laissées adhérer plusieurs jours sans aucune agitation, étape nécessaire pour garantir l'adhésion du plus grand nombre de CMLV.

Parmi tous les protocoles de culture de CMLV de souris testés, le protocole décrit dans cet article était celui qui offrait la meilleure répétabilité et le meilleur rendement de production de cellules. A partir d'une seule aorte de souris, des centaines de cellules adhèrent dès le premier ensemencement et ces cellules présentent un très bon taux de prolifération, qui leur permet d'arriver à confluence sous 7-10 jours. Les CMLV obtenues peuvent subir 6-7 passages en conservant un bon taux de prolifération, de même qu'une morphologie et une fonctionnalité normales. Par ailleurs, il est important de noter que les CMLV issues de souris de différents âges -y compris les souris âgées- et des différents génotypes étudiées possèdent toutes ces capacités.

La mise en place d'un tel protocole est une étape essentielle facilitant les études sur les CMLV de souris. Malgré l'important laps de temps qui a été nécessaire pour mettre au point ce protocole, cette étape était essentielle avant de démarrer de manière systématique les différents tests sur les CMLV. Ce protocole apporte une nouvelle fiabilité et un rendement important pour la mise en culture des CMLV de souris dans les laboratoires de recherche, ce qui était une problématique importante et ancienne (Payne, Fogelgren et al. 2005).

Le seul inconvénient du protocole de production de CMLV de souris que nous avons obtenu est que, à la différence des CMLV obtenues chez le rat, celui-ci ne permet pas la conservation des CMLV de souris par congélation. Une fois décongelées, les CMLV

n'arrivent plus à adhérer et à proliférer en culture. Bien que ceci ne soit pas un problème majeur, la congélation cellulaire permettrait le stockage sur de longues durées et une reprise très rapide des études lorsque nécessaire. En particulier dans le cas des souris rares ou chères -comme les souris âgées ou les souris modifiées génétiquement- il serait important de savoir si cette problématique est en relation avec les propriétés de ces cellules ou bien avec le protocole étudié. Dans le cas d'un défaut de protocole, au cours de travaux ultérieurs, il serait important de mettre au point une technique de congélation adaptée à ce protocole.

2.4 Etudes sur cultures de CMLV : effet des composants des fibres élastiques sur la signalisation calcique des CMLV, effet du vieillissement et de la déficience en élastine et en fibrilline-1

De nombreuses études ont montré que les composants des fibres élastiques, l'élastine et les microfibrilles, ont de multiples actions sur les fonctions de nombreux types cellulaires (Iozzo and San Antonio 2001, Hornebeck, Robinet et al. 2005, Ho, Bose et al. 2008, Zitka, Kukacka et al. 2010, Midwood, Hussenet et al. 2011, Fulop, Khalil et al. 2012, Siefert and Sarkar 2012) En particulier, l'action des composants des fibres élastiques est importante sur les fonctions des cellules vasculaires, endothéliales et musculaires lisses vasculaires. Certains de ces composants –comme l'élastine et la fibrilline-1- sont impliqués dans des modifications des fonctions de migration, de prolifération, d'adhésion et de synthèse et de dégradation de la matrice extracellulaire (Li, Faury et al. 1998, Ho, Bose et al. 2008, Zitka, Kukacka et al. 2010). En particulier, des études réalisées sur des cellules musculaires lisses vasculaires ont montré que les peptides d'élastine activent des flux ioniques, modifient la prolifération, diminuent la migration, diminuent la synthèse de l'élastine, modifient multiples médiateurs de signalisation intracellulaire et réagissent directement avec les fibres élastiques pour modifier l'extensibilité de l'aorte de rat (Fox 1994, Ito, Ishimaru et al. 1997, Arribas, Hinek et al. 2006, Majesky, Dong et al. 2011). Cependant, mis à part la signalisation de certaines séquences de l'élastine (Olszynski and Zimowska 2009), les CMLV semblaient jusqu'alors peu impliquées par interaction directe dans la réaction vasomotrice aux fibres élastiques. Cependant, aucune étude menée sur les CMLV n'avait étudié l'effet des microfibrilles, qui pourraient probablement agir de la même façon ou bien au moins jouer sur une de ces fonctions. Dans ces travaux de thèse, il a été montré que les CMLV présentent aussi une réponse vasomotrice au fragment PF14 de la fibrilline-1. Cette action est sans doute médiée par la signalisation intracellulaire calcique survenant lors de la stimulation de ces cellules par PF14, réponse qui apparaît aussi, sans toutefois déclencher une réponse motrice notable des CMLV, lorsque ces cellules sont stimulées par la rTE et les MF.

La voie de signalisation calcique est une étape clé, au carrefour de signalisation de nombreux phénomènes comme la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire (Berridge, Lipp et al. 2000). Dans les cellules musculaires lisses, la signalisation calcique est fortement impliquée dans 2 fonctions. Premièrement, elle est impliquée dans le mécanisme de contraction et de relâchement musculaire permettant la vasomotricité (Voir Figure 6 page 24). Dans les artères de moyen et petit calibres surtout, ce mécanisme est essentiel dans la régulation du diamètre du vaisseau (Puetz, Lubomirov et al. 2009). Deuxièmement, la signalisation calcique est aussi importante dans la transduction des signaux de fonctions intracellulaires traditionnels, tels que la synthèse de la matrice extracellulaire, une importante fonction des cellules musculaires lisses dans les artères, ou encore la survie, la prolifération et la migration dont la dérégulation peut aboutir au remodelage artériel pathologique (Munoz, Vandenbulcke

et al. 2004). L'importance de ces fonctions est mise en évidence dans le cas du vieillissement naturel et de pathologies artérielles telles le syndrome de Williams-Beuren (WBS) et le syndrome de Marfan (MS). Dans le cas du vieillissement naturel et du WBS, un important remodelage vasculaire est observé, avec une synthèse matricielle accrue (Dridi, Foucault Bertaud et al. 2005) alors que, dans le cas du MS, on observe une mort cellulaire par apoptose, une dégradation matricielle accrue et une accumulation du collagène fibrillaire (Vitarelli, Conde et al. 2006). Les cellules vasculaires les plus touchées par ces pathologies sont les cellules musculaires lisses, étant les cellules les plus abondantes du vaisseau (Campbell and Campbell 1990). Les mécanismes intracellulaires impliqués dans la modification des fonctions des cellules musculaires lisses dans ces pathologies sont jusqu'alors inconnus. Ils devraient impliquer des modifications dans les voies de signalisation, dont probablement la voie de signalisation calcique. Une des questions posées serait de mieux connaître l'évolution de l'action des composants des fibres élastiques sur la signalisation calcique des CMLV de souris au cours du vieillissement et dans les pathologies vasculaires touchant les fibres élastiques elles-mêmes, comme le WBS et le MS ?

Pour répondre à cette question, des CMLV ont été isolées à partir de souris et traitées avec des composants des fibres élastiques (KE, rTE, MF et PF14). Les animaux utilisés pour étudier l'implication du vieillissement étaient des souris C57Bl6, âgées de 1-2, 6-8, 12-15 et 22-24 mois. Pour étudier l'effet des pathologies, des modèles murins du WBS et du MS ont été utilisés. Ce sont des souris sur fond génétique C57Bl6 hétérozygotes pour le gène de l'élastine (ELN +/-) (Faury, Usson et al. 1998, Li, Faury et al. 1998, Pezet, Jacob et al. 2008) ou la fibrilline-1 (Fbn-1 +/-mg Δ) (Pereira, Andrikopoulos et al. 1997, Sandra, Tienpont et al. 2001, Neptune, Frischmeyer et al. 2003). Les études menées antérieurement ont montré que ces modèles de souris sont des modèles du WBS pour les ELN +/- et du MS pour les Fbn-1 +/-mg Δ . Chez ces souris, les CMLV ont été isolées à partir de l'aorte thoracique et abdominale comme décrit dans l'article 3 de cette thèse. Les cellules utilisées pour le test sont issues du deuxième et troisième passage. Comme décrit dans la partie « materials and methods » de l'article 2 de cette thèse, ces cellules sont incubées avec du Fluo-3 puis observées sous microscope de fluorescence. Les cellules, 6 heures après leur passage sur un fond en verre, sont incubées 45min avec 2,5 μ M de Fluo-3 dans du liquide de Tyrode (125 mM NaCl; 5,6mM KCl; 2,4mM CaCl₂; 1,2mM MgCl₂; 11mM D-glucose; 10mM HEPES à pH 7.4). Après incubation, les cellules sont lavées 20min avec du tyrode puis visualisées sous microscope à fluorescence où les cellules sont traitées avec les molécules de rTE, KE, MF ou PF14, avant d'observer la réponse calcique des CMLV à ces molécules pendant 6-8 min. Les cellules sont ensuite stimulées avec 10⁻⁶M d'acétylcholine (Ach) pour tester leur fonctionnalité. La sonde Fluo-3 fluoresce à la suite de la fixation du calcium, les variations de niveau de fluorescence observées reflètent les variations de niveau de calcium intracellulaire. Les images sont ensuite traitées sous ImageJ (NIH, USA) et les graphes de variations de niveau de calcium en fonction du niveau de départ (F/F₀) sont établis.

La rTE, la kE, les MF et PF14 sont utilisées aux doses décrites dans l'article 2 de cette thèse sur les cellules endothéliales, soit 1µg/mL pour la rTE et la kE, 0.5µg/mL pour les MF et 10µg/mL pour PF14.

Effet de la rTE, kE, MF et PF14 sur la signalisation calcique des cellules musculaires lisses vasculaires.

Les actions de la rTE, de la kE, des MF et de PF14 ont tout d'abord été étudiées sur des CMLV de souris C57Bl/6 adultes âgées de 6-8 mois.

Sous l'effet de la rTE (Figure 31A), les CMLV présentent une montée progressive de calcium pour une moyenne de 6 cellules sur 10 pendant une durée moyenne de 7-8 min, avec un maximum observé après 4 min pour certaines cellules, alors que le niveau de calcium d'autres cellules plafonne un certain temps au maximum avant de redescendre. Les élévations de calcium observations varient de 1,4 à 2,5 par rapport au niveau 0 de calcium intracellulaire.

Sous l'effet de la kE (Figure 31B), la réponse est plus rapide et des pics sont observés. En moyenne, 5-6 cellules sur 10 répondent, pour la plupart la réponse ayant lieu sous forme de pics avec un délai de 1-2 min avant la réponse. La cinétique d'élévation puis de redescende de calcium dure en moyenne 2-3 min et varient en amplitude de 1,8 à 4,2 par rapport à F0.

La réponse aux MF (Figure 31C) comporte à la fois des montées rapides en pics pour certaines cellules et des montées progressives pour d'autres cellules. 9 cellules sur 10 répondent avec une amplitude allant de 1,9 à 3,8 par rapport à F0 et des délais bien variables entre 1min et 9 min de début de réponse. Dans un certain nombre de cellules, le niveau de calcium augmenté par les MF semble ne pas redescendre au cours du temps, au moins pour la durée de l'expérience.

Avec PF14 (Figure 31D), la réponse est similaire à celle des MF avec à la fois des réponses en pics et des réponses avec des montées progressives avec moins de cellules qui répondent (environ 6 sur 10) entre 1 et 3 min après l'ajout de PF14 et avec des réponses moins amples entre 1,4 et 2,2 d'augmentation d'amplitude par rapport à F0. Ici aussi, dans un certain nombre de cellules, le niveau de calcium augmenté par PF14 semble ne pas redescendre au cours du temps, au moins pour la durée de l'expérience.

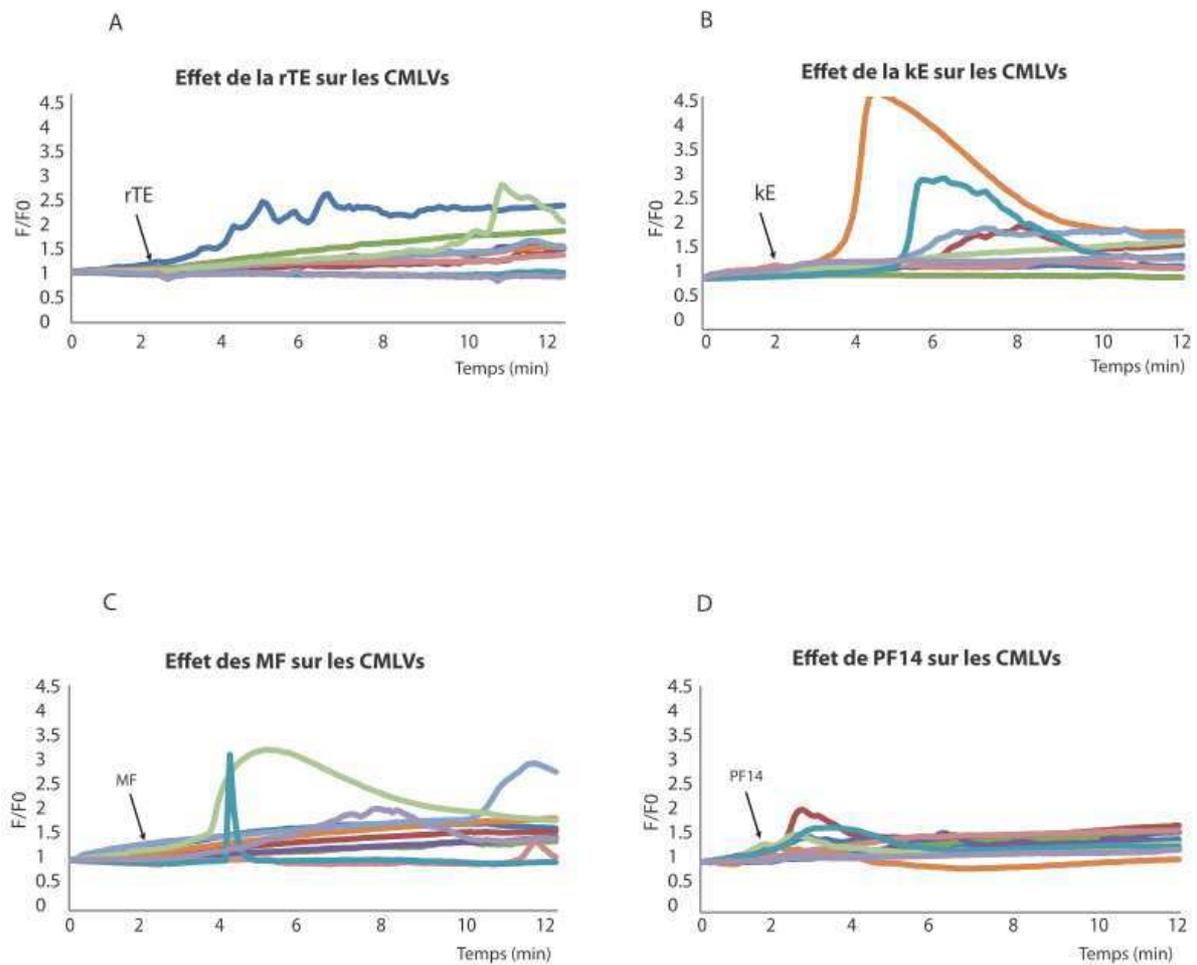


Figure 31: Activation de la voie de signalisation calcique des CMLV de souris C57Bl6 âgées de 6-8mois sous l'effet de rTE (A), kE (B), MF (C) et PF14 (D). Les tracés présentés sont représentatifs des réponses cellulaires aux agents testés au cours de ces expériences. Chaque tracé représente la réponse d'une cellule. $n= 3$ pour chaque expérience.

Les quatre composants des fibres élastiques testés réagissent avec les cellules musculaires lisses. La forme de ces réactions varie d'une molécule à une autre entre une montée plus ou moins en pic ou bien une montée progressive. La forme de la réponse n'est apparemment pas en relation avec la famille de la protéine : la réponse est différente pour la kE et la rTE, deux formes différentes d'une même protéine, alors que les CMLV répondent de façon similaire/proche à la kE et aux MF.

La génération d'une réponse calcique chez les CMLV avec ces échantillons protéiques pourrait être à l'origine des réponses cellulaires déjà décrites dans les publications tels que la migration, l'adhésion et la synthèse de l'élastine (Jacob, Fulop et al. 1987, Yamamoto and Yamamoto 1993, Ito, Ishimaru et al. 1997, Mariko, Ghandour et al. 2010) aussi que d'autres fonctions non encore décrites. En particulier pour PF14, on peut imaginer une action de la réponse calcique pour générer une constriction des CMLV observée sous l'action de cette molécule au cours de nos travaux.

D'autre part, pour les mêmes doses utilisées, il est à noter que les réponses générées par nos échantillons protéiques dans les cellules endothéliales (voir article 2 rapportant les travaux de la présente thèse) sont différentes de celles produites par les CMLV : bien que les proportions de cellules répondantes soient proches, l'amplitude et la forme de la réponse des cellules est différente. A concentration de molécule testée égale, les réponses des cellules endothéliales sont en général plus amples, plus rapides, et présentes toujours une cinétique en forme de pics calciques. Ceci suggère une interaction-affinité plus importante de nos échantillons avec les récepteurs cellules endothéliales qu'avec ceux des CMLV, hypothèse étayée par le fait que, bien que déclenchant une élévation de la concentration calcique aussi bien dans les cellules endothéliales que dans les cellules musculaires lisses vasculaires, les composants des fibres élastiques testés déclenchent, en tant qu'effet résultant, une vasodilatation médiée par l'endothélium. Il faut rappeler que lorsque l'endothélium est retiré des vaisseaux, nous avons montré que PF14 déclenche une vasoconstriction, ceci étayant à nouveau l'hypothèse précédente. De plus, dans les pathologies touchant l'élastine et la fibrilline-1, les études antérieures ont montré que les CMLV sont les cellules les plus touchées (Ewart, Morris et al. 1993, Fukamizu 2000). On pourrait supposer que l'altération préférentielle des fonctions des CMLV soit en partie liée à la cinétique de la réponse des cellules vasculaires. Les cellules endothéliales réagissent aux composants des fibres élastiques par une réponse calcique assez rapide impliquant des réponses à court et moyen terme, comme la synthèse de médiateurs ayant une action rapide au niveau vasculaire, par exemple le NO. En revanche, la réponse calcique des CMLV semble être plutôt une réponse à cinétique plus longue qui démarre lentement puis redescend lentement au cours du temps. Le rôle des fibres élastiques pourrait alors être à plus long terme sur la fonction des CMLV, comme dans les fonctions de migration et d'adhésion ou bien d'autres fonctions impliquant à long terme, dans les pathologies vasculaires, une dysfonction de ces cellules.

Effet de l'âge sur la réponse calcique obtenue par la rTE, kE, MF et PF14 sur les cellules musculaires lisses vasculaires.

Pour étudier l'effet de l'âge sur la génération des signaux calciques dans les CMLV, des CMLV provenant des souris C57Bl6 âgées de différentes classes d'âges 1-2 mois, 6-8

mois, 12-15 mois et de 22-24 mois ont été testées sous nos échantillons protéiques. Pour chaque classe d'âge, au moins 3 expériences différentes ont été réalisées sur des cellules provenant de 3 souris différentes. La figure 32 montre les résultats obtenus. Afin de faciliter la compréhension de l'évolution de la réponse cellulaires avec l'âge, les résultats obtenus avec les CMLV d'animaux adultes de 6-8 mois déjà présentés en figure 31 ont été incorporés à nouveau dans la figure 32.

Pour la rTE (Figure 32A-C), dont la réponse calcique pour la classe de 6-8 mois est sous forme de montée progressive, la classe d'âge de 1-2mois ne montre aucune réponse calcique pour aucune des cellules testées pendant le temps de l'expérience, alors que les CMLV provenant de souris âgées 12-15 mois montre des montées calciques aussi progressives et d'amplitude un peu moindre (1,7 par rapport à F0 en maximum) avec moins de cellules (5/10) répondant que pour la classe 6-8 mois. La classe d'âge 22-24 mois n'a pas pu être testée. Les résultats obtenus suggèrent que la réponse calcique à la rTE pourrait être une caractéristique acquise par les CMLV au cours de la vie, caractéristique qui pourrait trouver son maximum à l'âge de 6-8 mois et qui pourrait diminuer au cours du temps.

La réponse à la kE (Figure 32D-F) commence plus précocement, avec quelques faibles montées progressives (F/F0 maximum 1,4) observées pour certaines cellules (2/10 cellules) pour des CMLV âgées de 1-2 mois. Ces élévations du niveau de calcium intracellulaire sont plus importantes vers l'âge de 6-8 mois, plus amples, et avec des formes plutôt en pics. Ces montées commencent à disparaître vers l'âge de 12-15 mois, les CMLV cultivées montrant une très faible réponse : 1/10 cellule répond à F/F0 maximale de 1,6 avec une réponse progressive dans le temps. La classe d'âge 22-24 mois n'a malheureusement pas pu être testée. Ces résultats suggèrent cependant que la réponse à la kE est précocement acquise par les cellules, atteint un maximum à l'âge de 6-8 mois, puis s'estompe ensuite.

Avec les MF (Figure 32G-J), l'acquisition de la réponse est beaucoup plus précoce. A l'âge de 1-2 mois, déjà 3/10 des CMLV cultivées répondent aux MF avec des réponses en pics ou en montées progressives, et même avec des répétitions de réponse pour certaines cellules. La réponse cellulaire devient plus importante à l'âge de 6-8 mois avec plus de cellules répondant avec des amplitudes plus élevées, alors que cette réponse qui disparaît plus tôt que dans le cas de la réponse à l'élastine : à l'âge 12-15 mois, seulement une cellule sur 10 répond très faiblement et à l'âge 22-24 mois, plus aucune cellule ne répond.

Cet effet des MF n'est pas tout à fait identique à celui de PF14 (Figure 32K-N), pour qui la nature de la réponse serait plutôt semblable à celle de l'élastine, avec : i) une absence de réponse à l'âge de 1-2 mois, ii) une réponse nette pour les CMLV de souris adultes, plutôt sous forme de pics calciques à 6-8 mois et sous forme de montées progressives à 12-15 mois, iii) puis de nouveau une absence de réponse pour les cellules d'animaux âgés de 22-24 mois.

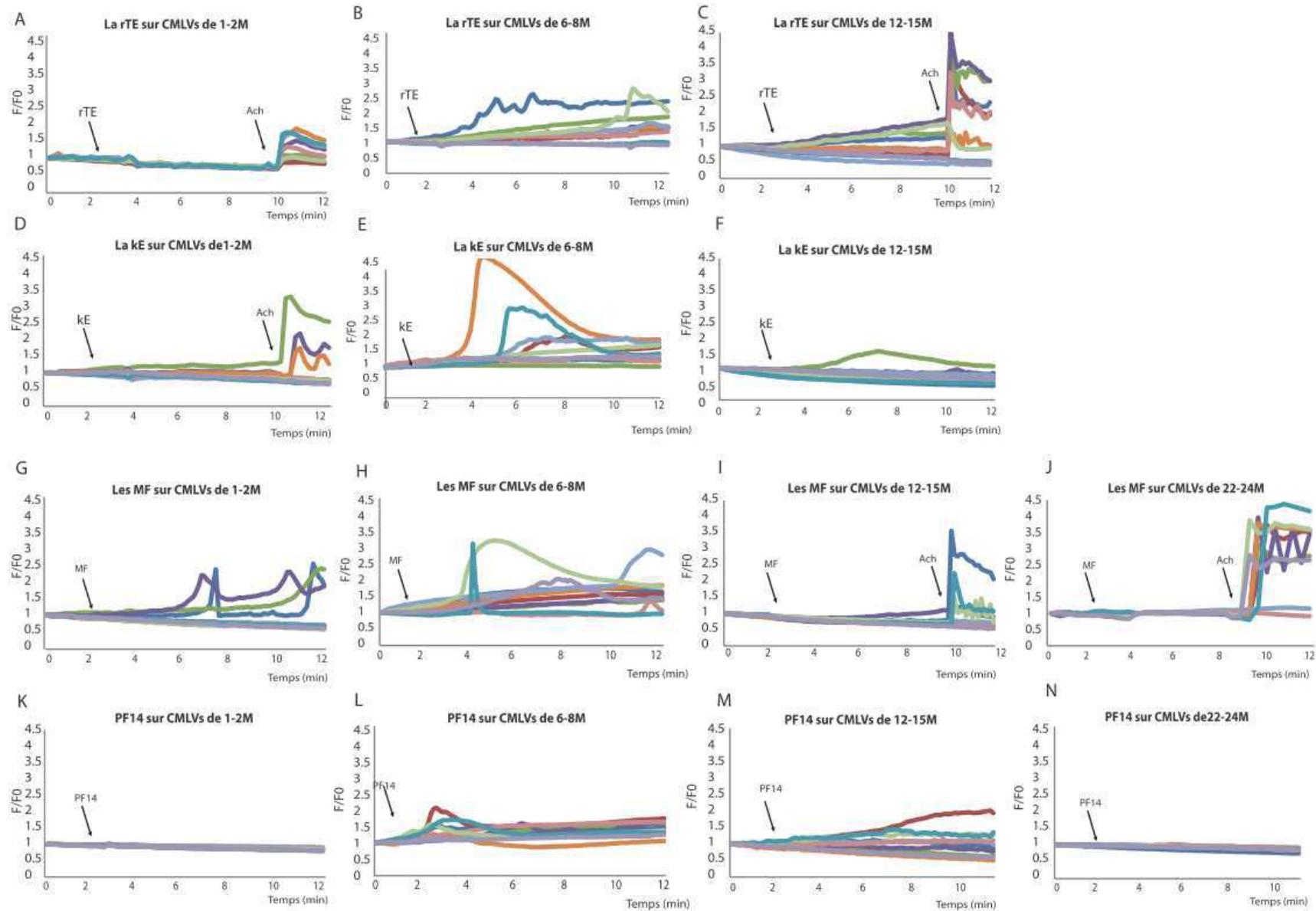


Figure 32: Effet de l'âge sur la réponse calcique des CMLV sous rTE (A-C), kE (D-F), MF (G-J) et PF14 (K-N). Les CMLV sont cultivées à partir de souris C57Bl6 âgées de 1-2 mois (A, D, G et K), 6-8 mois (B, E, H et L), 12-15 mois (C, F, I et M) et 22-24 mois (J et N). Ach : Acétylcholine (1 μ M). Les tracés présentés sont représentatifs des réponses cellulaires aux agents testés au cours de ces expériences. Chaque tracé représente la réponse d'une cellule. n= 3-4 pour chaque expérience.

Ainsi, l'effet du vieillissement ne serait pas neutre quant à la réponse des CMLV aux composants des fibres élastiques. La réactivité à ces échantillons protéiques serait un phénomène acquis avec l'âge par les CMLV qui deviennent plus actives vers l'âge adulte puis perdront avec l'âge cette capacité de réactivité. Seules les MF pourraient avoir une action plus précoce, mais elles perdent aussi leur activité sur les CMLV d'animaux plus âgés.

Ceci pourrait expliquer en partie pourquoi les CMLV d'individus âgés perdent une partie de leur fonctionnalité, entrent en sénescence et diminuent leur pouvoir vasomoteur (Mudera, Pleass et al. 2000). Il serait possible que, dans ce cas, les CMLV passent d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique et sécrétoire, hypothèse qui expliquerait pourquoi les CMLV de souris de 1-2 mois répondent faiblement aux composants des fibres élastiques, âge pendant lequel la synthèse de la MEC, surtout celle des fibres élastiques, est encore active. Dans le cas de la réponse aux MF, il faut replacer la réponse précoce des CMLV dans le contexte de la cinétique de sécrétion des principaux composants des MF, débutant plus précocement et stoppant plus précocement que la sécrétion de l'élastine (Streuli 1999). Ceci pourrait expliquer que les CMLV d'animaux âgés de 1-2 mois répondent déjà aux MF.

Effet du génotype sur les réponses calciques des cellules musculaires lisses vasculaires.

Le vieillissement a montré un effet sur la capacité à la réponse calcique aux composants des fibres élastiques. Le syndrome de Williams-Beuren et le syndrome de Marfan, deux pathologies cardiovasculaires liées respectivement à un déficit en élastine et en fibrilline-1, sont des pathologies caractérisées par un vieillissement pathologique précoce : dans ces syndromes, les anomalies apparaissent dès la naissance et retentissent sur le cours normal du vieillissement vasculaire en l'accéléralant ou en changeant certaines de ces caractéristiques (Sandra, Tienpont et al. 2001, Pezet, Jacob et al. 2008). Dans ces pathologies, la teneur vasculaire et l'organisation des fibres élastiques sont touchées. Les CMLV seraient sujettes alors à un contact plus ou moins important avec les composants des fibres élastiques, un facteur de plus agissant sur la réactivité de ces cellules aux fibres élastiques. On peut se demander quel serait alors l'effet d'une telle déficience sur la réactivité des CMLV aux composants des fibres élastiques ? Pour étudier si la survenue de telles déficiences pourrait toucher la réactivité des CMLV, nous disposons de 2 modèles murins déjà décrits comme étant des modèles -au niveau cardiovasculaire- des syndromes de Williams-Beuren et de Marfan. Ce sont respectivement les souris hétérozygotes déficientes pour l'élastine (Eln+/-) et pour la fibrilline-1 (Fbn-1 +/-mgΔ). A partir de souris âgées de 6 mois ayant ces génotypes, des CMLV sont mises en culture comme décrit plus haut, et soumises aux mêmes tests précédents avec les composants des fibres élastiques. Afin de faciliter la

compréhension de l'évolution de la réponse cellulaires avec l'âge, les résultats obtenus avec les CMLV d'animaux adultes sauvages de 6-8 mois déjà présentés en figure 31 ont été incorporés à nouveau dans la figure 33 (A-D).

Pour les CMLV isolées à partir des souris ELN+/-, et alors que ces cellules répondent à l'Ach, aucune cellule ne présente de réponse calcique dans les 10min suivant l'ajout de la rTE, la kE, les MF ou PF14 (Figure 33E-H). Comme ces mêmes molécules déclenchent une forte réponse calcique dans les CMLV d'animaux sauvages du même âge, ces résultats suggèrent qu'une altération spécifique de la signalisation a lieu chez ces animaux mutés, ce qui pourrait constituer une manifestation d'un vieillissement précoce des CMLV, qui présentent ici des courbes semblables à celles obtenues avec des CMLV isolées de souris C57Bl/6 sauvages âgées de 15 à 24 mois. Ceci est en cohérence avec la démonstration antérieure d'un découplage du récepteur de l'élastine de ses voies de signalisation avec l'âge (Bizbiz, Alperovitch et al. 1997).

Par ailleurs, les CMLV isolées à partir des souris Fbn-1 +/-mg Δ réagissent différemment. Par rapport aux expériences réalisées sur les cellules d'animaux sauvages, la réponse à la rTE, aux MF et à PF14 (Figure 33I K et L) est très diminuée. Environ 1/10 des cellules répondent avec une amplitude plus faible pour chacune de ces protéines, et la réponse est de forme similaire à celle obtenues avec les CMLV des souris C57Bl6 sauvages de même âge. Par ailleurs, la réactivité à la kE est forte mais un peu différente de celle qui est présente dans les cellules d'animaux sauvages. Si la réponse calcique est de même forme avec des réponses en montées progressives et en pics, et avec des amplitudes identiques, et un nombre moyen de cellules répondantes identique (5/10), le délai de temps de début de réponse est augmenté de 1-2 min vers 1-9 min avec une moyenne de retard de 5 min.

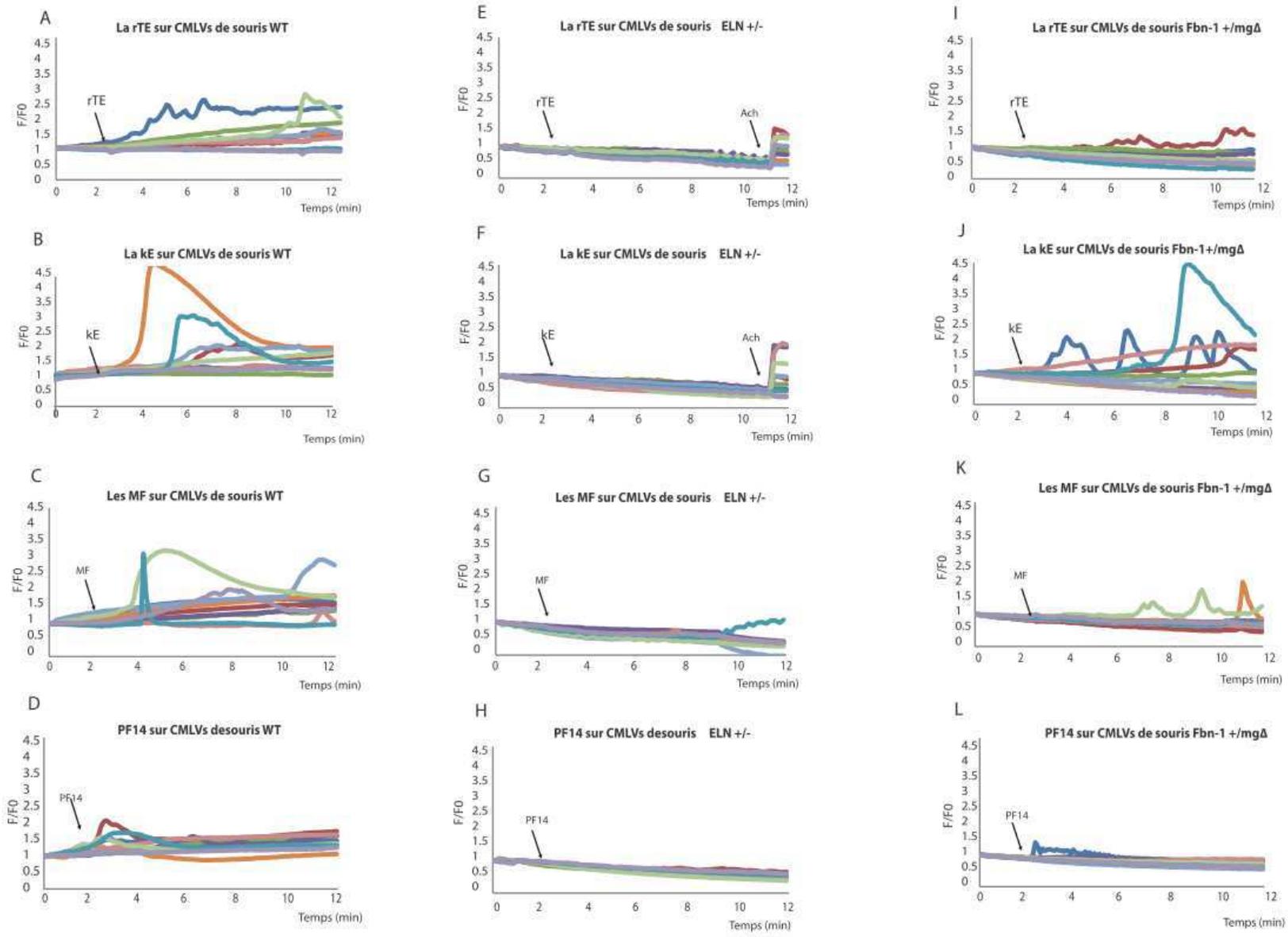


Figure 33: Réponse calcique obtenue après exposition à la rTE (A,E,I), la kE (B,F,J), les MF (C,G,K) et PF14 (D,H,L) des CMLV isolées de souris C57Bl6 (A-D), Eln+/- (E-H), Fbn-1 +/mgΔ (I-L) âgées de 6 mois. Ach : Achétylcholine 1μM Les tracés présentés sont représentatifs des réponses cellulaires aux agents testés au cours de ces expériences. Chaque tracé représente la réponse d'une cellule. n= 3-4 pour chaque expérience. WT : phénotype C57Bl/6 sauvage.

Il a été montré encore une fois dans cette série d'expériences que les déficiences en élastine et en fibrilline-1 -et donc probablement des syndromes de Williams Beuren et de Marfan- ressemble par certains aspects à une manifestation d'un vieillissement pathologique précoce. Ici, le rapprochement est démontré via un nouveau modèle, non tissulaire ou organique, mais cellulaire : celui de la signalisation cellulaire.

3) Discussion

Les tissus et les organes des êtres vivants se forment à partir d'une cellule unique qui se divise, se développe, se différencie et synthétise la matrice extracellulaire, dont la membrane basale sur laquelle les cellules du tissu et de l'organe reposent. Ces phénomènes alternatifs se passent dans un ordre et un contexte bien précis et qui se répète de la même façon chez tous les individus grâce à un élément régulateur très important : les interactions cellule-matrice. Ces interactions, extrêmement nombreuses, sont une étape-clé aussi bien dans le développement embryonnaire que dans le maintien de la bonne structure et du bon fonctionnement de ces tissus et ces organes déjà formés. Parmi les interactions connues, plusieurs se sont avérées aussi essentielles à la survie de l'organisme, puisque la déficience de cette signalisation est létale ou aboutit à la mort précoce très tôt après la naissance (Schwartz and Assoian 2001).

Les vaisseaux sanguins permettent d'acheminer les informations entre les différents tissus des organismes et participent ainsi au maintien un équilibre essentiel à l'organisme. Leur formation débute très tôt au cours du développement embryonnaire. Pendant cette phase, les interactions et les signalisations cellules vasculaires- MEC permettent la prolifération, la migration, la différenciation des cellules vasculaires et leur permet la régulation de la disposition des éléments de la paroi artérielle (Ulrich and Heisenberg 2009, Janik, Litynska et al. 2010). La morphogenèse vasculaire débute pendant l'embryogenèse et continue après la naissance via des phénomènes de maturation (modifications du calibre et de l'épaisseur de la paroi) variant suivant l'état hémodynamique vasculaire afin de garantir des propriétés biomécaniques optimales. La structure complexe des vaisseaux sanguins est variable suivant le type de vaisseau. Composés, comme tous les tissus, de cellules entourées de matrice extracellulaire, les vaisseaux sanguins –spécialement les vaisseaux élastiques- ont la particularité de posséder au sein de la matrice extracellulaire des fibres élastiques abondantes et bien organisées. A ces fibres élastiques a été associé un rôle très important dans le maintien de l'élasticité des vaisseaux via l'effet de Windkessel (Rosenbloom, Abrams et al. 1993, Wagenseil and Mecham 2007). Les recherches effectuées sur les effets de composants de ces fibres élastiques ont montré que celles-ci ne sont pas inertes dans les vaisseaux, mais qu'elles sont capables d'interagir avec les cellules vasculaires en générant des signaux intracellulaires, modifiant ainsi la fonctionnalité cellulaire, et par conséquent la structure et la contractilité du vaisseau (Ho, Bose et al. 2008). L'importance de cette interaction fibres élastiques- cellules vasculaires est démontrée dans les pathologies liées à une déficience dans un des composants des fibres élastiques. Une mutation de gènes codant pour certains des composants des fibres élastiques, comme ceux de l'élastine, des fibuline-4 et -5, de LOX, de la fibrilline-1, a des conséquences remarquables sur le système cardiovasculaire (Rennke, Patel et al. 1978, Pereira, Andrikopoulos et al. 1997, Li, Faury et al. 1998, Nakamura, Lozano et al. 2002, Matsiko, Levingstone et al. 2012). Certaines mutations des gènes de l'élastine et de la fibrilline-1 conduisent à 2 syndromes pathologiques, respectivement le syndrome de Williams-Beuren (WBS) et le syndrome de Marfan (MS). Dans ces 2 syndromes, les altérations des fibres élastiques résultent en un processus ressemblant à certains égards

à un vieillissement précoce. En effet, on observe un dysfonctionnement des cellules vasculaires avec une prolifération accrue des CMLV dans le cas du WBS et une mort cellulaire par apoptose dans le cas du MS (Karnik, Wythe et al. 2003, Chung, Au Yeung et al. 2007, Malinin, Pluskota et al. 2012, Matsiko, Levingstone et al. 2012). Ces modifications des fonctions cellulaires dans ces syndromes résulteraient d'une altération du dialogue entre les composantes des fibres élastiques et les cellules (Hynes 1999). L'influence de ces déficiences n'est pas limitée aux cellules vasculaires mais touche aussi la structure des fibres élastiques qui se trouvent plus fenestrées et plus abondantes dans le cas du WBS, et lissées dans le cas du MS (Dietz and Pyeritz 1995, Morris and Mervis 2000). Cette modification structurale des fibres élastiques pourrait être un résultat direct de la déficience de la synthèse du composant des fibres élastiques ou de l'assemblage du composant des fibres élastiques anormal, aussi bien qu'un résultat d'un dysfonctionnement, suite à ces déficiences, des cellules vasculaires responsables de la synthèse et du dépôt des fibres élastiques. Dans le deuxième cas, ceci montre à nouveau toute l'importance des interactions fibres élastiques-cellules vasculaires.

L'hypothèse de la modification des interactions cellules vasculaires- fibres élastiques dans le WBS et le MS est étayée par : i) la détection des fragments de fibrilline-1 dans le sang de ses souris déficientes pour la fibrilline-1 (Booms, Pregla et al. 2005), ii) la découverte de dépôts d'élastine en marge des lames élastiques dans la partie médiale des artères élastiques de souris Eln+/- adultes, iii) de même que l'accumulation de la matrice extracellulaire dans l'espace sous-endothélial des artères des souris Eln+/- adultes (Li, Faury et al. 1998). Cependant, il est à noter que ces modifications sont en grande partie discordantes entre le WBS et le MS. Cette contradiction reste une énigme à résoudre : pourquoi une déficience dans 2 composés de la même structure résulterait dans des effets opposés (prolifération/sténose contre apoptose/anévrisme) ? Ceci suggérerait que l'effet de l'interaction de ces 2 composés avec les fibres élastiques serait différente et même contradictoire entre l'élastine et la fibrilline-1. Il était alors important dans un premier temps d'étudier les interactions générées par ces 2 composés au niveau des cellules vasculaires dans le but de nous permettre dans un deuxième temps de comparer ceux générées par l'élastine et ses dérivés avec ceux générées par les microfibrilles et la fibrilline-1 pour caractériser les différences qui sont à l'origine des divergences symptomatologiques entre les 2 syndromes.

3.1 Fonctions cellulaires modifiées par les composants des fibres élastiques :

Sur des anneaux aortiques, les travaux présentés dans la présente thèse montrent que les 2 composants des fibres élastiques induisent une vasodilatation médiée par l'endothélium. Cette vasodilatation varie en amplitude entre les 3 composés utilisés : rTE, PF14 et MF ; mais elle reste à des valeurs proches de celle observée auparavant

avec la kE (Faury, Ristori et al. 1995, Faury, Garnier et al. 1998). Ceci met en relief une interaction des différents composants des fibres élastiques avec les cellules endothéliales vasculaires et montre l'importance de l'étude approfondie de ces interactions. Certaines interactions des différents composés étudiés avec les cellules endothéliales ont été démontrées depuis longtemps, comme la régulation par les fragments d'élastine de l'attachement des cellules circulantes, la migration et la prolifération, et la régulation du tonus vasculaire (Margadant, Monsuur et al. 2011). Des études précédentes ont montré que les peptides d'élastine augmentent la survie et la migration cellulaires (Jacob, Fulop et al. 1987, Ooyama, Fukuda et al. 1987, Wachi, Seyama et al. 1995). D'autre part, dans les vaisseaux de souris en développement, il a été montré des interactions physiques entre les cellules endothéliales et les microfibrilles, qui peuvent traverser la membrane basale des cellules endothéliales (Davis 1994). Les microfibrilles participent à l'ancrage des cellules endothéliales à la matrice sous-jacente dans l'aorte de souris, ceci via la fibrilline-1 (Davis 1995), ce qui est en cohérence avec l'observation d'un décollement endothélial chez les souris déficientes en fibrilline-1 (Matsiko, Levingstone et al. 2012). Enfin, une autre étude montre que le fragment de la fibrilline-1 contenant la séquence RGD- PF14-, induit la migration, l'adhésion et la prolifération des HUVECs (Mariko, Ghandour et al. 2010).

Sur notre modèle de cellules endothéliales (HUVECs), nos travaux montrent que les 2 composants des fibres élastiques –élastine et microfibrilles- ont stimulé le pouvoir adhésif et prolifératif des cellules alors que l'effet de ces deux composants sur la migration est variable en fonction de la partie de ces composés et du test utilisé. L'élastine augmente le pouvoir migratoire des HUVECs dans les tests utilisant des chambres de Boyden coatées à la kE et la rTE, mais pas dans les tests de blessures effectués sur des HUVECs incubés avec ces 2 composés protéiques. En revanche, les MF entraînent une diminution du pouvoir de fermeture de la blessure alors que, pour une concentration plus élevée, ces mêmes MF augmentent le pouvoir migratoire des HUVECs en chambre de Boyden. Ce résultat reste inexplicé et les différents mécanismes impliqués restent à mettre en évidence. Il est possible que, suivant l'état d'adhérence des cellules, les MF pourraient augmenter ou diminuer ce pouvoir migratoire. Ceci est différent de l'effet déjà montré pour la fibrilline-1 pour qui son fragment PF14 a montré un fort effet stimulateur de la migration des HUVECs (Mariko, Ghandour et al. 2010).

D'autre part, nous avons montré que les composants des fibres élastiques, en interagissant avec les HUVECs, exercent un effet de rétroaction positive sur leur production. L'ajout de ces composants sur des HUVECs en culture induit l'augmentation de la synthèse de l'élastine et de la fibrilline-1. Cette augmentation serait en faveur d'une légère (il s'agit ici de cellules endothéliales) augmentation de l'élasticité des vaisseaux sanguins, pouvoir qui pourrait être équilibré par ces mêmes composés qui agissent sur les HUVECs en impliquant une légère augmentation de la synthèse du collagène – composé donnant une certaine rigidité aux vaisseaux sanguins- et par une augmentation de la synthèse des MMPs qui augmentent le taux de dégradation des fibres élastiques comme démontré dans la présente thèse.

De leur côté, les CMLV interagissent aussi avec les composants des fibres élastiques étudiés. Sur des anneaux aortiques, nous avons montré que PF14, le fragment de la fibrilline-1 contenant la séquence RGD de cette protéine, possède une propriété absente pour les autres fragments étudiés : PF14 a un effet vasoconstricteur en cas d'absence de l'endothélium via une interaction directe avec les CMLV. Cette action directe de PF14 sur les CMLV est en accord avec des expériences antérieures qui avaient montré que les microfibrilles, via la fibrilline-1, ancrent les CMLV à la matrice sous-jacente dans l'aorte de souris en développement (Davis, Blattel et al. 1999) et que les fragments de la fibrilline-1 contenant la séquence RGD interagissent avec les CMLV modifiant leur pouvoir adhésif, prolifératif et migratoire (Bax, Bernard et al. 2003). La fibrilline-1 intervient aussi dans la différenciation des CMLV : la déficience en fibrilline-1 empêche la maturation de la paroi aortique, en inhibant la différenciation des cellules musculaires lisses chez les souris déficientes en fibrilline-1 (Matsiko, Levingstone et al. 2012). Concernant l'élastine, des études précédentes avaient démontrées que, sur les CMLV, les peptides d'élastine augmentent ou diminuent la prolifération, diminuent la migration et réduisent la synthèse de l'élastine mais pas la synthèse du collagène (Majesky, Dong et al. 2011).

3.2 Signalisations cellulaires déclenchées par les composants des fibres élastiques :

Les composants des fibres élastiques interagissent avec les cellules endothéliales et y activent des voies de signalisation intracellulaires déjà mises en évidence telles que la voie PI3K/Akt/NOS et la voie NO/GMPC/Erk1/2 avec l'élastine, et la voie PLC/IP3 avec PF14 (Robinet, Fahem et al. 2005, Fahem, Robinet et al. 2008, Mariko, Ghandour et al. 2010). Notre nouvelle étude réalisée sur les anneaux aortiques confirme cet effet positif des composants des fibres élastiques sur la synthèse du NO. La rTE, les MF et PF14 stimulent la synthèse du NO par les cellules endothéliales aortiques, synthèse à l'origine de la vasodilatation des anneaux aortiques.

D'autre part, notre étude sur la voie de signalisation calcique dans les cellules endothéliales HUVECs vient étayer ces effets déclencheurs de signaux intracellulaires des composants des fibres élastiques. L'élastine ainsi que les MF augmentent le niveau de calcium intracellulaire, signal résultant d'une activation des messagers intracellulaires PLC/IP3, Src, MEK1. Ces signaux entraînent une activation des canaux calciques membranaires et réticulaires pour permettre le déplacement à la fois du calcium extra et intracellulaire. Ceci est différent des mécanismes de signalisation déclenchés par PF14, pour qui des travaux récents avaient démontré que le calcium déplacé après son ajout provenait essentiellement des réserves intracellulaires du réticulum endoplasmique (Mariko, Ghandour et al. 2010). Cette différence pourrait être due au fait qu'un seul site d'interaction cellulaire est connu être présent dans PF14, limitant alors le nombre de type d'interactions cellulaires, alors que dans les MF, la kE et la rTE plusieurs sites d'interactions cellulaires différents existent et pourraient réagir, et ce de manière différente avec l'activation à des degrés variés des canaux calciques

membranaires et/ou intracellulaires, dont la résultante serait celle observée dans nos expériences.

Dans les HUVECs, notre étude des voies de signalisation calcique mises en jeu par la kE, la rTE, les MF et PF14 nous a aussi permis de révéler une différence importante concernant les acteurs mis en jeu, ceci concernant le rôle du cytosquelette et en particulier des microfilaments d'actine. Alors que ces derniers interviendraient dans la signalisation induite par les dérivés de la famille de l'élastine, son intervention dans la signalisation des microfibrilles et de la fibrilline-1 semble peu probable car la déstructuration de l'actine ne modifie pas sensiblement la signalisation calcique déclenchée par PF14 et les microfibrilles (Mariko, Ghandour et al. 2010). Les microfilaments d'actine pourraient intervenir en facilitant le couplage de la signalisation calcique entre les réserves intra- et extracellulaires : des études du rôle des microfilaments d'actine dans la signalisation calcique ont déjà montré que ceux-ci interviendraient pour accélérer le mécanisme de couplage qui pourrait apparaître entre les réserves intra- et extracellulaires du calcium, mécanisme connu sous le nom de CICR (calcium-induced calcium release) (Rosado and Sage 2000, Sabala, Targos et al. 2002). Si pour PF14 un tel couplage est clairement absent, ceci n'est pas le cas pour les MF pour lesquelles on démontre tout de même un couplage entre les réserves intra- et extracellulaires. L'intervention des microfilaments d'actine n'est donc pas obligatoire pour tous les mécanismes dans lesquels un couplage des réserves de calcium existe. Il a été supposé que l'intervention ou pas du cytosquelette d'actine est fonction du type cellulaire mis en jeu (Sabala, Targos et al. 2002). Ici, nous avons montré pour un même type cellulaire que l'intervention des microfilaments d'actine est fonction de la nature du stimulus. Deux molécules stimulatrices différentes originaires de la même structure –les fibres élastiques- agissent différemment en stimulant ou pas le cytosquelette d'actine.

La signalisation calcique par ces composants chez les CMLV existe aussi. Nous avons démontré que les 4 structures protéiques étudiées kE, rTE, MF et PF14 induisent un signal calcique une fois ajoutées aux CMLV en culture. Entre les différentes structures protéiques, la nature du signal varie surtout en la cinétique de l'augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ mise en jeu : pour la kE, cette montée est en forme de pics alors que, pour la rTE, c'est plutôt une montée lente et progressive qui est mise en jeu. Concernant PF14 et MF, les 2 formes de montée -en pics et progressives- sont mises en jeu.

3.3 Récepteurs mis en jeu dans les interactions fibres élastiques- cellules vasculaires :

Ces interactions fibres élastiques- cellules vasculaires sont médiées par des récepteurs membranaires. Deux récepteurs communs ont été identifiés pour l'élastine et pour la fibrilline-1. Il s'agit de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et du complexe récepteur de l'élastine (ERC). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est identifiée comme récepteur stimulant, via sa liaison à l'élastine et probablement la fibrilline-1, l'adhésion, la migration, la prolifération cellulaire et

l'assemblage de l'élastine (Jovanovic, Takagi et al. 2007, Bax, Rodgers et al. 2009). De même, l'ERC augmente le chimiotactisme des macrophages après sa liaison à la fibrilline-1, et avec l'élastine, l'adhésion, la migration, la prolifération cellulaire et l'assemblage de l'élastine (Booms, Ney et al. 2006, Guo, Booms et al. 2006). Ces fonctions rapprochées/croisées entre les 2 récepteurs ont permis de proposer une théorie de synergie d'activité entre les 2 récepteurs pour l'élastine, pour certains types cellulaires comme les cellules musculaires lisses (Patel, Menon et al. 2011, Patel, Vandromme et al. 2012).

La kE et la rTE ont été démontrées auparavant comme ayant des effets vasodilatateurs, par l'intermédiaire de leur liaison au ERC des cellules endothéliales (Faury, Ristori et al. 1995, Faury, Garnier et al. 1998). Cependant, nos présents travaux sur la rTE et les MF, qui sont capables de se lier à l'ERC, confirment que ces molécules sont vasodilatatrices mais, à la différence des travaux précédents concernant la rTE, n'impliquent pas l'ERC. Cette différence concernant le récepteur médiant les effets de la rTE pourrait être liée aux protocoles expérimentaux différents. Les vaisseaux étaient périfusés par un milieu physiologique avec une oxygénation forte par bullage d'O₂ continu dans le cas des expériences réalisées sur la kE, ce qui n'était pas le cas pour la rTE (milieu statique de faible volume sans bullage) en raison de sa rareté. Cette différence de protocole pourrait suggérer qu'une hypoxie cellulaire était peut-être présente au cours de notre protocole avec la rTE, les MF et PF14, ce qui pourrait induire une commutation entre l'intervention d'un récepteur ou d'un autre.

En revanche, l'étude de la signalisation calcique, qui pourrait intervenir dans les fonctions d'adhésion, de migration, de prolifération, de synthèse et de dégradation de la MEC, montrent -aussi bien pour la kE, la rTE que les MF- l'intervention à la fois de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de l'ERC. Ceci est pour la première fois une démonstration de cette synergie dans les cellules endothéliales, de plus, cette étude supporte l'idée générale de la synergie d'activité entre ces récepteurs qui, jusqu'à présent, n'a été démontrée que dans deux études (Patel, Menon et al. 2011, Patel, Vandromme et al. 2012).

3.4 Mise au point d'un nouveau protocole de culture de CMLV de souris :

A côté des HUVECs, notre modèle cellulaire des cellules endothéliales vasculaires humaines, il semblait aussi important d'étudier la réponse aux molécules étudiées d'un autre type cellulaire : les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) qui exercent un rôle des plus importants au niveau vasculaire. L'étude de l'effet des composants des fibres élastiques sur les VSMCs de souris était particulièrement importante car elle pouvait être réalisée en utilisant des souris génétiquement modifiés pour certaines protéines, en particulier les différentes protéines des fibres élastiques, comme l'élastine (Eln+/-). Au début de cette thèse, le protocole de mise en culture existant était incapable

de produire de manière reproductible des quantités importantes CMLV. D'où la nécessité de mise au point d'un protocole opérationnel de cultures de VSMCs murines. Les travaux présentés dans l'article 3 de cette thèse représentent les étapes suivies pour mettre au point ce protocole optimisé. L'application de ce protocole nous a permis de cultiver des CMLV issues des différents groupes de souris utilisés. Sur ces CMLV, la rTE, la kE, les MF et PF14 ont été appliquées dans le but de suivre la variation du signal calcique dans les 8-10 minutes suivant leur ajout.

3.5 Impact de la déficience en élastine et en fibrilline-1 sur la réactivité des cellules musculaires lisses vasculaires en culture aux composants des fibres élastiques :

Sur des CMLV en culture isolées à partir des souris Eln+/- et Fbn-1 +/mg Δ , les effets de la stimulation par la kE, la rTE, MF et PF14 ont été comparés avec ceux observés avec des souris C57Bl/6 sauvages. Nos travaux montrent que le signal calcique est diminué dans les CMLV des souris Fbn-1 +/mg Δ , et décroît encore plus, voire disparaît, dans les cellules des souris Eln +/- . Ces résultats pourraient trouver leur origine *in vivo* dans la diminution des niveaux de l'élastine et de la fibrilline-1 dans l'environnement des cellules chez les souris Eln +/- et Fbn-1 +/mg Δ , causée d'une part par la diminution de leur synthèse, d'autre part par une accumulation de la matrice sous endothéliale au niveau des artères de ces souris. Ceci limiterait les contacts de ces molécules avec les cellules vasculaires et induirait une rétroaction sur la production et l'adressage à la membrane cellulaire des récepteurs de l'élastine et aux microfibrilles. Il pourrait s'en suivre une modification phénotypique durable des CMLV de ces souris, observable *in vitro* après mise en culture, qui seraient alors moins réactives à ces 2 composants des fibres élastiques. Cependant, du fait de l'accumulation de la matrice sous-endothéliale avec l'âge, il serait important d'étayer l'étude de la réactivité des CMLV aux composants des fibres élastiques par des tests complémentaires réalisés à différentes classes d'âge dans le but de confirmer notre hypothèse.

3.6 Effet du vieillissement sur la réactivité des cellules musculaires lisses vasculaires :

Notre étude de la réactivité des CMLV en culture au cours du vieillissement, montre que les CMLV perdent aussi avec l'âge leur capacité de réponse aux molécules étudiées kE, rTE, MF et PF14. Cette perte de réponse pourrait survenir du fait de la destruction progressive des fibres élastiques avec l'âge, et donc de la perte partielle de connexion avec ces composants. Nos résultats sont en cohérence avec l'observation antérieure d'un découplage du récepteur de l'élastine de sa voie de signalisation avec l'âge (Varga, Jacob et al. 1990, Fulop, Douziech et al. 2001). Il est aussi à noter que cette réponse des CMLV aux fragments des fibres élastiques est une réponse acquise avec l'âge. En effet, les

CMLV provenant de souris âgées de 1-2 mois ne répondent pas aux composants des fibres élastiques testés malgré la présence de fibres élastiques abondantes à cet âge là. Il se peut que cette absence de réponse soit le résultat d'un engagement de l'EBP dans d'autres fonctions cellulaires comme par exemple l'exportation de la tropoélastine, encore en cours à cet âge. L'EBP serait alors non disponible pour former des récepteurs membranaires de l'élastine fonctionnels (ERC), induisant une absence de la signalisation calcique en réponse à nos composés (Hinek and Rabinovitch 1994, Hinek, Keeley et al. 1995). Ajoutons aussi que nos résultats sont cohérents avec des résultats précédents sur l'effet de l'âge sur la réponse vasodilatatrice des anneaux aortiques de rats à la kE (Faury, Chabaud et al. 1997). Sur ces anneaux, la réponse à la kE dépendante de l'endothélium était absente chez les rats jeunes (1-2 mois), puis apparaît chez les animaux adultes (6-12 mois), pour disparaître à nouveau chez les rats âgés (24 mois).

Nos travaux suggèrent encore une fois un certain parallèle entre les déficiences en élastine et en fibrilline-1 et certains effets du vieillissement, suggérant que ces déficiences pourraient conduire à des formes de vieillissement pathologique précoce. Les tableaux de la pathogenèse du WBS et du MS pourraient être complétés par l'avenir par une étude attentive *in vivo* de la perturbation des voies de signalisation induite par la fibrilline-1 et par l'élastine aussi bien que par la réactivité des cellules à ces composés.

3.7 Différences d'interactions entre les différentes molécules étudiées :

Malgré la grande ressemblance des réponses obtenues avec les différentes structures étudiées, quelques différences sont observées. La réponse à la kE diffère de la réponse à la rTE par la nature de leur signal généré dans les CMLV. Ceci permet de distinguer pour un même type de composant, l'élastine, deux réponses différentes : soit en pics, soit en montée progressive. Cette différence vient de la forme présentée par ce composant. Alors que la rTE représente une forme d'élastine non mature en cours de synthèse/assemblage, la kE représente elle une forme de l'élastine qui a subi une dégradation. Cependant, on pourrait imaginer une différence plus importante entre les effets de la rTE et ceux de la kE, puisqu'elles représentent des formes différentes de l'élastine depuis sa sécrétion jusqu'à sa dégradation, on remarque que ces différences sont très restreintes.

Par ailleurs, les différences entre les effets des MF et de PF14 sont plus importantes. PF14 possède un pouvoir pro-migratoire alors que les MF diminuent ce pouvoir migratoire. De plus, dans la signalisation calcique, plusieurs différences apparaissent. L'origine du calcium mobilisé est uniquement intracellulaire dans le cas de PF14 alors qu'il est à la fois intra- et extracellulaire dans le cas des MF. De même, les intégrines sont des récepteurs indispensables de cette signalisation chez PF14 alors qu'elles sont importantes dans le cas des MF mais non indispensables. Finalement, PF14 possède la particularité d'avoir un effet vasodilatateur sur un vaisseau sanguin intègre, alors qu'il

possède un effet vasoconstricteur en absence de l'endothélium sur des anneaux aortiques.

Ces différences entre ces 2 composés pourraient provenir de la différence de structure entre les 2 composés. PF14 est un fragment de la fibrilline-1 alors que les MF comportent différentes portions de la molécule de fibrilline-1, en plus de portions d'autres protéines associées à la fibrilline-1. L'effet des MF serait alors une résultante de plusieurs composés dont PF14, ces composés qui pourraient avoir des effets identiques ou bien alors des effets contradictoires résultant au final en l'effet observé.

Finalement, les différences d'effet de l'élastine et de la fibrilline-1 sur les voies de signalisation cellulaire que nous avons étudiées -en particulier la signalisation calcique- sont relativement restreintes, mis à part l'implication ou non du cytosquelette d'actine, qui est une différence très marquée. Ceci ne nous permet sans doute pas de résoudre l'énigme de la différence de symptômes entre les WBS et le MS, dans lesquels des déficiences pour l'élastine et la fibrilline-1 résultent en des symptômes contradictoires. Ces différences pourraient s'expliquer par une différence dans l'altération d'autres voies de signalisation que celles que nous avons étudiées. La voie du TGF β pourrait être une des voies envisagées : dans le cas du MS, on observe une altération de la fonction du TGF β qui, du fait du déficit en fibrilline-1, n'est plus autant recruté pour interagir avec la fibrilline-1 via le LTBP et est plus disponible pour activer ses récepteurs, induisant ainsi une hyperactivation de la voie de signalisation du TGF β (Neptune, Frischmeyer et al. 2003, Nataatmadja, West et al. 2006, Stheneur, Collod-Beroud et al. 2008, Carta, Wagenseil et al. 2009, Matsiko, Levingstone et al. 2012). Cependant, aucune étude n'a montré des résultats parallèles concernant d'autres voies de signalisation dans le cas du WBS. Cependant, en comparant la survenue des symptômes du WBS et du MS avec les effets observés avec les éléments connus de la signalisation de l'élastine et de la fibrilline-1, nous avons pu formuler une hypothèse pouvant expliquer la divergence des effets de ces deux pathologies.

3.8 Hypothèse d'explication de la différence des altérations présentes dans les syndromes de Williams-Beuren et de Marfan :

Les fonctions acquises par les cellules vasculaires pourraient être liées à la quantité présente de fibres élastiques matures et non à la quantité ou la qualité de l'élastine ou de la fibrilline-1 nouvellement synthétisée. Ces fonctions, étudiées dans nos travaux et dans des études menées par d'autres équipes, sont les fonctions de prolifération, d'adhésion, de différenciation et de synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire, fonctions contrôlées par des voies de signalisations intracellulaires multiples, dont la signalisation calcique.

Dans le cas du syndrome de Marfan, la déficience en fibrilline-1 implique un défaut de la sécrétion de cette dernière. Mais il est à remarquer aussi que l'effet de cette déficience

n'est pas restreint à celui de la synthèse de la fibrilline mais aussi à celui de la maturation des fibres élastiques. En effet, la fibrilline-1 est indispensable à l'homéostasie tissulaire (Pereira, Andrikopoulos et al. 1997). La déficience en fibrilline-1 empêche la formation de fibres élastiques normales. Elle fragilise les fibres élastiques qui deviennent plus fines, discontinues et plus susceptibles à des fractures et ce dès la période postnatale (Carta, Pereira et al. 2006). Ceci est dû principalement au rôle de la fibrilline-1 dans le dépôt de l'élastine qui peut-être synthétisée en cas d'absence de la fibrilline, mais en quantité plus restreinte (Mariko, Pezet et al. 2011), et surtout qui est mal déposée puisque son dépôt et l'assemblage des fibres élastiques est fonction en grande partie de la présence de la fibrilline-1. Le résultat est alors un déficit dans la formation de fibres élastiques dont le nombre diminue, la forme devient plus lisse et la fonctionnalité mécanique est modifiée. En effet, chez les souris déficientes en fibrilline-1 *Fbn-1 +/-mgΔ*, on observe une diminution de l'expression de la fibrilline et de l'élastine. De plus, la déficience en fibrilline-1 entraîne une diminution du nombre de lames élastiques dans la média de l'aorte de ces souris (Mariko, Pezet et al. 2011). Ces mêmes phénomènes sont observés chez les patients atteints du syndrome de Marfan (Halme, Savunen et al. 1985, Dingemans, Teeling et al. 2006). Par suite de la diminution de l'interaction globale fibres élastiques-cellules vasculaires, il pourrait en résulter une diminution du pouvoir prolifératif et du pouvoir adhésif des cellules vasculaires qui rentreraient alors en apoptose, comme cela a déjà été démontré (Chan 2005). De même, la diminution de l'activité des collagénases, démontrée par ce travail de thèse, impliquerait une accumulation du collagène fibrillaire comme déjà observé (Bunton, Biery et al. 2001, Urban, Riazzi et al. 2002). Il en résulte alors un amincissement pariétal et une dilatation aortique par apoptose cellulaire et par diminution de synthèse de matrice extracellulaire, ce qui est observé dans le MS.

En revanche, dans le cas du syndrome de Williams-Beuren, la déficience génétique de l'élastine implique en première intention une diminution de la synthèse de l'élastine mais pas de la fibrilline-1. La fibrilline-1 est ainsi synthétisée normalement (Urban, Riazzi et al. 2002) -à partir de stades de développement antérieurs à celui de la synthèse de l'élastine- et peut s'assembler en microfibrilles même si elles ne contiennent pas d'élastine. L'étude d'aortes des souris déficientes en élastine *Eln+/-* montre une diminution de l'expression de la tropoélastine, mais aussi une augmentation de l'expression de LOX, alors que les quantités de la LOXL-1, des fibrilline-1 et-2, de la fibuline-5 ou encore du collagène-1 sont inchangées. LOX est une protéine essentielle à l'établissement de liaisons croisées dans la molécule d'élastine et donc au dépôt et à l'assemblage stable de l'élastine. L'augmentation de la synthèse de LOX montre une tendance du vaisseau à rectifier le défaut de synthèse de l'élastine par une tentative de meilleur assemblage de la quantité synthétisée. La déficience en élastine n'aurait pas de grand effet sur le nombre de fibres élastiques matures mais plutôt sur la proportion d'élastine dans celles-ci. Ceci n'empêche pas les fibres élastiques de jouer leur rôle mécanique : un plus grand nombre de lames élastiques est synthétisé, leur structure est modifiée pour permettre la survie de l'organisme (Pezet, Jacob et al. 2008). De plus,

si les propriétés élastiques des tissus contenant des fibres élastiques sont majoritairement conférées par l'élastine, les microfibrilles peuvent contribuer également à ces caractéristiques : dans l'aorte de porc, les microfibrilles participent directement à la résistance de la paroi aux contraintes mécaniques et jouent un rôle important dans la modification de l'orientation des fibres élastiques (Lillie, David et al. 1998).

La déficience en élastine conduit aussi à une activation plus importante de la prolifération et l'adhésion cellulaire par une modification phénotypique des CMLV (Karnik, Brooke et al. 2003). De plus, nous avons montré que les microfibrilles et les fibres élastiques exercent une rétroaction positive sur les cellules vasculaires -ici les cellules endothéliales- en stimulant leur activité de synthèse de MEC, et surtout de fibres élastiques. Dans le cas du WBS, cette rétroaction positive pourrait-être de moins grande ampleur du fait de la moindre quantité d'élastine que les cellules peuvent sécréter, ce qui conduit à l'assemblage de lames élastiques plus fines, fenestrées et discontinues.

Notre hypothèse consiste alors à définir un équilibre entre fibres élastiques matures et composants des fibres élastiques libres. Lorsque le rapport fibres élastiques matures/ composants des fibres élastiques libres augmenterait, ceci stimulerait les fonctions cellulaires d'adhésion, de prolifération cellulaires et de synthèse de MEC comme dans le cas du syndrome de Williams-Beuren, alors que, quand ce rapport diminuerait, il ferait diminuer ces fonctions comme dans le cas du syndrome de Marfan. Cette hypothèse met en relief un mécanisme très important au cours de la biologie des fibres élastiques : la traduction des gènes des composants des fibres élastiques et la sécrétion de ces composants dans l'espace extracellulaire sont des mécanismes assez importants et indispensables dans la formation des fibres élastiques, mais ces mécanismes ne sont pas suffisants à eux seuls pour obtenir des fibres élastiques fonctionnelles. Il est nécessaire que toutes les étapes d'assemblage des fibres élastiques soient aussi réalisées.

4)Conclusions et perspectives

4.1 Fibres élastiques et physiologie des vaisseaux sanguins

Les composants des fibres élastiques sont capables d'interagir à la fois avec les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. Sur des anneaux aortiques de rats adultes, la rTE, la kE, les MF et PF14 induisent une vasodilatation médiée par l'endothélium. Le mécanisme d'action de cette relaxation implique l'activation de la NOS pour synthétiser le NO qui diffuse par la suite vers la média en interagissant avec les CMLV et en induisant la dilatation aortique. La signalisation impliquant cette activation a été étudiée lors de travaux précédents, qui ont montré que la kE et la rTE activent le complexe récepteur de l'élastine (ERC) pour induire cette vasodilatation (Faury, Ristori et al. 1995, Faury, Garnier et al. 1998). Nos présents travaux de thèse montrent des résultats discordants avec ces résultats antérieurs, puisqu'ici l'ERC n'est apparemment pas impliqué dans la vasorelaxation par la rTE, de même que dans la vasorelaxation induite par les MF et PF14. Il faut toutefois noter que les conditions d'étude étaient différentes entre ces deux séries d'études : rat femelles dans les études antérieures contre rats mâles ici, et perfusion par un liquide physiologique à tampon bicarbonate carboxygéné par bullage antérieurement contre un simple bain statique dans une solution physiologique à tampon HEPES sans O₂ ni CO₂ apportés par bullage ici. Au moins la baisse du niveau d'oxygénation et donc une éventuelle hypoxie des anneaux de vaisseau –et donc des cellules vasculaires- dans nos présents travaux pourrait fournir une explication à une mise en jeu d'une voie de signalisation alternative lorsque ces cellules étaient stimulées par la rTE. Il serait maintenant important d'étudier la signalisation impliquée dans cette activation de NOS et la synthèse du NO et de chercher de manière plus approfondie quel est/sont le ou les récepteurs mis en jeu dans les effets mis à jour au cours de cette thèse.

De plus, il est important de noter que, parmi les composés étudiés, PF14 possède la particularité d'induire, en absence d'endothélium aortique, une vasoconstriction via son interaction avec les CMLV. PF14 pourrait agir comme d'autres agents, par exemple l'acétylcholine (Andreasen, Kjoller et al. 1997), avec un mécanisme à double action contradictoire entre les cellules endothéliales (action vasodilatatrice) et les CMLV (action vasoconstrictrice). L'étude du mécanisme d'action de PF14 induisant cette vasoactivité nous permettrait de comparer de manière plus détaillée les effets de l'élastine et de la fibrilline et permettrait de mettre en valeur, le rôle et l'importance du contrôle du tonus vasculaire non pas par un mécanisme du système sympathique mais par des molécules effectuant ce contrôle via un deuxième mécanisme lié à la biologie des vaisseaux sanguins et en particulier aux processus de synthèse/dégradation des fibres élastiques. Aussi, des travaux antérieurs ayant montré que la vasodilatation induite par l'élastine est variable avec l'âge (Faury, Chabaud et al. 1997, Faury, Robert et al. 2003), c'est-à-dire qu'elle n'est efficace qu'à l'âge adulte et n'existe ni chez les animaux jeunes ni chez les animaux âgés, il serait important alors d'étudier si elle serait aussi variable pour les microfibrilles et la fibrilline-1.

4.2 Fibres élastiques et cellules endothéliales

En parallèle, sur des cellules endothéliales en culture, certains des composants des fibres élastiques utilisés dans cette thèse -rTE, le kE et PF14- ont été montrés comme étant capables d'augmenter la prolifération et l'adhésion cellulaire ainsi que la migration cellulaire. Les MF, pour leur part, diminuent ce taux de migration pour des cellules endothéliales adhérentes et non pas pour les cellules endothéliales en suspension. La différence d'action des MF entre les cellules adhérentes et en suspension est d'une importance physiologique et serait important à élucider dans les prochains travaux.

A ces modifications de fonctions cellulaires, s'ajoute l'augmentation du pouvoir de synthèse mais aussi de dégradation de certains composants de la MEC comme l'élastine, la fibrilline-1 et le collagène parla kE, la rTE, les MF et PF14. Les mécanismes de synthèse et de dégradation des composants de la MEC sont des mécanismes altérés lors de la déficience en élastine et en fibrilline-1 où on observe une accumulation du collagène, une diminution de la synthèse d'élastine et une variation de celle de la fibrilline-1 (Adams, Brooks et al. 1995, Vitarelli, Conde et al. 2006). De même, plusieurs MMP -comme les MMP- 2 et -9- se trouvent activées dans ces symptômes. La relation entre ces déficiences géniques et ces activations/inactivations enzymatiques pourraient être expliquées en partie par nos travaux, qui montrent une altération de l'expression de ces MMPs suite à l'ajout de nos composants. Cependant, des études ultérieures plus approfondies des mécanismes mis en jeu pourront expliquer si, dans les pathologies liées à l'élastine et à la fibrilline comme le WBS et le MS, l'activation des MMPs est une cause ou une résultante des perturbations dans la constitution des lames élastiques.

Tous les effets observés sur les cellules endothéliales dans ce travail de thèse sont médiés par des signalisations intracellulaires, dont la signalisation calcique étudiée en détails et complétant des résultats déjà publiés. Les composés étudiés induisent tous, dans les 2 minutes suivant leur ajout, une augmentation rapide en pics du niveau de calcium intracellulaire. Cette augmentation nécessite à la fois le calcium intra- et extracellulaire. La rTE, la kE, et les MF se lient à leurs 2 récepteurs, l'ERC et les intégrines $\alpha_v\beta_3$ pour la rTE et la kE, et $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ pour les MF. La synergie d'activité de ces 2 récepteurs est un phénomène démontré récemment pour l'élastine (Patel, Menon et al. 2011, Patel, Vandromme et al. 2012) mais qui n'était pas montrée pour les microfibrilles, pour laquelle l'importance de sa liaison avec l'ERC reste un phénomène à étudier plus en détails. Cette synergie suggère une liaison des 2 récepteurs dans l'activation de signaux intracellulaires par ces molécules. L'étude du mécanisme de cette synergie pourrait permettre d'affiner la connaissance du rôle de l'ERC aussi bien que celle du dialogue entre les récepteurs transmembranaires qui devient de plus en plus évident.

Les 2 récepteurs en synergie d'activité induisent des activations de médiateurs intracellulaires tels Src, Erk1/2 et la PLC et la production de l'IP3, activant par la suite l'activation de canaux calciques extracellulaires de plusieurs types dont les types T et L et des canaux calciques réticulaires type IP3R et RyR. Cette signalisation nécessite

l'intervention du cytosquelette d'actine pour les dérivés de l'élastine, la rTE et la kE alors qu'elle ne le nécessite pas pour les dérivés des microfibrilles, les MF et PF14, comme cela avait déjà été vu auparavant (Mariko, Ghandour et al. 2010). A notre connaissance, la démonstration d'une différence d'intervention du cytosquelette d'actine sur un même type cellulaire pour 2 composants activant à la fois le calcium intracellulaire et extracellulaire est nouvelle. Ceci pourrait changer alors la vision du rôle des microfilaments d'actine dans la signalisation calcique.

4.3 Fibres élastiques et cellules musculaires lisses vasculaires

Notre étude sur les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) s'est appuyée sur un modèle de CMLV mises en culture développé pour être applicable sur les aortes de souris de différents âges. L'étude des effets de la kE, rTE, MF et PF14 sur ces CMLV montre que celles là induisent une augmentation du signal calcique sur des CMLV isolées à partir de souris adultes. Mais cette réponse calcique est d'une forme différente que celle observée avec notre modèle de cellules endothéliales (HUVECs). La réponse est moins ample, les montées sont plus progressives et plus lentes.

Il serait important, dans le but de faire la comparaison entre les réponses des cellules endothéliales et des CMLV, de compléter les résultats des effets cellulaires induits par nos composés sur les CMLV (prolifération, migration, adhésion, synthèse et dégradation de la MEC). Certains résultats ont été déjà montrés et certains ont besoin d'être vérifiés. Par exemple, sur des CMLV en culture, l' α -élastine s'est montrée capable de diminuer la prolifération alors que la kE l'augmente (Ooyama, Fukuda et al. 1987, Ito, Ishimaru et al. 1997). Ceci pourrait être dû ou bien à une différence dans le protocole d'étude ou bien aussi à une différence entre les effets de l' α -élastine et de la k-élastine, qui sont toutes les deux des produits issus de la dégradation acide (α -élastine) et par KOH (k-élastine) de l'élastine. Si cette différence d'effet était avérée, elle pourrait ouvrir la voie à de nombreuses hypothèses concernant les différents effets de l'élastine suivant la conformation dans laquelle se présente cette molécule. Ceci pourrait aussi suggérer des différences d'effets entre l'élastine et les microfibrilles des fibres élastiques matures, les fragments d'élastine et de fibrilline-1 circulants dans le sang de certains patients ou les dépôts d'élastine observés dans le cas de certaines pathologies comme le WBS (Urban, Riazi et al. 2002).

4.4 Fibres élastiques et vieillissement normal et pathologique (cas du WBS et du MS)

L'augmentation du signal calcique dans les CMLV n'est pas stable avec l'âge. Pour la rTE, la kE et PF14, cette signalisation n'est pas présente à l'âge de 1-2 mois et atteint son maximum à l'âge de 6-8 mois, diminue à 12-15 mois et disparaît à 24 mois. En revanche, pour les MF, l'efficacité de la signalisation débute plus tôt : à l'âge de 1-2 mois, elle est

déjà présente puis atteint son maximum à l'âge de 6-8 mois et n'apparaît plus à l'âge de 12-15 mois. Par manque d'animaux âgés, le groupe des souris âgées de 24 mois n'a pas pu être étudié systématiquement et cette partie d'étude serait donc à compléter.

La disparition du signal calcique de ces composés avec l'âge pourrait être un symptôme du vieillissement. L'absence de ces signaux chez les souris adultes déficientes en élastine appuierait l'hypothèse d'un type de vieillissement précoce en cas de déficience en élastine et du syndrome de Williams-Beuren. Dans le cas de souris déficientes à la fibrilline-1, modèle murin du syndrome de Marfan, ces signaux existent à l'âge adulte mais sont moins importants que ceux observés chez les souris sauvages du même âge. Ceci pourrait être aussi en relation avec un vieillissement précoce dans le cas de cette déficience. L'étude de l'évolution des mécanismes conduisant à la production de signaux calciques avec l'âge dans les CMLV chez la souris normale pourrait permettre d'expliquer si cette absence/perde de réponse calcique dans ces deux modèles murins de WBS et MS est liée à un vieillissement précoce ou bien à un autre mode d'altération du système de signalisation. Aussi, une étude similaire sur des cellules endothéliales vasculaires de patients atteints de WB et de MS ou bien isolées à partir de modèles murins de ces deux pathologies serait importante pour déterminer si une altération de la réponse cellulaire à différentes molécules dont ces composés étudiés, mais aussi l'acétylcholine et la phényléphrine, atteint aussi bien les cellules endothéliales que les CMLV.

La comparaison des effets observés entre les dérivés de l'élastine d'une part, à savoir la kE et la rTE, et ceux des microfibrilles d'autre part montrent curieusement une forte proximité entre eux. Ceci ne permet donc pas à ce stade d'expliquer la contradiction des symptômes observés dans le cas de syndromes liés à des déficiences en élastine et en fibrilline-1, comme les syndromes de Williams-Beuren et de Marfan. La contradiction des mécanismes survenant lors de ces déficiences ne pourrait pas être expliquée par la différence des mécanismes d'action de ces composants, nous avons postulé alors une hypothèse expliquant cette différence. La résultante des effets de signalisation cellulaire des fibres élastiques pourrait être en lien avec le rapport fibres élastiques matures / composants des fibres élastiques libres. L'effet des fibres élastiques matures serait différent de celui des composants isolés des fibres élastiques, et la survenance des symptômes pourrait être fonction de ce rapport. En cas de déficience en fibrilline-1, cette déficience ne toucherait pas seulement l'intégration des molécules de fibrilline-1 dans les fibres élastiques, mais aussi celui des molécules d'élastine dans ces fibres, puisque le mécanisme d'assemblage de l'élastine est dépendant de la pré-existence d'un squelette microfibrillaire incluant la fibrilline-1. La résultante de la déficience en fibrilline-1 est donc une diminution du rapport cité plus haut et la survenance des symptômes observés. Par contre, en cas de déficience en élastine, les molécules de fibrilline-1 peuvent indépendamment s'assembler en microfibrilles qui peuvent jouer les rôles des fibres élastiques même en absence de l'élastine.

La vérification de cette hypothèse reste à réaliser, plusieurs stratégies étant possibles pour y parvenir. Premièrement, il est aussi possible que des voies de signalisation autres que celles que nous avons étudiées dans cette thèse soient déclenchées de manière différentielle dans les cellules vasculaires par les composants microfibrillaires et par l'élastine. D'autres voies seraient donc à investiguer, comme celle du VEGF ou de la NFκB. En parallèle pourrait être envisagée l'étude *in vitro* des surexpressions ou des inhibitions de l'expression des facteurs extracellulaires intervenant lors de l'assemblage ou la dégradation des fibres élastiques (comme le récepteur de l'élastine, les enzymes de la famille LOX, la fibuline-5, ...). La modulation de la présence de ces facteurs pourraient avoir des conséquences importantes sur les fonctions cellulaires des cellules vasculaires telles que la prolifération, la différenciation, la migration, l'adhésion et la synthèse et la dégradation de la MEC, et pourrait donner une idée plus claire de la différence d'effet entre fibres élastiques matures/intègres ou dégradées, c'est à dire dans ce dernier cas les effets isolés des composants des fibres élastiques. Enfin, *in vivo*, l'étude approfondie des dysfonctions vasculaires et les altérations de la MEC observées dans le modèle murin à double mutation de l'élastine et de la fibrilline-1 (dHet), comparé aux modèles de déficience simple en élastine (Eln+/-) ou en fibrilline-1 (Fbn-1 +/-mgΔ), a permis d'établir que des niveaux seuils d'élastine et de fibrilline-1 -différents suivant le type d'artère- sont nécessaire pour maintenir une mécanique vasculaire normale (Ye, Kim et al. 2011). L'étude des voies de signalisation des cellules (endothéliales et CMLV en culture) de ces souris dHet permettrait de mieux comprendre les rôles respectifs de ces 2 molécules dans la fonction vasculaire. On pourrait par exemple envisager d'observer si la double mutation induit une rétroaction négative sur les deux voies de signalisation (élastine et MF), en particulier sur la présence et l'activation des récepteurs de l'élastine et des MF.

L'exploration de ces questions et hypothèses pourrait permettre de vérifier si, en parallèle de la voie des thérapies géniques, une nouvelle stratégie pharmacothérapeutique ciblant la signalisation altérée des composants des fibres élastiques, dans les deux syndromes de Williams-Beuren et de Marfan, pourrait s'avérer efficace dans la prévention ou le traitement de ces pathologies.

En conclusion, les fibres élastiques ne sont pas des composants inertes au niveau tissulaire, en particulier dans les vaisseaux sanguins. Elles participent à de nombreux mécanismes cellulaires et matriciels, et elles interviennent dans la définition de l'équilibre cellule-matrice au sein des différentes couches du vaisseau. Il a déjà été montré que les composants des fibres élastiques jouent des rôles en partie opposés, mais aussi et surtout, comme je l'ai montré au cours de ma thèse, complémentaires. Certains de ces résultats ont été exposés dans une revue dont je suis co-auteur et qui est présentée dans le chapitre « Annexe ».

5) Références Bibliographiques:

1. Abdu, T. A., T. Elhadd, M. Pfeifer and R. N. Clayton (2001). "Endothelial dysfunction in endocrine disease." Trends Endocrinol Metab **12**(6): 257-265.
2. Adams, J. N., M. Brooks, T. W. Redpath, F. W. Smith, J. Dean, J. Gray, S. Walton and R. J. Trent (1995). "Aortic distensibility and stiffness index measured by magnetic resonance imaging in patients with Marfan's syndrome." Br Heart J **73**(3): 265-269.
3. Aghajanian, A., E. S. Wittchen, M. J. Allingham, T. A. Garrett and K. Burridge (2008). "Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration." J Thromb Haemost **6**(9): 1453-1460.
4. Albig, A. R., D. J. Becenti, T. G. Roy and W. P. Schiemann (2008). "Microfibril-associate glycoprotein-2 (MAGP-2) promotes angiogenic cell sprouting by blocking notch signaling in endothelial cells." Microvasc Res **76**(1): 7-14.
5. Albig, A. R. and W. P. Schiemann (2004). "Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells." DNA Cell Biol **23**(6): 367-379.
6. Andreasen, P. A., L. Kjoller, L. Christensen and M. J. Duffy (1997). "The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review." Int J Cancer **72**(1): 1-22.
7. Annes, J. P., Y. Chen, J. S. Munger and D. B. Rifkin (2004). "Integrin alphaVbeta6-mediated activation of latent TGF-beta requires the latent TGF-beta binding protein-1." J Cell Biol **165**(5): 723-734.
8. Antonicelli, F., G. Bellon, L. DeBelle and W. Hornebeck (2007). "Elastin-elastases and inflammation." Curr Top Dev Biol **79**: 99-155.
9. Apte, S. S., M. G. Mattei and B. R. Olsen (1994). "Cloning of the cDNA encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and mapping of the TIMP3 gene to chromosome 22." Genomics **19**(1): 86-90.
10. Arcangeli, A. and A. Becchetti (2010). "Integrin structure and functional relation with ion channels." Adv Exp Med Biol **674**: 1-7.
11. Armulik, A., A. Abramsson and C. Betsholtz (2005). "Endothelial/pericyte interactions." Circ Res **97**(6): 512-523.
12. Arnal, J. F., A. T. Dinh-Xuan, M. Pueyo, B. Darblade and J. Rami (1999). "Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology." Cell Mol Life Sci **55**(8-9): 1078-1087.
13. Arribas, S. M., A. Hinek and M. C. Gonzalez (2006). "Elastic fibres and vascular structure in hypertension." Pharmacol Ther **111**(3): 771-791.
14. Arteaga-Solis, E., B. Gayraud and F. Ramirez (2000). "Elastic and collagenous networks in vascular diseases." Cell Struct Funct **25**(2): 69-72.
15. Augier, T., P. Charpiot, C. Chareyre, M. Remusat, P. H. Rolland and D. Garcon (1997). "Medial elastic structure alterations in atherosclerotic arteries in minipigs: plaque proximity and arterial site specificity." Matrix Biol **15**(7): 455-467.
16. Badesch, D. B., P. D. Lee, W. C. Parks and K. R. Stenmark (1989). "Insulin-like growth factor I stimulates elastin synthesis by bovine pulmonary arterial smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **160**(1): 382-387.
17. Baile, E. M. (1996). "The anatomy and physiology of the bronchial circulation." J Aerosol Med **9**(1): 1-6.
18. Bailey, M., S. Pillarisetti, P. Jones, H. Xiao, D. Simionescu and N. Vyavahare (2004). "Involvement of matrix metalloproteinases and tenascin-C in elastin calcification." Cardiovasc Pathol **13**(3): 146-155.
19. Bakker, E. N., E. T. van der Meulen, B. M. van den Berg, V. Everts, J. A. Spaan and E. VanBavel (2002). "Inward remodeling follows chronic vasoconstriction in isolated resistance arteries." J Vasc Res **39**(1): 12-20.
20. Bakris, G. L., A. J. Bank, D. A. Kass, J. M. Neutel, R. A. Preston and S. Oparil (2004). "Advanced glycation end-product cross-link breakers. A novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process." Am J Hypertens **17**(12 Pt 2): 23S-30S.
21. Baldwin, A. L. and G. Thurston (2001). "Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability." Crit Rev Biomed Eng **29**(2): 247-278.
22. Barondes, S. H., D. N. Cooper, M. A. Gitt and H. Leffler (1994). "Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins." J Biol Chem **269**(33): 20807-20810.

23. Barrett, A. J. (1994). "Classification of peptidases." Methods Enzymol **244**: 1-15.
24. Barrett, A. J. and N. D. Rawlings (1995). "Families and clans of serine peptidases." Arch Biochem Biophys **318**(2): 247-250.
25. Barron, D. A., A. Kumar and A. M. (2002). "The role of mechanical stress in skeletal myocytes: MAPK signal transduction pathways." Reviews in Undergraduate Research **1**: 8-20.
26. Basalyga, D. M., D. T. Simionescu, W. Xiong, B. T. Baxter, B. C. Starcher and N. R. Vyavahare (2004). "Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases." Circulation **110**(22): 3480-3487.
27. Bashir, M. M., Z. Indik, H. Yeh, N. Ornstein-Goldstein, J. C. Rosenbloom, W. Abrams, M. Fazio, J. Uitto and J. Rosenbloom (1989). "Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region." J Biol Chem **264**(15): 8887-8891.
28. Bax, D. V., S. E. Bernard, A. Lomas, A. Morgan, J. Humphries, C. A. Shuttleworth, M. J. Humphries and C. M. Kielty (2003). "Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins." J Biol Chem **278**(36): 34605-34616.
29. Bax, D. V., Y. Mahalingam, S. Cain, K. Melody, L. Freeman, K. Younger, C. A. Shuttleworth, M. J. Humphries, J. R. Couchman and C. M. Kielty (2007). "Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation." J Cell Sci **120**(Pt 8): 1383-1392.
30. Bax, D. V., U. R. Rodgers, M. M. Bilek and A. S. Weiss (2009). "Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRK motif and integrin alphaVbeta3." J Biol Chem **284**(42): 28616-28623.
31. Baxter, B. T. (2005). "Heritable diseases of the blood vessels." Cardiovasc Pathol **14**(4): 185-188.
32. Bayless, K. J., G. A. Meininger, J. M. Scholtz and G. E. Davis (1998). "Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin." J Cell Sci **111 (Pt 9)**: 1165-1174.
33. Belkin, A. M. and M. A. Stepp (2000). "Integrins as receptors for laminins." Microsc Res Tech **51**(3): 280-301.
34. Bendeck, M. P. and B. L. Langille (1991). "Rapid accumulation of elastin and collagen in the aortas of sheep in the immediate perinatal period." Circ Res **69**(4): 1165-1169.
35. Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). "Signal transduction. The calcium entry pas de deux." Science **287**(5458): 1604-1605.
36. Beuren, A. J., J. Apitz and D. Harmjanz (1962). "Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance." Circulation **26**: 1235-1240.
37. Bird, G. S., O. Aziz, J. P. Lievreumont, B. J. Wedel, M. Trebak, G. Vazquez and J. W. Putney, Jr. (2004). "Mechanisms of phospholipase C-regulated calcium entry." Curr Mol Med **4**(3): 291-301.
38. Birk, R. Z., E. Burstein and A. Wiznitzer (2005). "Placental angiopoietin-1 and angiopoietin-2 expression and correlation with birth weight in twins." J Matern Fetal Neonatal Med **17**(5): 337-342.
39. Bisaccia, F., M. A. Castiglione-Morelli, S. Spisani, A. Ostuni, A. Serafini-Fracassini, A. Bavoso and A. M. Tamburro (1998). "The amino acid sequence coded by the rarely expressed exon 26A of human elastin contains a stable beta-turn with chemotactic activity for monocytes." Biochemistry **37**(31): 11128-11135.
40. Bizbiz, L., A. Alperovitch and L. Robert (1997). "Aging of the vascular wall: serum concentration of elastin peptides and elastase inhibitors in relation to cardiovascular risk factors. The EVA study." Atherosclerosis **131**(1): 73-78.
41. Blanchevoye, C., N. Floquet, A. Scandolera, S. Baud, P. Maurice, O. Bocquet, S. Blaise, C. Ghoneim, B. Cantarelli, F. Delacoux, M. Dauchez, R. G. Efremov, L. Martiny, L. Duca and L. Debelle (2013). "Interaction between the elastin peptide VGVAPG and human elastin binding protein." J Biol Chem **288**(2):1317-1328.
42. Bochaton-Piallat, M. L. and G. Gabbiani (2005). "Modulation of smooth muscle cell proliferation and migration: role of smooth muscle cell heterogeneity." Handb Exp Pharmacol **170**: 645-663.
43. Bode, W., E. Meyer, Jr. and J. C. Powers (1989). "Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors." Biochemistry **28**(5): 1951-1963.

44. Boldt, H. B., M. T. Overgaard, L. S. Laursen, K. Weyer, L. Sottrup-Jensen and C. Oxvig (2001). "Mutational analysis of the proteolytic domain of pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A): classification as a metzincin." *Biochem J* **358**(Pt 2): 359-367.
45. Bonnefoy, A. and C. Legrand (2000). "Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase." *Thromb Res* **98**(4): 323-332.
46. Bonnet, J. (2000). "Athérosclérose et Biologie vasculaire." *la lettre du cardiologue* **323**: 24-28.
47. Booms, P., A. Ney, F. Barthel, G. Moroy, D. Counsell, C. Gille, G. Guo, R. Pregla, S. Mundlos, A. J. Alix and P. N. Robinson (2006). "A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational analysis." *J Mol Cell Cardiol* **40**(2): 234-246.
48. Booms, P., R. Pregla, A. Ney, F. Barthel, D. P. Reinhardt, A. Pletschacher, S. Mundlos and P. N. Robinson (2005). "RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: a potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome." *Hum Genet* **116**(1-2): 51-61.
49. Booms, P., F. Tiecke, T. Rosenberg, C. Hagemeyer and P. N. Robinson (2000). "Differential effect of FBN1 mutations on in vitro proteolysis of recombinant fibrillin-1 fragments." *Hum Genet* **107**(3): 216-224.
50. Botney, M. D., W. C. Parks, E. C. Crouch, K. Stenmark and R. P. Mecham (1992). "Transforming growth factor-beta 1 is decreased in remodeling hypertensive bovine pulmonary arteries." *J Clin Invest* **89**(5): 1629-1635.
51. Boutouyrie, P., A.-I. Tropeano and S. Laurent (2005). "Remodelage artériel dans le diabète." *Sang Thrombose Vaisseaux* **17**(1): 14-22.
52. Brandes, R. P., I. Fleming and R. Busse (2005). "Endothelial aging." *Cardiovasc Res* **66**(2): 286-294.
53. Brew, K., D. Dinakarandian and H. Nagase (2000). "Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function." *Biochim Biophys Acta* **1477**(1-2): 267-283.
54. Brodsky, B. and A. V. Persikov (2005). "Molecular structure of the collagen triple helix." *Adv Protein Chem* **70**: 301-339.
55. Brown-Augsburger, P., T. Broekelmann, L. Mecham, R. Mercer, M. A. Gibson, E. G. Cleary, W. R. Abrams, J. Rosenbloom and R. P. Mecham (1994). "Microfibril-associated glycoprotein binds to the carboxyl-terminal domain of tropoelastin and is a substrate for transglutaminase." *J Biol Chem* **269**(45): 28443-28449.
56. Bunton, T. E., N. J. Biery, L. Myers, B. Gayraud, F. Ramirez and H. C. Dietz (2001). "Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome." *Circ Res* **88**(1): 37-43.
57. Cain, S. A., C. Baldock, J. Gallagher, A. Morgan, D. V. Bax, A. S. Weiss, C. A. Shuttleworth and C. M. Kielty (2005). "Fibrillin-1 interactions with heparin. Implications for microfibril and elastic fiber assembly." *J Biol Chem* **280**(34): 30526-30537.
58. Calalb, M. B., T. R. Polte and S. K. Hanks (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**(2): 954-963.
59. Campbell, G. R. and J. H. Campbell (1990). "The phenotypes of smooth muscle expressed in human atheroma." *Ann N Y Acad Sci* **598**: 143-158.
60. Campbell, I. D. and M. J. Humphries (2011). "Integrin structure, activation, and interactions." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(3).
61. Canty, E. G. and K. E. Kadler (2005). "Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis." *J Cell Sci* **118**(Pt 7): 1341-1353.
62. Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* **6**(4): 389-395.
63. Carmeliet, P., N. Mackman, L. Moons, T. Luther, P. Gressens, I. Van Vlaenderen, H. Demunck, M. Kasper, G. Breier, P. Evrard, M. Muller, W. Risau, T. Edgington and D. Collen (1996). "Role of tissue factor in embryonic blood vessel development." *Nature* **383**(6595): 73-75.

64. Carmichael, D. F., A. Sommer, R. C. Thompson, D. C. Anderson, C. G. Smith, H. G. Welgus and G. P. Stricklin (1986). "Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(8): 2407-2411.
65. Carta, L., L. Pereira, E. Arteaga-Solis, S. Y. Lee-Arteaga, B. Lenart, B. Starcher, C. A. Merkel, M. Sukoyan, A. Kerkis, N. Hazeki, D. R. Keene, L. Y. Sakai and F. Ramirez (2006). "Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development." J Biol Chem **281**(12): 8016-8023.
66. Carta, L., J. E. Wagenseil, R. H. Knutsen, B. Mariko, G. Faury, E. C. Davis, B. Starcher, R. P. Mecham and F. Ramirez (2009). "Discrete contributions of elastic fiber components to arterial development and mechanical compliance." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(12): 2083-2089.
67. Chan, A. (2005). "Teaching resources. Ras-MAPK pathways." Sci STKE **2005**(271): tr5.
68. Chan, S. H., J. M. Yee Ko, K. W. Chan, Y. P. Chan, Q. Tao, M. Hyytiainen, J. Keski-Oja, S. Law, G. Srivastava, J. Tang, S. W. Tsao, H. Chen, E. J. Stanbridge and M. L. Lung (2011). "The ECM protein LTBP-2 is a suppressor of esophageal squamous cell carcinoma tumor formation but higher tumor expression associates with poor patient outcome." Int J Cancer **129**(3): 565-573.
69. Chang, H. Y., J. T. Chi, S. Dudoit, C. Bondre, M. van de Rijn, D. Botstein and P. O. Brown (2002). "Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12877-12882.
70. Chapman, R. L., S. E. Kane and A. H. Erickson (1997). "Abnormal glycosylation of procathepsin L due to N-terminal point mutations correlates with failure to sort to lysosomes." J Biol Chem **272**(13): 8808-8816.
71. Charbonneau, N. L., B. J. Dzamba, R. N. Ono, D. R. Keene, G. M. Corson, D. P. Reinhardt and L. Y. Sakai (2003). "Fibrillins can co-assemble in fibrils, but fibrillin fibril composition displays cell-specific differences." J Biol Chem **278**(4): 2740-2749.
72. Charpiot, P., A. Bescond, T. Augier, C. Chareyre, M. Fraternali, P. H. Rolland and D. Garcon (1998). "Hyperhomocysteinemia induces elastolysis in minipig arteries: structural consequences, arterial site specificity and effect of captopril-hydrochlorothiazide." Matrix Biol **17**(8-9): 559-574.
73. Chaudhry, S. S., S. A. Cain, A. Morgan, S. L. Dallas, C. A. Shuttleworth and C. M. Kielty (2007). "Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1." J Cell Biol **176**(3): 355-367.
74. Chen, Q., H. J. Millar, F. L. McCabe, C. D. Manning, R. Steeves, K. Lai, B. Kellogg, R. J. Lutz, M. Trikha, M. T. Nakada and G. M. Anderson (2007). "Alphav integrin-targeted immunoconjugates regress established human tumors in xenograft models." Clin Cancer Res **13**(12): 3689-3695.
75. Cheng, X. W., K. Obata, M. Kuzuya, H. Izawa, K. Nakamura, E. Asai, T. Nagasaka, M. Saka, T. Kimata, A. Noda, K. Nagata, H. Jin, G. P. Shi, A. Iguchi, T. Murohara and M. Yokota (2006). "Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure." Hypertension **48**(5): 979-987.
76. Christensen, K. L. and M. J. Mulvany (2001). "Location of resistance arteries." J Vasc Res **38**(1): 1-12.
77. Chung, A. W., K. Au Yeung, S. F. Cortes, G. G. Sandor, D. P. Judge, H. C. Dietz and C. van Breemen (2007). "Endothelial dysfunction and compromised eNOS/Akt signaling in the thoracic aorta during the progression of Marfan syndrome." Br J Pharmacol **150**(8): 1075-1083.
78. Cirillo, M., D. Stellato, M. Laurenzi, W. Panarelli, A. Zanchetti and N. G. De Santo (2000). "Pulse pressure and isolated systolic hypertension: association with microalbuminuria. The GUBBIO Study Collaborative Research Group." Kidney Int **58**(3): 1211-1218.
79. Clark, J. M. and S. Glagov (1985). "Transmural organization of the arterial media. The lamellar unit revisited." Arteriosclerosis **5**(1): 19-34.
80. Sanderson C.M. and Smith G.L. (1999). "Cell motility and cell morphology: how some viruses take control." Expert Rev Mol Med(1): 1-16.
81. Cornillon, J., L. Campos and D. Guyotat (2003). "[Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]." Med Sci (Paris) **19**(6-7): 743-752.

82. Corson, G. M., N. L. Charbonneau, D. R. Keene and L. Y. Sakai (2004). "Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues." Genomics **83**(3): 461-472.
83. Cottart, C. H., C. Laguillier, V. Nivet-Antoine, C. Klimczak, C. Sebban and J. L. Beaudoux (2009). "[Biology of arterial ageing and arteriosclerosis]." C R Biol **332**(5): 433-447.
84. Crawford, S. E., V. Stellmach, J. E. Murphy-Ullrich, S. M. Ribeiro, J. Lawler, R. O. Hynes, G. P. Boivin and N. Bouck (1998). "Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo." Cell **93**(7): 1159-1170.
85. Dallas, S. L., P. Sivakumar, C. J. Jones, Q. Chen, D. M. Peters, D. F. Mosher, M. J. Humphries and C. M. Kielty (2005). "Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1." J Biol Chem **280**(19): 18871-18880.
86. Damiano, V., A. Tsang, G. Weinbaum, P. Christner and J. Rosenbloom (1984). "Secretion of elastin in the embryonic chick aorta as visualized by immunoelectron microscopy." Coll Relat Res **4**(2): 153-164.
87. Davidson, J. M., P. A. LuValle, O. Zoia, D. Quaglino, Jr. and M. Giro (1997). "Ascorbate differentially regulates elastin and collagen biosynthesis in vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by pretranslational mechanisms." J Biol Chem **272**(1): 345-352.
88. Davidson, J. M., O. Zoia and J. M. Liu (1993). "Modulation of transforming growth factor-beta 1 stimulated elastin and collagen production and proliferation in porcine vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-alpha, and insulin-like growth factor-I." J Cell Physiol **155**(1): 149-156.
89. Davies, P. F. (1995). "Flow-mediated endothelial mechanotransduction." Physiol Rev **75**(3): 519-560.
90. Davis, E. C. (1993). "Endothelial cell connecting filaments anchor endothelial cells to the subjacent elastic lamina in the developing aortic intima of the mouse." Cell Tissue Res **272**(2): 211-219.
91. Davis, E. C. (1994). "Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta." J Cell Sci **107 (Pt 3)**: 727-736.
92. Davis, E. C. (1995). "Elastic lamina growth in the developing mouse aorta." J Histochem Cytochem **43**(11): 1115-1123.
93. Davis, E. C., S. A. Blattel and R. P. Mecham (1999). "Remodeling of elastic fiber components in scleroderma skin." Connect Tissue Res **40**(2): 113-121.
94. de Graaf, J. C., J. D. Banga, S. Moncada, R. M. Palmer, P. G. de Groot and J. J. Sixma (1992). "Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions." Circulation **85**(6): 2284-2290.
95. de Luis, O., M. C. Valero and L. A. Jurado (2000). "WBSCR14, a putative transcription factor gene deleted in Williams-Beuren syndrome: complete characterisation of the human gene and the mouse ortholog." Eur J Hum Genet **8**(3): 215-222.
96. Debelle, L. and A. M. Tamburro (1999). "Elastin: molecular description and function." Int J Biochem Cell Biol **31**(2): 261-272.
97. Dejana, E., M. Corada and M. G. Lampugnani (1995). "Endothelial cell-to-cell junctions." FASEB J **9**(10): 910-918.
98. Dejana, E., F. Orsenigo, C. Molendini, P. Baluk and D. M. McDonald (2009). "Organization and signaling of endothelial cell-to-cell junctions in various regions of the blood and lymphatic vascular trees." Cell Tissue Res **335**(1): 17-25.
99. Denda, S., U. Muller, K. L. Crossin, H. P. Erickson and L. F. Reichardt (1998). "Utilization of a soluble integrin-alkaline phosphatase chimera to characterize integrin alpha 8 beta 1 receptor interactions with tenascin: murine alpha 8 beta 1 binds to the RGD site in tenascin-C fragments, but not to native tenascin-C." Biochemistry **37**(16): 5464-5474.
100. Deng, G., S. A. Curriden, S. Wang, S. Rosenberg and D. J. Loskutoff (1996). "Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?" J Cell Biol **134**(6): 1563-1571.
101. Denninger, J. W. and M. A. Marletta (1999). "Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 334-350.

102. Dietz, H. C. and R. E. Pyeritz (1995). "Mutations in the human gene for fibrillin-1 (FBN1) in the Marfan syndrome and related disorders." Hum Mol Genet **4 Spec No**: 1799-1809.
103. Dietz, H. C., R. E. Pyeritz, B. D. Hall, R. G. Cadle, A. Hamosh, J. Schwartz, D. A. Meyers and C. A. Francomano (1991). "The Marfan syndrome locus: confirmation of assignment to chromosome 15 and identification of tightly linked markers at 15q15-q21.3." Genomics **9**(2): 355-361.
104. Dimmeler, S., I. Fleming, B. Fisslthaler, C. Hermann, R. Busse and A. M. Zeiher (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-605.
105. Dingemans, K. P., P. Teeling, A. C. van der Wal and A. E. Becker (2006). "Ultrastructural pathology of aortic dissections in patients with Marfan syndrome: Comparison with dissections in patients without Marfan syndrome." Cardiovasc Pathol **15**(4): 203-212.
106. Dridi, S. M., A. Foucault Bertaud, S. Igondjo Tchen, K. Senni, A. L. Ejeil, B. Pellat, S. Lyonnet, D. Bonnet, P. Charpiot and G. Godeau (2005). "Vascular wall remodeling in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams Beuren syndrome." J Vasc Res **42**(3): 190-201.
107. Duca, L., L. Debelle, R. Debret, F. Antonicelli, W. Hornebeck and B. Haye (2002). "The elastin peptides-mediated induction of pro-collagenase-1 production by human fibroblasts involves activation of MEK/ERK pathway via PKA- and PI(3)K-dependent signaling." FEBS Lett **524**(1-3): 193-198.
108. Dvorak, H. F., M. Detmar, K. P. Claffey, J. A. Nagy, L. van de Water and D. R. Senger (1995). "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation." Int Arch Allergy Immunol **107**(1-3): 233-235.
109. Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." Nat Rev Cancer **2**(3): 161-174.
110. Eide, B. L., C. W. Turck and J. A. Escobedo (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**(5): 2819-2827.
111. Ely, J. T. (2004). "Aneurysm: prevention and nonsurgical repair." Med Sci Monit **10**(1): HY1-4.
112. Enzerink, A. and A. Vaheri (2011). "Fibroblast activation in vascular inflammation." J Thromb Haemost **9**(4): 619-626.
113. Essalihi, R., H. H. Dao, N. Yamaguchi and P. Moreau (2003). "A new model of isolated systolic hypertension induced by chronic warfarin and vitamin K1 treatment." Am J Hypertens **16**(2): 103-110.
114. Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." Nature **420**(6916): 629-635.
115. Ewart, A. K., C. A. Morris, G. J. Ensing, J. Loker, C. Moore, M. Leppert and M. Keating (1993). "A human vascular disorder, supravalvular aortic stenosis, maps to chromosome 7." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3226-3230.
116. Fahem, A., A. Robinet, J. H. Cauchard, L. Duca, M. Soula-Rothhut, B. Rothhut, C. Soria, M. Guenounou, W. Hornebeck and G. Bellon (2008). "Elastokine-mediated up-regulation of MT1-MMP is triggered by nitric oxide in endothelial cells." Int J Biochem Cell Biol **40**(8): 1581-1596.
117. Falk, S., N. Oulianova and A. Berteloot (1999). "Kinetic mechanisms of inhibitor binding: relevance to the fast-acting slow-binding paradigm." Biophys J **77**(1): 173-188.
118. Fanzani, A., R. Giuliani, F. Colombo, S. Rossi, E. Stoppani, W. Martinet, A. Preti and S. Marchesini (2008). "The enzymatic activity of sialidase Neu2 is inversely regulated during in vitro myoblast hypertrophy and atrophy." Biochem Biophys Res Commun **370**(2): 376-381.
119. Farhi, L. E. and D. W. Sheehan (1990). "Pulmonary circulation and systemic circulation: similar problems, different solutions." Adv Exp Med Biol **277**: 579-586.
120. Faury, G. (2001). "Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres." Pathol Biol (Paris) **49**(4): 310-325.
121. Faury, G., A. Chabaud, M. T. Ristori, L. Robert and J. Verdetti (1997). "Effect of age on the vasodilatory action of elastin peptides." Mech Ageing Dev **95**(1-2): 31-42.

122. Faury, G., S. Garnier, A. S. Weiss, J. Wallach, T. Fulop, Jr., M. P. Jacob, R. P. Mecham, L. Robert and J. Verdetti (1998). "Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells." Circ Res **82**(3): 328-336.
123. Faury, G., M. T. Ristori, J. Verdetti, M. P. Jacob and L. Robert (1995). "Effect of elastin peptides on vascular tone." J Vasc Res **32**(2): 112-119.
124. Faury, G., L. Robert and J. Verdetti (2003). "The age-dependent vasodilatation and endothelial calcium influx induced by elastin peptides are modulated by extracellular glucose level." Biomed Pharmacother **57**(5-6): 216-222.
125. Faury, G., Y. Usson, M. Robert-Nicoud, L. Robert and J. Verdetti (1998). "Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2967-2972.
126. Fazio, M. J., M. G. Mattei, E. Passage, M. L. Chu, D. Black, E. Solomon, J. M. Davidson and J. Uitto (1991). "Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7." Am J Hum Genet **48**(4): 696-703.
127. Felding-Habermann, B. and D. A. Cheresh (1993). "Vitronectin and its receptors." Curr Opin Cell Biol **5**(5): 864-868.
128. Ferrara, N. (1999). "Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor." J Mol Med (Berl) **77**(7): 527-543.
129. Fink, G. D. (2005). "Hypothesis: the systemic circulation as a regulated free-market economy. A new approach for understanding the long-term control of blood pressure." Clin Exp Pharmacol Physiol **32**(5-6): 377-383.
130. Fornieri, C., F. Taparelli, D. Quaglino, Jr., M. B. Contri, J. M. Davidson, S. Algeri and I. P. Ronchetti (1999). "The effect of caloric restriction on the aortic tissue of aging rats." Connect Tissue Res **40**(2): 131-143.
131. Fox, S. I. (1994). "Human Physiology." Wm. C. Brown Publishers., Dubuque, Iowa **4**.
132. Frederic H. Martini, J. L. N., Edwin F. Bartholomew (2004). "Fundamentals of Anatomy and Physiology."
133. Fuh, G. M., K. Bensch, M. A. Karasek and R. H. Kramer (1986). "Synthesis of basement membrane-specific macromolecules by cultured human microvascular endothelial cells isolated from skin of diabetic and nondiabetic subjects." Microvasc Res **32**(3): 359-370.
134. Fukamizu, A. (2000). "[A role of angiotensin II found in knockout mice with angiotensin signal breakdown]." Nihon Ronen Igakkai Zasshi **37**(3): 216-220.
135. Fulop, T., Jr., N. Douziech, M. P. Jacob, M. Hauck, J. Wallach and L. Robert (2001). "Age-related alterations in the signal transduction pathways of the elastin-laminin receptor." Pathol Biol (Paris) **49**(4): 339-348.
136. Fulop, T., Jr., M. P. Jacob, A. Khalil, J. Wallach and L. Robert (1998). "Biological effects of elastin peptides." Pathol Biol (Paris) **46**(7): 497-506.
137. Fulop, T., A. Khalil and A. Larbi (2012). "The role of elastin peptides in modulating the immune response in aging and age-related diseases." Pathol Biol (Paris) **60**(1): 28-33.
138. Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.
139. Gale, N. W. and G. D. Yancopoulos (1999). "Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development." Genes Dev **13**(9): 1055-1066.
140. Garland, C. J., C. R. Hiley and K. A. Dora (2011). "EDHF: spreading the influence of the endothelium." Br J Pharmacol **164**(3): 839-852.
141. Gasparovic, H., L. Nascimben, D. W. Kindelberger and J. G. Byrne (2005). "Idiopathic inflammatory aneurysm of the ascending aorta." Ann Thorac Surg **80**(5): 1912-1914.
142. Gerritsen, M. E., C. P. Shen, W. J. Atkinson, R. C. Padgett, M. A. Gimbrone, Jr. and D. S. Milstone (1996). "Microvascular endothelial cells from E-selectin-deficient mice form tubes in vitro." Lab Invest **75**(2): 175-184.
143. Giachelli, C. M., N. Bae, M. Almeida, D. T. Denhardt, C. E. Alpers and S. M. Schwartz (1993). "Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **92**(4): 1686-1696.

144. Gibson, M. A., D. I. Leavesley and L. K. Ashman (1999). "Microfibril-associated glycoprotein-2 specifically interacts with a range of bovine and human cell types via alphaVbeta3 integrin." J Biol Chem **274**(19): 13060-13065.
145. Giordano, U., A. Turchetta, A. Giannotti, M. C. Digilio, F. Virgili and A. Calzolari (2001). "Exercise testing and 24-hour ambulatory blood pressure monitoring in children with Williams syndrome." Pediatr Cardiol **22**(6): 509-511.
146. Girardot, F., V. Monnier and H. Tricoire (2004). "Genome wide analysis of common and specific stress responses in adult drosophila melanogaster." BMC Genomics **5**: 74.
147. Gitay-Goren, H., S. Soker, I. Vlodavsky and G. Neufeld (1992). "The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules." J Biol Chem **267**(9): 6093-6098.
148. Gospodarowicz, D., G. Greenburg, J. M. Foidart and N. Savion (1981). "The production and localization of laminin in cultured vascular and corneal endothelial cells." J Cell Physiol **107**(2): 171-183.
149. Grabowski, G. J. T. S. R. (2002). "Principles of anatomy and physiology." **10**.
150. Grant, D. S., K. Tashiro, B. Segui-Real, Y. Yamada, G. R. Martin and H. K. Kleinman (1989). "Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro." Cell **58**(5): 933-943.
151. Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen and Y. E. Shi (1996). "Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4." J Biol Chem **271**(48): 30375-30380.
152. Greenwald, S. E. (2007). "Ageing of the conduit arteries." J Pathol **211**(2): 157-172.
153. Grimshaw, G. M. and J. M. Thompson (1997). "Changes in diameter of the abdominal aorta with age: an epidemiological study." J Clin Ultrasound **25**(1): 7-13.
154. Grote, C. (2003). "[Regulations. MDS Expert Forum: Evidence and value of early detection measures need to be proven]." Gesundheitswesen **65**(1): 69.
155. Guo, G., P. Booms, M. Halushka, H. C. Dietz, A. Ney, S. Stricker, J. Hecht, S. Mundlos and P. N. Robinson (2006). "Induction of macrophage chemotaxis by aortic extracts of the mgR Marfan mouse model and a GxxPG-containing fibrillin-1 fragment." Circulation **114**(17): 1855-1862.
156. Hajjar, I. and T. Kotchen (2003). "Regional variations of blood pressure in the United States are associated with regional variations in dietary intakes: the NHANES-III data." J Nutr **133**(1): 211-214.
157. Halme, T., T. Savunen, H. Aho, T. Vihersaari and R. Penttinen (1985). "Elastin and collagen in the aortic wall: changes in the Marfan syndrome and annuloaortic ectasia." Exp Mol Pathol **43**(1): 1-12.
158. Hanssen, E., S. Franc and R. Garrone (2001). "Synthesis and structural organization of zonular fibers during development and aging." Matrix Biol **20**(2): 77-85.
159. Hao, H., G. Gabbiani and M. L. Bochaton-Piallat (2003). "Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(9): 1510-1520.
160. Hasham, S. N., D. C. Guo and D. M. Milewicz (2002). "Genetic basis of thoracic aortic aneurysms and dissections." Curr Opin Cardiol **17**(6): 677-683.
161. Hayashi, K., K. S. Fong, F. Mercier, C. D. Boyd, K. Csiszar and M. Hayashi (2004). "Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues." J Mol Histol **35**(8-9): 845-855.
162. Henriët, P., L. Blavier and Y. A. Declerck (1999). "Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) in invasion and proliferation." APMIS **107**(1): 111-119.
163. Higashiyama, S., J. A. Abraham, J. Miller, J. C. Fiddes and M. Klagsbrun (1991). "A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF." Science **251**(4996): 936-939.
164. Hill, A. M., J. D. Buckley, K. J. Murphy and P. R. Howe (2007). "Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors." Am J Clin Nutr **85**(5): 1267-1274.

165. Hinek, A. (1996). "Biological roles of the non-integrin elastin/laminin receptor." Biol Chem **377**(7-8): 471-480.
166. Hinek, A., M. D. Botney, R. P. Mecham and W. C. Parks (1991). "Inhibition of tropoelastin expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3." Connect Tissue Res **26**(3): 155-166.
167. Hinek, A., F. W. Keeley and J. Callahan (1995). "Recycling of the 67-kDa elastin binding protein in arterial myocytes is imperative for secretion of tropoelastin." Exp Cell Res **220**(2): 312-324.
168. Hinek, A. and M. Rabinovitch (1994). "67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin." J Cell Biol **126**(2): 563-574.
169. Hinek, A., D. S. Wrenn, R. P. Mecham and S. H. Barondes (1988). "The elastin receptor: a galactoside-binding protein." Science **239**(4847): 1539-1541.
170. Ho, M. S., K. Bose, S. Mokkalapati, R. Nischt and N. Smyth (2008). "Nidogens-Extracellular matrix linker molecules." Microsc Res Tech **71**(5): 387-395.
171. Hooper, N. M. (1994). "Families of zinc metalloproteases." FEBS Lett **354**(1): 1-6.
172. Hornebeck, W., A. Robinet, L. Duca, F. Antonicelli, J. Wallach and G. Bellon (2005). "The elastin connection and melanoma progression." Anticancer Res **25**(4): 2617-2625.
173. Horowitz, A., C. B. Menice, R. Laporte and K. G. Morgan (1996). "Mechanisms of smooth muscle contraction." Physiol Rev **76**(4): 967-1003.
174. Huber, P. (2009). "[Endothelial cell-cell junctions in vessel formation]." J Soc Biol **203**(2): 119-123.
175. Hubmacher, D., K. Tiedemann and D. P. Reinhardt (2006). "Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions." Curr Top Dev Biol **75**: 93-123.
176. Hutchinson, S., A. Furger, D. Halliday, D. P. Judge, A. Jefferson, H. C. Dietz, H. Firth and P. A. Handford (2003). "Allelic variation in normal human FBN1 expression in a family with Marfan syndrome: a potential modifier of phenotype?" Hum Mol Genet **12**(18): 2269-2276.
177. Huxley-Jones, J., S. M. Foord and M. R. Barnes (2008). "Drug discovery in the extracellular matrix." Drug Discov Today **13**(15-16): 685-694.
178. Hynes, R. O. (1999). "The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 2588-2590.
179. Indik, Z., W. R. Abrams, U. Kucich, C. W. Gibson, R. P. Mecham and J. Rosenbloom (1990). "Production of recombinant human tropoelastin: characterization and demonstration of immunologic and chemotactic activity." Arch Biochem Biophys **280**(1): 80-86.
180. Indik, Z., H. Yeh, N. Ornstein-Goldstein, U. Kucich, W. Abrams, J. C. Rosenbloom and J. Rosenbloom (1989). "Structure of the elastin gene and alternative splicing of elastin mRNA: implications for human disease." Am J Med Genet **34**(1): 81-90.
181. Indik, Z., H. Yeh, N. Ornstein-Goldstein, P. Sheppard, N. Anderson, J. C. Rosenbloom, L. Peltonen and J. Rosenbloom (1987). "Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(16): 5680-5684.
182. Iozzo, R. V. and J. D. San Antonio (2001). "Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena." J Clin Invest **108**(3): 349-355.
183. Ito, S., S. Ishimaru and S. E. Wilson (1997). "Inhibitory effect of type 1 collagen gel containing alpha-elastin on proliferation and migration of vascular smooth muscle and endothelial cells." Cardiovasc Surg **5**(2): 176-183.
184. Jacob, M. P. (2003). "Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions." Biomed Pharmacother **57**(5-6): 195-202.
185. Jacob, M. P. (2003). "[Fibulin-5 is essential for elastic fiber development]." Med Sci (Paris) **19**(4): 395-397.
186. Jacob, M. P. (2006). "[Extracellular matrix and vascular ageing]." Med Sci (Paris) **22**(3): 273-278.
187. Jacob, M. P., D. Brechemier, L. Robert and W. Hornebeck (1982). "Variation of elastase-type protease activity and elastin biosynthesis in rabbit aorta induced by cholesterol diet and immunization with elastin peptides." Artery **10**(5): 310-316.

188. Jacob, M. P., T. Fulop, Jr., G. Foris and L. Robert (1987). "Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(4): 995-999.
189. Jaffe, E. A. and D. F. Mosher (1978). "Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells." Ann N Y Acad Sci **312**: 122-131.
190. Janik, M. E., A. Litynska and P. Vereecken (2010). "Cell migration-the role of integrin glycosylation." Biochim Biophys Acta **1800**(6): 545-555.
191. Jensen, S. A., I. B. Robertson and P. A. Handford (2012). "Dissecting the fibrillin microfibril: structural insights into organization and function." Structure **20**(2): 215-225.
192. Jensen, S. A., B. Vrhovski and A. S. Weiss (2000). "Domain 26 of tropoelastin plays a dominant role in association by coacervation." J Biol Chem **275**(37): 28449-28454.
193. Jovanovic, J., J. Takagi, L. Choulier, N. G. Abrescia, D. I. Stuart, P. A. van der Merwe, H. J. Mardon and P. A. Handford (2007). "alphaVbeta6 is a novel receptor for human fibrillin-1. Comparative studies of molecular determinants underlying integrin-rgd affinity and specificity." J Biol Chem **282**(9): 6743-6751.
194. Judge, D. P. and H. C. Dietz (2005). "Marfan's syndrome." Lancet **366**(9501): 1965-1976.
195. Kagan, H. M. and W. Li (2003). "Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell." J Cell Biochem **88**(4): 660-672.
196. Kagan, H. M., M. A. Williams, P. R. Williamson and J. M. Anderson (1984). "Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates." J Biol Chem **259**(18): 11203-11207.
197. Kahari, V. M., Y. Q. Chen, M. M. Bashir, J. Rosenbloom and J. Uitto (1992). "Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity." J Biol Chem **267**(36): 26134-26141.
198. Kahari, V. M., D. R. Olsen, R. W. Rhudy, P. Carrillo, Y. Q. Chen and J. Uitto (1992). "Transforming growth factor-beta up-regulates elastin gene expression in human skin fibroblasts. Evidence for post-transcriptional modulation." Lab Invest **66**(5): 580-588.
199. Kanzaki, T. and M. Otabe (2003). "Latent transforming growth factor-beta binding protein-1, a component of latent transforming growth factor-beta complex, accelerates the migration of aortic smooth muscle cells in diabetic rats through integrin-beta3." Diabetes **52**(3): 824-828.
200. Kaplan, P., M. Levinson and B. S. Kaplan (1995). "Cerebral artery stenoses in Williams syndrome cause strokes in childhood." J Pediatr **126**(6): 943-945.
201. Kapustin, A., V. Stepanova, N. Aniol, D. B. Cines, A. Poliakov, S. Yarovoi, T. Lebedeva, R. Wait, G. Ryzhakov, Y. Parfyonova, Y. Gursky, H. Yanagisawa, M. Minashkin, R. Beabealashvili, A. Vorotnikov, A. Bobik and V. Tkachuk (2012). "Fibulin-5 binds urokinase-type plasminogen activator and mediates urokinase-stimulated beta1-integrin-dependent cell migration." Biochem J **443**(2): 491-503.
202. Karnik, S. K., B. S. Brooke, A. Bayes-Genis, L. Sorensen, J. D. Wythe, R. S. Schwartz, M. T. Keating and D. Y. Li (2003). "A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease." Development **130**(2): 411-423.
203. Karnik, S. K., J. D. Wythe, L. Sorensen, B. S. Brooke, L. D. Urness and D. Y. Li (2003). "Elastin induces myofibrillogenesis via a specific domain, VGVAPG." Matrix Biol **22**(5): 409-425.
204. Kelleher, C. M., S. E. McLean and R. P. Mecham (2004). "Vascular extracellular matrix and aortic development." Curr Top Dev Biol **62**: 153-188.
205. Khimji, A. K. and D. C. Rokey (2010). "Endothelin--biology and disease." Cell Signal **22**(11): 1615-1625.
206. Kielty, C. M., S. Stephan, M. J. Sherratt, M. Williamson and C. A. Shuttleworth (2007). "Applying elastic fibre biology in vascular tissue engineering." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **362**(1484): 1293-1312.
207. Kielty, C. M., T. J. Wess, L. Haston, J. L. Ashworth, M. J. Sherratt and C. A. Shuttleworth (2002). "Fibrillin-rich microfibrils: elastic biopolymers of the extracellular matrix." J Muscle Res Cell Motil **23**(5-6): 581-596.

208. Kinashi, T. (2012). "Overview of integrin signaling in the immune system." Methods Mol Biol **757**: 261-278.
209. Kinsey, R., M. R. Williamson, S. Chaudhry, K. T. Mellody, A. McGovern, S. Takahashi, C. A. Shuttleworth and C. M. Kielty (2008). "Fibrillin-1 microfibril deposition is dependent on fibronectin assembly." J Cell Sci **121**(Pt 16): 2696-2704.
210. Kirschmann, D. A., E. A. Seftor, S. F. Fong, D. R. Nieva, C. M. Sullivan, E. M. Edwards, P. Sommer, K. Csiszar and M. J. Hendrix (2002). "A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion." Cancer Res **62**(15): 4478-4483.
211. Kjoller, L., S. M. Kanse, T. Kirkegaard, K. W. Rodenburg, E. Ronne, S. L. Goodman, K. T. Preissner, L. Ossowski and P. A. Andreasen (1997). "Plasminogen activator inhibitor-1 represses integrin- and vitronectin-mediated cell migration independently of its function as an inhibitor of plasminogen activation." Exp Cell Res **232**(2): 420-429.
212. Knothe, C., J. Boldt, B. Zickmann, M. Ballesteros, F. Dapper and G. Hempelmann (1992). "Endothelin plasma levels in old and young patients during open heart surgery: correlations to cardiopulmonary and endocrinology parameters." J Cardiovasc Pharmacol **20**(4): 664-670.
213. Knox, S. M. and J. M. Whitelock (2006). "Perlecan: how does one molecule do so many things?" Cell Mol Life Sci **63**(21): 2435-2445.
214. Kobayashi, M., K. Inoue, E. Warabi, T. Minami and T. Kodama (2005). "A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells." J Atheroscler Thromb **12**(3): 138-142.
215. Koda, J. E. and M. Bernfield (1984). "Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Basal extracellular proteoglycan binds specifically to native type I collagen fibrils." J Biol Chem **259**(19): 11763-11770.
216. Koga, T., Y. Takata, K. Kobayashi, S. Takishita, Y. Yamashita and M. Fujishima (1988). "Ageing suppresses endothelium-dependent relaxation and generates contraction mediated by the muscarinic receptors in vascular smooth muscle of normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats." J Hypertens Suppl **6**(4): S243-245.
217. Koledova, V. V. and R. A. Khalil (2006). "Ca²⁺, calmodulin, and cyclins in vascular smooth muscle cell cycle." Circ Res **98**(10): 1240-1243.
218. Kotlikoff, M. I. (2003). "Calcium-induced calcium release in smooth muscle: the case for loose coupling." Prog Biophys Mol Biol **83**(3): 171-191.
219. Kozel, B. A., B. J. Rongish, A. Czirok, J. Zach, C. D. Little, E. C. Davis, R. H. Knutsen, J. E. Wagenseil, M. A. Levy and R. P. Mecham (2006). "Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters." J Cell Physiol **207**(1): 87-96.
220. Kukovetz, W. R., S. Holzmann and C. Romanin (1987). "Mechanism of vasodilation by nitrates: role of cyclic GMP." Cardiology **74 Suppl 1**: 12-19.
221. Kume, A., H. Nishiura, J. Suda and T. Suda (1997). "Focal adhesion kinase upregulated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor but not by interleukin-3 in differentiating myeloid cells." Blood **89**(9): 3434-3442.
222. Labat-Robert, J. (2012). "Cell-Matrix interactions, the role of fibronectin and integrins. A survey." Pathol Biol (Paris) **60**(1): 15-19.
223. LACOLLEY, P., D. BABUTY, C. BOULANGER, B. GHALEH, G. LOIRAND, F. PINET and J.-L. SAMUEL (2008). "Biologie et Pathologie du coeur et des vaisseaux." JOHN LIBBEY.
224. Lacroix, A., M. Pezet, A. Capel, D. Bonnet, M. Hennequin, M. P. Jacob, G. Bricca, D. Couet, G. Faury, J. Bernicot and B. Gilbert-Dussardier (2009). "[Williams-Beuren syndrome: a multidisciplinary approach]." Arch Pediatr **16**(3): 273-282.
225. Landerholm, T. E., X. R. Dong, J. Lu, N. S. Belaguli, R. J. Schwartz and M. W. Majesky (1999). "A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells." Development **126**(10): 2053-2062.
226. Langille, B. L. (1993). "Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix." J Cardiovasc Pharmacol **21 Suppl 1**: S11-17.
227. Laurent, S., S. Katsahian, C. Fassot, A. I. Tropeano, I. Gautier, B. Laloux and P. Boutouyrie (2003). "Aortic stiffness is an independent predictor of fatal stroke in essential hypertension." Stroke **34**(5): 1203-1206.

228. Lee, B., M. Godfrey, E. Vitale, H. Hori, M. G. Mattei, M. Sarfarazi, P. Tsipouras, F. Ramirez and D. W. Hollister (1991). "Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes." *Nature* **352**(6333): 330-334.
229. Lee, M. W. and D. L. Severson (1994). "Signal transduction in vascular smooth muscle: diacylglycerol second messengers and PKC action." *Am J Physiol* **267**(3 Pt 1): C659-678.
230. Lee, S. S., V. Knott, J. Jovanovic, K. Harlos, J. M. Grimes, L. Choulier, H. J. Mardon, D. I. Stuart and P. A. Handford (2004). "Structure of the integrin binding fragment from fibrillin-1 gives new insights into microfibril organization." *Structure* **12**(4): 717-729.
231. Legate, K. R., E. Montanez, O. Kudlacek and R. Fassler (2006). "ILK, PINCH and parvin: the tIPP of integrin signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(1): 20-31.
232. Li, D. Y., G. Faury, D. G. Taylor, E. C. Davis, W. A. Boyle, R. P. Mecham, P. Stenzel, B. Boak and M. T. Keating (1998). "Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin." *J Clin Invest* **102**(10): 1783-1787.
233. Li, D. Y., A. E. Toland, B. B. Boak, D. L. Atkinson, G. J. Ensing, C. A. Morris and M. T. Keating (1997). "Elastin point mutations cause an obstructive vascular disease, supravalvular aortic stenosis." *Hum Mol Genet* **6**(7): 1021-1028.
234. Li, G., A. H. Simpson and J. T. Triffitt (1999). "The role of chondrocytes in intramembranous and endochondral ossification during distraction osteogenesis in the rabbit." *Calcif Tissue Int* **64**(4): 310-317.
235. Lievre, A., E. Rouleau, B. Buecher and E. Mitry (2010). "[Clinical significance of BRAF mutations in colorectal cancer]." *Bull Cancer* **97**(12): 1441-1452.
236. Lijnen, H. R. (2001). "Plasmin and matrix metalloproteinases in vascular remodeling." *Thromb Haemost* **86**(1): 324-333.
237. Lijnen, H. R., B. Van Hoef, F. Lupu, L. Moons, P. Carmeliet and D. Collen (1998). "Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(7): 1035-1045.
238. Lillie, M. A., G. J. David and J. M. Gosline (1998). "Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue." *Connect Tissue Res* **37**(1-2): 121-141.
239. Lincoln, T. M., N. Dey and H. Sellak (2001). "Invited review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression." *J Appl Physiol* **91**(3): 1421-1430.
240. Lindop, G. B., J. J. Boyle, P. McEwan and C. J. Kenyon (1995). "Vascular structure, smooth muscle cell phenotype and growth in hypertension." *J Hum Hypertens* **9**(6): 475-478.
241. Liotta, L. A., R. H. Goldfarb, R. Brundage, G. P. Siegal, V. Terranova and S. Garbisa (1981). "Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane." *Cancer Res* **41**(11 Pt 1): 4629-4636.
242. Liptay, S., C. P. Bauer, A. Grubl, R. Franz and P. Emmrich (1991). "[Development of atopic disease in early childhood--predisposing factors]." *Monatsschr Kinderheilkd* **139**(3): 130-135.
243. Lisiak, E. and N. Cordes (2004). "Integrins and the cellular radiation response." *Cancer Therapy* **2**: 271-278.
244. Liu, F. T., R. J. Patterson and J. L. Wang (2002). "Intracellular functions of galectins." *Biochim Biophys Acta* **1572**(2-3): 263-273.
245. Llorens, O., J. J. Perez, A. Palomer and D. Mauleon (2002). "Differential binding mode of diverse cyclooxygenase inhibitors." *J Mol Graph Model* **20**(5): 359-371.
246. Loeys, B. L., D. M. Matthys and A. M. de Paepe (2003). "Genetic fibrillinopathies: new insights in molecular diagnosis and clinical management." *Acta Clin Belg* **58**(1): 3-11.
247. Loftus, J. C. and R. C. Liddington (1997). "Cell adhesion in vascular biology. New insights into integrin-ligand interaction." *J Clin Invest* **99**(10): 2302-2306.
248. Lomas, A. C., K. T. Melody, L. J. Freeman, D. V. Bax, C. A. Shuttleworth and C. M. Kielty (2007). "Fibulin-5 binds human smooth-muscle cells through alpha5beta1 and alpha4beta1 integrins, but does not support receptor activation." *Biochem J* **405**(3): 417-428.

249. Long, D. A., M. A. Newaz, S. S. Prabhakar, K. L. Price, L. D. Truong, L. Feng, W. Mu, A. O. Oyekan and R. J. Johnson (2005). "Loss of nitric oxide and endothelial-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in aging." *Kidney Int* **68**(5): 2154-2163.
250. Lopes, K. R., A. L. Delezoide, C. Baumann, E. Vuillard, D. Luton, Y. Chitrit and A. Azancot (2006). "Prenatal Marfan syndrome: report of one case and review of the literature." *Prenat Diagn* **26**(8): 696-699.
251. Lyon, M., G. Rushton and J. T. Gallagher (1997). "The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific." *J Biol Chem* **272**(29): 18000-18006.
252. Maciewicz, R. A. and D. J. Etherington (1988). "A comparison of four cathepsins (B, L, N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen." *Biochem J* **256**(2): 433-440.
253. Majesky, M. W., X. R. Dong, V. Hoglund, W. M. Mahoney, Jr. and G. Daum (2011). "The adventitia: a dynamic interface containing resident progenitor cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**(7): 1530-1539.
254. Malinin, N. L., E. Pluskota and T. V. Byzova (2012). "Integrin signaling in vascular function." *Curr Opin Hematol* **19**(3): 206-211.
255. Manes, S., E. Mira, C. Gomez-Mouton, R. A. Lacalle and C. Martinez (2000). "Cells on the move: a dialogue between polarization and motility." *IUBMB Life* **49**(2): 89-96.
256. Manes, S., E. Mira, C. Gomez-Mouton, Z. J. Zhao, R. A. Lacalle and A. C. Martinez (1999). "Concerted activity of tyrosine phosphatase SHP-2 and focal adhesion kinase in regulation of cell motility." *Mol Cell Biol* **19**(4): 3125-3135.
257. Maquart, F. X., G. Bellon, S. Pasco and J. C. Monboisse (2005). "Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation." *Biochimie* **87**(3-4): 353-360.
258. Margadant, C., H. N. Monsuur, J. C. Norman and A. Sonnenberg (2011). "Mechanisms of integrin activation and trafficking." *Curr Opin Cell Biol* **23**(5): 607-614.
259. Mariko, B., Z. Ghandour, S. Raveaud, M. Quentin, Y. Usson, J. Verdeti, P. Huber, C. Kielty and G. Faury (2010). "Microfibrils and fibrillin-1 induce integrin-mediated signaling, proliferation and migration in human endothelial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **299**(5): C977-987.
260. Mariko, B., M. Pezet, B. Escoubet, S. Bouillot, J. P. Andrieu, B. Starcher, D. Quaglino, M. P. Jacob, P. Huber, F. Ramirez and G. Faury (2011). "Fibrillin-1 genetic deficiency leads to pathological ageing of arteries in mice." *J Pathol* **224**(1): 33-44.
261. Marin-Manzano, E., D. Gonzalez-de-Olano, J. Haurie-Girelli, J. I. Herraiz-Sarachaga, R. Bermudez-Canete, A. Tamariz-Martel, C. Cuesta-Gimeno and J. Perez-de-Leon (2009). "Idiopathic thoracic aortic aneurysm at pediatric age." *Ann Vasc Surg* **23**(2): 258 e219-221.
262. Martin, G. R. and R. Timpl (1987). "Laminin and other basement membrane components." *Annu Rev Cell Biol* **3**: 57-85.
263. Massam-Wu, T., M. Chiu, R. Choudhury, S. S. Chaudhry, A. K. Baldwin, A. McGovern, C. Baldock, C. A. Shuttleworth and C. M. Kielty (2010). "Assembly of fibrillin microfibrils governs extracellular deposition of latent TGF beta." *J Cell Sci* **123**(Pt 17): 3006-3018.
264. Matchkov, V. V., O. Kudryavtseva and C. Aalkjaer (2012). "Intracellular Ca(2)(+) signalling and phenotype of vascular smooth muscle cells." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **110**(1): 42-48.
265. Matsiko, A., T. J. Levingstone, F. J. O'Brien and J. P. Gleeson (2012). "Addition of hyaluronic acid improves cellular infiltration and promotes early-stage chondrogenesis in a collagen-based scaffold for cartilage tissue engineering." *J Mech Behav Biomed Mater* **11**: 41-52.
266. Matz, R. L., C. Schott, J. C. Stoclet and R. Andriantsitohaina (2000). "Age-related endothelial dysfunction with respect to nitric oxide, endothelium-derived hyperpolarizing factor and cyclooxygenase products." *Physiol Res* **49**(1): 11-18.
267. McAnulty, R. J. (2007). "Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(4): 666-671.
268. McConnell, C. J., M. E. DeMont and G. M. Wright (1997). "Microfibrils provide non-linear elastic behaviour in the abdominal artery of the lobster *Homarus americanus*." *J Physiol* **499** (Pt 2): 513-526.

269. McLaughlin, S., J. Wang, A. Gambhir and D. Murray (2002). "PIP(2) and proteins: interactions, organization, and information flow." Annu Rev Biophys Biomol Struct **31**: 151-175.
270. Mecham, R. P., A. Hinek, G. L. Griffin, R. M. Senior and L. A. Liotta (1989). "The elastin receptor shows structural and functional similarities to the 67-kDa tumor cell laminin receptor." J Biol Chem **264**(28): 16652-16657.
271. Mecham, R. P., J. Madaras, J. A. McDonald and U. Ryan (1983). "Elastin production by cultured calf pulmonary artery endothelial cells." J Cell Physiol **116**(3): 282-288.
272. Mellander, S. (1970). "Systemic circulation: local control." Annu Rev Physiol **32**: 313-344.
273. Merla, G., C. Howald, C. N. Henrichsen, R. Lyle, C. Wyss, M. T. Zobot, S. E. Antonarakis and A. Reymond (2006). "Submicroscopic deletion in patients with Williams-Beuren syndrome influences expression levels of the nonhemizygous flanking genes." Am J Hum Genet **79**(2): 332-341.
274. Michel, J. B., N. De Roux, D. Plissonnier, S. Anidjar, J. L. Salzmann and B. Levy (1990). "Pathophysiological role of the vascular smooth muscle cell." J Cardiovasc Pharmacol **16 Suppl 1**: S4-11.
275. Michiels, C. (2003). "Endothelial cell functions." J Cell Physiol **196**(3): 430-443.
276. Midwood, K. S., T. Hussenet, B. Langlois and G. Orend (2011). "Advances in tenascin-C biology." Cell Mol Life Sci **68**(19): 3175-3199.
277. Mithieux, S. M. and A. S. Weiss (2005). "Elastin." Adv Protein Chem **70**: 437-461.
278. Mizuguchi, T., G. Collod-Beroud, T. Akiyama, M. Abifadel, N. Harada, T. Morisaki, D. Allard, M. Varret, M. Claustres, H. Morisaki, M. Ihara, A. Kinoshita, K. Yoshiura, C. Junien, T. Kajii, G. Jondeau, T. Ohta, T. Kishino, Y. Furukawa, Y. Nakamura, N. Niikawa, C. Boileau and N. Matsumoto (2004). "Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome." Nat Genet **36**(8): 855-860.
279. Mochizuki, S., B. Brassart and A. Hinek (2002). "Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells." J Biol Chem **277**(47): 44854-44863.
280. Moncada, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." Pharmacol Rev **43**(2): 109-142.
281. Moore, J. and S. Thibeault (2012). "Insights into the role of elastin in vocal fold health and disease." J Voice **26**(3): 269-275.
282. Morini, R. and A. Becchetti (2010). "Integrin receptors and ligand-gated channels." Adv Exp Med Biol **674**: 95-105.
283. Morris, C. A. and C. B. Mervis (2000). "Williams syndrome and related disorders." Annu Rev Genomics Hum Genet **1**: 461-484.
284. Mudera, V. C., R. Pleass, M. Eastwood, R. Tarnuzzer, G. Schultz, P. Khaw, D. A. McGrouther and R. A. Brown (2000). "Molecular responses of human dermal fibroblasts to dual cues: contact guidance and mechanical load." Cell Motil Cytoskeleton **45**(1): 1-9.
285. Mulligan-Kehoe, M. J. (2010). "The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **298**(2): H295-305.
286. Mumby, S. M., D. Abbott-Brown, G. J. Raugi and P. Bornstein (1984). "Regulation of thrombospondin secretion by cells in culture." J Cell Physiol **120**(3): 280-288.
287. Munoz, M., F. Vandenbulcke, J. Garnier, Y. Gueguen, P. Bulet, D. Saulnier and E. Bachere (2004). "Involvement of penaeidins in defense reactions of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* to a pathogenic vibrio." Cell Mol Life Sci **61**(7-8): 961-972.
288. Nakamura, T., P. R. Lozano, Y. Ikeda, Y. Iwanaga, A. Hinek, S. Minamisawa, C. F. Cheng, K. Kobuke, N. Dalton, Y. Takada, K. Tashiro, J. Ross Jr, T. Honjo and K. R. Chien (2002). "Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo." Nature **415**(6868): 171-175.
289. Narayanan, A. S., R. C. Page, F. Kuzan and C. G. Cooper (1978). "Elastin cross-linking in vitro. Studies on factors influencing the formation of desmosines by lysyl oxidase action on tropoelastin." Biochem J **173**(3): 857-862.
290. Nataatmadja, M., J. West and M. West (2006). "Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm." Circulation **114**(1 Suppl): I371-377.

291. Nathan, C. (1992). "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells." FASEB J **6**(12): 3051-3064.
292. Neptune, E. R., P. A. Frischmeyer, D. E. Arking, L. Myers, T. E. Bunton, B. Gayraud, F. Ramirez, L. Y. Sakai and H. C. Dietz (2003). "Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome." Nat Genet **33**(3): 407-411.
293. Nichols, S. D., M. S. Boyne, M. Thame, C. Osmond, R. J. Wilks, F. I. Bennett, N. McFarlane-Anderson, R. E. Young and T. E. Forrester (2005). "Cold-induced elevation of forearm vascular resistance is inversely related to birth weight." J Hum Hypertens **19**(4): 309-314.
294. Niederhoffer, N., I. Lartaud-Idjouadiene, P. Giummelly, C. Duvivier, R. Peslin and J. Atkinson (1997). "Calcification of medial elastic fibers and aortic elasticity." Hypertension **29**(4): 999-1006.
295. Norman, P., I. Moss, M. Sian, M. Gosling and J. Powell (2002). "Maternal and postnatal vitamin D ingestion influences rat aortic structure, function and elastin content." Cardiovasc Res **55**(2): 369-374.
296. Norman, P. E., S. J. Wysocki and M. D. Lamawansa (1995). "The role of vitamin D3 in the aetiology of abdominal aortic aneurysms." Med Hypotheses **45**(1): 17-20.
297. O'Connor, W. N., J. B. Davis, Jr., R. Geissler, C. M. Cottrill, J. A. Noonan and E. P. Todd (1985). "Supravalvular aortic stenosis. Clinical and pathologic observations in six patients." Arch Pathol Lab Med **109**(2): 179-185.
298. O'Rourke, M. F. and M. E. Safar (2005). "Relationship between aortic stiffening and microvascular disease in brain and kidney: cause and logic of therapy." Hypertension **46**(1): 200-204.
299. Ochieng, J., P. Warfield, B. Green-Jarvis and I. Fentie (1999). "Galectin-3 regulates the adhesive interaction between breast carcinoma cells and elastin." J Cell Biochem **75**(3): 505-514.
300. Oklu, R. and R. Hesketh (2000). "The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family." Biochem J **352 Pt 3**: 601-610.
301. Okuyama, K. (2008). "Revisiting the molecular structure of collagen." Connect Tissue Res **49**(5): 299-310.
302. Olszynski, K. and M. Zimowska (2009). "[Structure and function of matrix metalloproteinases]." Postepy Biochem **55**(1): 76-84.
303. Oohira, A., T. N. Wight and P. Bornstein (1983). "Sulfated proteoglycans synthesized by vascular endothelial cells in culture." J Biol Chem **258**(3): 2014-2021.
304. Ooyama, T., K. Fukuda, H. Oda, H. Nakamura and Y. Hikita (1987). "Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration in vitro." Arteriosclerosis **7**(6): 593-598.
305. Opitz, J. M. and A. Utkus (2001). "Comments on biological asymmetry." Am J Med Genet **101**(4): 359-369.
306. Ostuni, A., M. D. Lograno, A. R. Gasbarro, F. Bisaccia and A. M. Tamburro (2002). "Novel properties of peptides derived from the sequence coded by exon 26A of human elastin." Int J Biochem Cell Biol **34**(2): 130-135.
307. Palade, G. E., M. Simionescu and N. Simionescu (1979). "Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium." Acta Physiol Scand Suppl **463**: 11-32.
308. Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." Physiol Rev **85**(2): 757-810.
309. Paria, B. C., A. B. Malik, A. M. Kwiatek, A. Rahman, M. J. May, S. Ghosh and C. Tiruppathi (2003). "Tumor necrosis factor-alpha induces nuclear factor-kappaB-dependent TRPC1 expression in endothelial cells." J Biol Chem **278**(39): 37195-37203.
310. Parkash, J. and K. Asotra (2010). "Calcium wave signaling in cancer cells." Life Sci **87**(19-22): 587-595.
311. Parsons, J. T. (2003). "Focal adhesion kinase: the first ten years." J Cell Sci **116**(Pt 8): 1409-1416.

312. Partridge, S. M., D. F. Elsdon, J. Thomas, A. Dorfman, A. Telser and P. L. Ho (1964). "Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin." Biochem J **93**(3): 30C-33C.
313. Patel, D., R. Menon and L. J. Taite (2011). "Self-assembly of elastin-based peptides into the ECM: the importance of integrins and the elastin binding protein in elastic fiber assembly." Biomacromolecules **12**(2): 432-440.
314. Patel, D., S. E. Vandromme, M. E. Reid and L. J. Taite (2012). "Synergistic activity of alphavbeta3 integrins and the elastin binding protein enhance cell-matrix interactions on bioactive hydrogel surfaces." Biomacromolecules **13**(5): 1420-1428.
315. Payne, S. L., B. Fogelgren, A. R. Hess, E. A. Seftor, E. L. Wiley, S. F. Fong, K. Csiszar, M. J. Hendrix and D. A. Kirschmann (2005). "Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism." Cancer Res **65**(24): 11429-11436.
316. Pereira, L., K. Andrikopoulos, J. Tian, S. Y. Lee, D. R. Keene, R. Ono, D. P. Reinhardt, L. Y. Sakai, N. J. Biery, T. Bunton, H. C. Dietz and F. Ramirez (1997). "Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome." Nat Genet **17**(2): 218-222.
317. Pereira, L., M. D'Alessio, F. Ramirez, J. R. Lynch, B. Sykes, T. Pangilinan and J. Bonadio (1993). "Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome." Hum Mol Genet **2**(10): 1762.
318. Pezet, M., M. P. Jacob, B. Escoubet, D. Gheduzzi, E. Tillet, P. Perret, P. Huber, D. Quaglino, R. Vranckx, D. Y. Li, B. Starcher, W. A. Boyle, R. P. Mecham and G. Faury (2008). "Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta." Rejuvenation Res **11**(1): 97-112.
319. Pezet, M., B. Mariko, M. P. Jacob and G. Faury (2009). "The elastic fibres: A regulator of normal and pathological ageing of elastic blood vessels." Médecine&Longévité **1**: 64-75.
320. Pfaff, M., D. P. Reinhardt, L. Y. Sakai and R. Timpl (1996). "Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1." FEBS Lett **384**(3): 247-250.
321. Pierce, R. A., M. E. Kolodziej and W. C. Parks (1992). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 represses tropoelastin expression by a posttranscriptional mechanism." J Biol Chem **267**(16): 11593-11599.
322. Pierschbacher, M. D. and E. Ruoslahti (1984). "Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule." Nature **309**(5963): 30-33.
323. Plante, G. E. (2002). "Vascular response to stress in health and disease." Metabolism **51**(6 Suppl 1): 25-30.
324. Pluskota, E., J. J. Dowling, N. Gordon, J. A. Golden, D. Szpak, X. Z. West, C. Nestor, Y. Q. Ma, K. Bialkowska, T. Byzova and E. F. Plow (2011). "The integrin coactivator kindlin-2 plays a critical role in angiogenesis in mice and zebrafish." Blood **117**(18): 4978-4987.
325. Pober, B. R., M. Johnson and Z. Urban (2008). "Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome." J Clin Invest **118**(5): 1606-1615.
326. Pocza, P., H. Suli-Vargha, Z. Darvas and A. Falus (2008). "Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor." Int J Cancer **122**(9): 1972-1980.
327. Privitera, S., C. A. Prody, J. W. Callahan and A. Hinek (1998). "The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein." J Biol Chem **273**(11): 6319-6326.
328. Prydz, K. and K. T. Dalen (2000). "Synthesis and sorting of proteoglycans." J Cell Sci **113 Pt 2**: 193-205.
329. Puetz, S., L. T. Lubomirov and G. Pfitzer (2009). "Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases." Physiology (Bethesda) **24**: 342-356.
330. Pugsley, M. K. and R. Tabrizchi (2000). "The vascular system. An overview of structure and function." J Pharmacol Toxicol Methods **44**(2): 333-340.
331. Putney, J. W., Jr. (1999). "TRP, inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, and capacitative calcium entry." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14669-14671.

332. Qi, J., L. Chi, J. Faber, B. Koller and A. J. Banes (2007). "ATP reduces gel compaction in osteoblast-populated collagen gels." J Appl Physiol **102**(3): 1152-1160.
333. Qin, X., M. A. Corriere, L. M. Matrisian and R. J. Guzman (2006). "Matrix metalloproteinase inhibition attenuates aortic calcification." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): 1510-1516.
334. Quaglino, D., Jr., L. B. Nanney, R. Kennedy and J. M. Davidson (1990). "Transforming growth factor-beta stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin. I. Excisional wound model." Lab Invest **63**(3): 307-319.
335. Rabinovich, G. A., N. Rubinstein and M. A. Toscano (2002). "Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 274-284.
336. Radomski, M. W., R. M. Palmer and S. Moncada (1987). "The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide." Br J Pharmacol **92**(3): 639-646.
337. Raju, K. and R. A. Anwar (1987). "Primary structures of bovine elastin a, b, and c deduced from the sequences of cDNA clones." J Biol Chem **262**(12): 5755-5762.
338. Ramaswamy, P., I. D. Lytrivi, K. Nguyen and B. D. Gelb (2006). "Neonatal Marfan syndrome : in utero presentation with aortic and pulmonary artery dilatation and successful repair of an acute flail mitral valve leaflet in infancy." Pediatr Cardiol **27**(6): 763-765.
339. Reinboth, B., E. Hanssen, E. G. Cleary and M. A. Gibson (2002). "Molecular interactions of biglycan and decorin with elastic fiber components: biglycan forms a ternary complex with tropoelastin and microfibril-associated glycoprotein 1." J Biol Chem **277**(6): 3950-3957.
340. Reinhardt, D. P., J. E. Gambia, R. N. Ono, H. P. Bachinger and L. Y. Sakai (2000). "Initial steps in assembly of microfibrils. Formation of disulfide-cross-linked multimers containing fibrillin-1." J Biol Chem **275**(3): 2205-2210.
341. Reinhardt, D. P., R. N. Ono, H. Notbohm, P. K. Muller, H. P. Bachinger and L. Y. Sakai (2000). "Mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules render fibrillin-1 susceptible to proteolysis. A potential disease-causing mechanism in Marfan syndrome." J Biol Chem **275**(16): 12339-12345.
342. Rennke, H. G., Y. Patel and M. A. Venkatachalam (1978). "Glomerular filtration of proteins: clearance of anionic, neutral, and cationic horseradish peroxidase in the rat." Kidney Int **13**(4): 278-288.
343. Ribatti, D., A. Vacca, B. Nico, R. Ria and F. Dammacco (2002). "Cross-talk between hematopoiesis and angiogenesis signaling pathways." Curr Mol Med **2**(6): 537-543.
344. Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." Nature **386**(6626): 671-674.
345. Ritty, T. M., T. Broekelmann, C. Tisdale, D. M. Milewicz and R. P. Mecham (1999). "Processing of the fibrillin-1 carboxyl-terminal domain." J Biol Chem **274**(13): 8933-8940.
346. Rizzoni, D., E. Porteri, M. Castellano, G. Bettoni, M. L. Muiesan, P. Muiesan, S. M. Giulini and E. Agabiti-Rosei (1996). "Vascular hypertrophy and remodeling in secondary hypertension." Hypertension **28**(5): 785-790.
347. Roach, M. R. and A. C. Burton (1957). "The reason for the shape of the distensibility curves of arteries." Can J Biochem Physiol **35**(8): 681-690.
348. Robert, L. (1998). "Mechanisms of aging of the extracellular matrix: role of the elastin-laminin receptor." Gerontology **44**(6): 307-317.
349. Robert, L. (2011). "Les intégrines et l'angiogenèse." VEGF **23**: 10-12.
350. Robinet, A., A. Fahem, J. H. Cauchard, E. Huet, L. Vincent, S. Lorimier, F. Antonicelli, C. Soria, M. Crepin, W. Hornebeck and G. Bellon (2005). "Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP." J Cell Sci **118**(Pt 2): 343-356.
351. Rodgers, U. R. and A. S. Weiss (2004). "Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin." Biochimie **86**(3): 173-178.
352. Rosado, J. A. and S. O. Sage (2000). "A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets." Trends Cardiovasc Med **10**(8): 327-332.

353. Rosenbloom, J., W. R. Abrams and R. Mecham (1993). "Extracellular matrix 4: the elastic fiber." FASEB J **7**(13): 1208-1218.
354. Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-126.
355. Ruoslahti, E. (1988). "Structure and biology of proteoglycans." Annu Rev Cell Biol **4**: 229-255.
356. Ryu, S. Y., G. U. Hong, D. Y. Kim and J. Y. Ro (2012). "Enolase 1 and calreticulin regulate the differentiation and function of mouse mast cells." Cell Signal **24**(1): 60-70.
357. Sabala, P., B. Targos, A. Caravelli, R. Czajkowski, D. Lim, G. Gragnaniello, L. Santella and J. Baranska (2002). "Role of the actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry in glioma C6 cells." Biochem Biophys Res Commun **296**(2): 484-491.
358. Sadler, J. E. (1997). "Thrombomodulin structure and function." Thromb Haemost **78**(1): 392-395.
359. Sakai, L. Y., D. R. Keene and E. Engvall (1986). "Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils." J Cell Biol **103**(6 Pt 1): 2499-2509.
360. Sakamoto, H., T. Broekelmann, D. A. Cheresh, F. Ramirez, J. Rosenbloom and R. P. Mecham (1996). "Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1." J Biol Chem **271**(9): 4916-4922.
361. Sandra, P., B. Tienpont, J. Vercammen, A. Tredoux, T. Sandra and F. David (2001). "Stir bar sorptive extraction applied to the determination of dicarboximide fungicides in wine." J Chromatogr A **928**(1): 117-126.
362. Sauvage, M., N. Hinglais, C. Mandet, C. Badier, F. Deslandes, J. B. Michel and M. P. Jacob (1998). "Localization of elastin mRNA and TGF-beta1 in rat aorta and caudal artery as a function of age." Cell Tissue Res **291**(2): 305-314.
363. Schaller, M. D., J. D. Hildebrand, J. D. Shannon, J. W. Fox, R. R. Vines and J. T. Parsons (1994). "Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src." Mol Cell Biol **14**(3): 1680-1688.
364. Schluterman, M. K., S. L. Chapman, G. Korpanty, K. Ozumi, T. Fukai, H. Yanagisawa and R. A. Brekken (2010). "Loss of fibulin-5 binding to beta1 integrins inhibits tumor growth by increasing the level of ROS." Dis Model Mech **3**(5-6): 333-342.
365. Schmidt, M. A., G. J. Ensing, V. V. Michels, G. A. Carter, D. J. Hagler and R. H. Feldt (1989). "Autosomal dominant supraaortic stenosis: large three-generation family." Am J Med Genet **32**(3): 384-389.
366. Schmitt, M., D. J. Blackman, G. W. Middleton, J. R. Cockcroft and M. P. Frenneaux (2002). "Assessment of venous capacitance. Radionuclide plethysmography: methodology and research applications." Br J Clin Pharmacol **54**(6): 565-576.
367. Schwartz, I., D. Seger and S. Shaltiel (1999). "Vitronectin." Int J Biochem Cell Biol **31**(5): 539-544.
368. Schwartz, M. A. and R. K. Assoian (2001). "Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways." J Cell Sci **114**(Pt 14): 2553-2560.
369. Schwartz, R. S., D. Lubbe, J. Altman and D. R. Holmes, Jr. (1999). "Local arterial drug delivery: a golden gun without bullets?" J Invasive Cardiol **11**(10): 620-621.
370. Scow, R. O., E. J. Blanchette-Mackie and L. C. Smith (1976). "Role of capillary endothelium in the clearance of chylomicrons. A model for lipid transport from blood by lateral diffusion in cell membranes." Circ Res **39**(2): 149-162.
371. Scuteri, A., M. Tesouro, S. Appolloni, F. Preziosi, A. M. Brancati and M. Volpe (2007). "Arterial stiffness as an independent predictor of longitudinal changes in cognitive function in the older individual." J Hypertens **25**(5): 1035-1040.
372. Seligman, M., R. F. Eilberg and L. Fishman (1975). "Mineralization of elastin extracted from human aortic tissues." Calcif Tissue Res **17**(3): 229-234.
373. Sengle, G., N. L. Charbonneau, R. N. Ono, T. Sasaki, J. Alvarez, D. R. Keene, H. P. Bachinger and L. Y. Sakai (2008). "Targeting of bone morphogenetic protein growth factor complexes to fibrillin." J Biol Chem **283**(20): 13874-13888.

374. Senior, R. M., G. L. Griffin and R. P. Mecham (1980). "Chemotactic activity of elastin-derived peptides." J Clin Invest **66**(4): 859-862.
375. Shadwick, R. E. (1999). "Mechanical design in arteries." J Exp Biol **202**(Pt 23): 3305-3313.
376. Shattil, S. J. and M. H. Ginsberg (1997). "Integrin signaling in vascular biology." J Clin Invest **100**(11 Suppl): S91-95.
377. Shaw, A. and Q. Xu (2003). "Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cells: an update." Curr Vasc Pharmacol **1**(1): 41-58.
378. Sheppard, D. (2000). "In vivo functions of integrins: lessons from null mutations in mice." Matrix Biol **19**(3): 203-209.
379. Shoulders, M. D. and R. T. Raines (2009). "Collagen structure and stability." Annu Rev Biochem **78**: 929-958.
380. Siefert, S. A. and R. Sarkar (2012). "Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease." Vascular **20**(4): 210-216.
381. Sieg, D. J., C. R. Hauck, D. Ilic, C. K. Klingbeil, E. Schaefer, C. H. Damsky and D. D. Schlaepfer (2000). "FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration." Nat Cell Biol **2**(5): 249-256.
382. Singh, K. K., K. Rommel, A. Mishra, M. Karck, A. Haverich, J. Schmidtke and M. Arslan-Kirchner (2006). "TGFBR1 and TGFBR2 mutations in patients with features of Marfan syndrome and Loeys-Dietz syndrome." Hum Mutat **27**(8): 770-777.
383. Singh, N. N. and D. P. Ramji (2006). "The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis." Cytokine Growth Factor Rev **17**(6): 487-499.
384. Singh, P., C. Carraher and J. E. Schwarzbauer (2010). "Assembly of fibronectin extracellular matrix." Annu Rev Cell Dev Biol **26**: 397-419.
385. Sinha, S., A. M. Heagerty, C. A. Shuttleworth and C. M. Kielty (2002). "Expression of latent TGF-beta binding proteins and association with TGF-beta 1 and fibrillin-1 following arterial injury." Cardiovasc Res **53**(4): 971-983.
386. Sinha, S., C. Nevett, C. A. Shuttleworth and C. M. Kielty (1998). "Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins." Matrix Biol **17**(8-9): 529-545.
387. Sivakumar, P., A. Czirok, B. J. Rongish, V. P. Divakara, Y. P. Wang and S. L. Dallas (2006). "New insights into extracellular matrix assembly and reorganization from dynamic imaging of extracellular matrix proteins in living osteoblasts." J Cell Sci **119**(Pt 7): 1350-1360.
388. Smith-Mungo, L. I. and H. M. Kagan (1998). "Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology." Matrix Biol **16**(7): 387-398.
389. Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo (1976). "Ultrastructural aspects of activation and contraction of vascular smooth muscle." Fed Proc **35**(6): 1288-1293.
390. Spina, M., S. Garbisa, J. Hinnie, J. C. Hunter and A. Serafini-Fracassini (1983). "Age-related changes in composition and mechanical properties of the tunica media of the upper thoracic human aorta." Arteriosclerosis **3**(1): 64-76.
391. Spofford, C. M. and W. M. Chilian (2001). "The elastin-laminin receptor functions as a mechanotransducer in vascular smooth muscle." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(3): H1354-1360.
392. Stefansson, S., D. A. Lawrence and W. S. Argraves (1996). "Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote the cellular clearance of thrombin by low density lipoprotein receptor-related proteins 1 and 2." J Biol Chem **271**(14): 8215-8220.
393. Steinberg, D. (1997). "A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis." Atherosclerosis **131** Suppl: S5-7.
394. Stenina, O. I. (2003). "Regulation of gene expression in vascular cells by coagulation proteins." Curr Drug Targets **4**(2): 143-158.
395. Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
396. Stetler-Stevenson, W. G., H. C. Krutzsch and L. A. Liotta (1989). "Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family." J Biol Chem **264**(29): 17374-17378.

397. Stheneur, C., G. Collod-Beroud, L. Faivre, L. Gouya, G. Sultan, J. M. Le Parc, B. Moura, D. Attias, C. Muti, M. Sznajder, M. Claustres, C. Junien, C. Baumann, V. Cormier-Daire, M. Rio, S. Lyonnet, H. Plauchu, D. Lacombe, B. Chevallier, G. Jondeau and C. Boileau (2008). "Identification of 23 TGFBR2 and 6 TGFBR1 gene mutations and genotype-phenotype investigations in 457 patients with Marfan syndrome type I and II, Loeys-Dietz syndrome and related disorders." *Hum Mutat* **29**(11): E284-295.
398. Stocker, W. and W. Bode (1995). "Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins." *Curr Opin Struct Biol* **5**(3): 383-390.
399. Streuli, C. (1999). "Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation." *Curr Opin Cell Biol* **11**(5): 634-640.
400. Sukhova, G. K., G. P. Shi, D. I. Simon, H. A. Chapman and P. Libby (1998). "Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells." *J Clin Invest* **102**(3): 576-583.
401. Swee, M. H., W. C. Parks and R. A. Pierce (1995). "Developmental regulation of elastin production. Expression of tropoelastin pre-mRNA persists after down-regulation of steady-state mRNA levels." *J Biol Chem* **270**(25): 14899-14906.
402. Takenaka, Y., T. Fukumori and A. Raz (2004). "Galectin-3 and metastasis." *Glycoconj J* **19**(7-9): 543-549.
403. Tamada, M. (2006). "[Integrin signaling and Src family kinases]." *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **51**(6 Suppl): 616-622.
404. Tamburro, A. M., B. Bochicchio and A. Pepe (2003). "Dissection of human tropoelastin: exon-by-exon chemical synthesis and related conformational studies." *Biochemistry* **42**(45): 13347-13362.
405. Tassabehji, M., K. Metcalfe, D. Donnai, J. Hurst, W. Reardon, M. Burch and A. P. Read (1997). "Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis." *Hum Mol Genet* **6**(7): 1029-1036.
406. Tersteeg, C., M. Roest, E. M. Mak-Nienhuis, E. Ligtenberg, I. E. Hofer, P. G. de Groot and G. Pasterkamp (2012). "A fibronectin-fibrinogen-tropoelastin coating reduces smooth muscle cell growth but improves endothelial cell function." *J Cell Mol Med* **16**(9): 2117-2126.
407. Thompson, R. W., P. J. Geraghty and J. K. Lee (2002). "Abdominal aortic aneurysms: basic mechanisms and clinical implications." *Curr Probl Surg* **39**(2): 110-230.
408. Thurmond, F. and J. Trotter (1996). "Morphology and biomechanics of the microfibrillar network of sea cucumber dermis." *J Exp Biol* **199**(Pt 8): 1817-1828.
409. Thyberg, J., K. Blomgren, U. Hedin and M. Dryjski (1995). "Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study." *Cell Tissue Res* **281**(3): 421-433.
410. Thyberg, J., K. Blomgren, J. Roy, P. K. Tran and U. Hedin (1997). "Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin." *J Histochem Cytochem* **45**(6): 837-846.
411. Toupance, S., B. Brassart, F. Rabenoelina, C. Ghoneim, L. Vallar, M. Polette, L. Debelle and P. Birembaut (2012). "Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA." *Clin Exp Metastasis* **29**(5): 511-522.
412. Travis, J. and G. Salvesen (1983). "Control of coagulation and fibrinolysis by plasma proteinase inhibitors." *Behring Inst Mitt*(73): 56-65.
413. Tseng, H., T. E. Peterson and B. C. Berk (1995). "Fluid shear stress stimulates mitogen-activated protein kinase in endothelial cells." *Circ Res* **77**(5): 869-878.
414. Ulrich, F. and C. P. Heisenberg (2009). "Trafficking and cell migration." *Traffic* **10**(7): 811-818.
415. Underwood, P. A., F. A. Bennett, A. Kirkpatrick, P. A. Bean and B. A. Moss (1995). "Evidence for the location of a binding sequence for the alpha 2 beta 1 integrin of endothelial cells, in the beta 1 subunit of laminin." *Biochem J* **309** (Pt 3): 765-771.
416. Urban, Z., S. Peyrol, H. Plauchu, M. T. Zabot, M. Lebowl, K. Schilling, M. Green, C. D. Boyd and K. Csiszar (2000). "Elastin gene deletions in Williams syndrome patients result in

- altered deposition of elastic fibers in skin and a subclinical dermal phenotype." Pediatr Dermatol **17**(1): 12-20.
417. Urban, Z., S. Riazi, T. L. Seidl, J. Katahira, L. B. Smoot, D. Chitayat, C. D. Boyd and A. Hinek (2002). "Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome." Am J Hum Genet **71**(1): 30-44.
418. Vakonakis, I. and I. D. Campbell (2007). "Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure." Curr Opin Cell Biol **19**(5): 578-583.
419. Vallet, B. and E. Wiel (2001). "Endothelial cell dysfunction and coagulation." Crit Care Med **29**(7 Suppl): S36-41.
420. van der Rest, M. and R. Garrone (1991). "Collagen family of proteins." FASEB J **5**(13): 2814-2823.
421. Varga, Z., M. P. Jacob, J. Csongor, L. Robert, A. Leovey and T. Fulop, Jr. (1990). "Altered phosphatidylinositol breakdown after K-elastin stimulation in PMNLs of elderly." Mech Ageing Dev **52**(1): 61-70.
422. Vehvilainen, P., M. Hyytiainen and J. Keski-Oja (2003). "Latent transforming growth factor-beta-binding protein 2 is an adhesion protein for melanoma cells." J Biol Chem **278**(27): 24705-24713.
423. Verhave, J. C., P. Fesler, G. du Cailar, J. Ribstein, M. E. Safar and A. Mimran (2005). "Elevated pulse pressure is associated with low renal function in elderly patients with isolated systolic hypertension." Hypertension **45**(4): 586-591.
424. Vila, E., N. M. Vivas, A. Tabernero, J. Giraldo and S. M. Arribas (1997). "Alpha 1-adrenoceptor vasoconstriction in the tail artery during ageing." Br J Pharmacol **121**(5): 1017-1023.
425. Vitarelli, A., Y. Conde, E. Cimino, I. D'Angeli, S. D'Orazio, S. Stellato, V. Padella and F. Caranci (2006). "Aortic wall mechanics in the Marfan syndrome assessed by transesophageal tissue Doppler echocardiography." Am J Cardiol **97**(4): 571-577.
426. Vollbrandt, T., K. Tiedemann, E. El-Hallous, G. Lin, J. Brinckmann, H. John, B. Batge, H. Notbohm and D. P. Reinhardt (2004). "Consequences of cysteine mutations in calcium-binding epidermal growth factor modules of fibrillin-1." J Biol Chem **279**(31): 32924-32931.
427. Vrhovski, B. and A. S. Weiss (1998). "Biochemistry of tropoelastin." Eur J Biochem **258**(1): 1-18.
428. Wachi, H., Y. Seyama, S. Yamashita, H. Suganami, Y. Uemura, K. Okamoto, H. Yamada and S. Tajima (1995). "Stimulation of cell proliferation and autoregulation of elastin expression by elastin peptide VPGVG in cultured chick vascular smooth muscle cells." FEBS Lett **368**(2): 215-219.
429. Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2007). "New insights into elastic fiber assembly." Birth Defects Res C Embryo Today **81**(4): 229-240.
430. Wagenseil, J. E. and R. P. Mecham (2009). "Vascular extracellular matrix and arterial mechanics." Physiol Rev **89**(3): 957-989.
431. Wallace, R. N., B. W. Streeten and R. B. Hanna (1991). "Rotary shadowing of elastic system microfibrils in the ocular zonule, vitreous, and ligamentum nuchae." Curr Eye Res **10**(1): 99-109.
432. Wang, M. and E. G. Lakatta (2002). "Altered regulation of matrix metalloproteinase-2 in aortic remodeling during aging." Hypertension **39**(4): 865-873.
433. Wang, M. C., Y. Lu and C. Baldock (2009). "Fibrillin microfibrils: a key role for the interbead region in elasticity." J Mol Biol **388**(1): 168-179.
434. Warshel, A., G. Naray-Szabo, F. Sussman and J. K. Hwang (1989). "How do serine proteases really work?" Biochemistry **28**(9): 3629-3637.
435. Wennerberg, K. and C. J. Der (2004). "Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)." J Cell Sci **117**(Pt 8): 1301-1312.
436. Wennerberg, K., K. L. Rossman and C. J. Der (2005). "The Ras superfamily at a glance." J Cell Sci **118**(Pt 5): 843-846.
437. Wherlock, M. and H. Mellor (2002). "The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story." J Cell Sci **115**(Pt 2): 239-240.

438. Whiteman, P. and P. A. Handford (2003). "Defective secretion of recombinant fragments of fibrillin-1: implications of protein misfolding for the pathogenesis of Marfan syndrome and related disorders." *Hum Mol Genet* **12**(7): 727-737.
439. Williams, J. C., B. G. Barratt-Boyes and J. B. Lowe (1961). "Supravalvular aortic stenosis." *Circulation* **24**: 1311-1318.
440. Wipff, P. J., D. B. Rifkin, J. J. Meister and B. Hinz (2007). "Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta1 from the extracellular matrix." *J Cell Biol* **179**(6): 1311-1323.
441. Wolfe, B. L., C. B. Rich, H. D. Goud, A. J. Terpstra, M. Bashir, J. Rosenbloom, G. E. Sonenshein and J. A. Foster (1993). "Insulin-like growth factor-I regulates transcription of the elastin gene." *J Biol Chem* **268**(17): 12418-12426.
442. Wolinsky H, G. S. (1967). "A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals." *Circulation Research* **20**: 99-111.
443. Woodman, C. R., J. R. Turk, D. P. Williams and M. H. Laughlin (2003). "Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs." *J Appl Physiol* **94**(5): 2017-2026.
444. Xavier-Neto, J., R. A. Castro, A. C. Sampaio, A. P. Azambuja, H. A. Castillo, R. M. Cravo and M. S. Simoes-Costa (2007). "Parallel avenues in the evolution of hearts and pumping organs." *Cell Mol Life Sci* **64**(6): 719-734.
445. Yamada, K. M. (1983). "Cell surface interactions with extracellular materials." *Annu Rev Biochem* **52**: 761-799.
446. Yamamoto, K., M. Aoyagi and M. Yamamoto (1995). "Changes in elastin-binding proteins during the phenotypic transition of rabbit arterial smooth muscle cells in primary culture." *Exp Cell Res* **218**(1): 339-345.
447. Yamamoto, M. and K. Yamamoto (1993). "[Regulation of differentiated properties of arterial smooth muscle cells]." *Nihon Rinsho* **51**(8): 1980-1986.
448. Yanagisawa, H., E. C. Davis, B. C. Starcher, T. Ouchi, M. Yanagisawa, J. A. Richardson and E. N. Olson (2002). "Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo." *Nature* **415**(6868): 168-171.
449. Yao, X. and C. J. Garland (2005). "Recent developments in vascular endothelial cell transient receptor potential channels." *Circ Res* **97**(9): 853-863.
450. Yayon, A., M. Klagsbrun, J. D. Esko, P. Leder and D. M. Ornitz (1991). "Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor." *Cell* **64**(4): 841-848.
451. Ye, F., C. Kim and M. H. Ginsberg (2011). "Molecular mechanism of inside-out integrin regulation." *J Thromb Haemost* **9** Suppl 1: 20-25.
452. Yildiz, O. (2007). "Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging." *Ann N Y Acad Sci* **1100**: 353-360.
453. Zhang, H., S. D. Apfelroth, W. Hu, E. C. Davis, C. Sanguineti, J. Bonadio, R. P. Mecham and F. Ramirez (1994). "Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices." *J Cell Biol* **124**(5): 855-863.
454. Zhang, H., W. Hu and F. Ramirez (1995). "Developmental expression of fibrillin genes suggests heterogeneity of extracellular microfibrils." *J Cell Biol* **129**(4): 1165-1176.
455. Zitka, O., J. Kukacka, S. Krizkova, D. Huska, V. Adam, M. Masarik, R. Prusa and R. Kizek (2010). "Matrix metalloproteinases." *Curr Med Chem* **17**(31): 3751-3768.

6)Annexe

Rôle de l'élastine et des microfibrilles de la paroi artérielle au cours du développement et du vieillissement : complémentarité ou opposition ?

Wassim Fhayli¹, Zeinab Ghandour¹, Boubacar Mariko², Mylène Pezet³ et Gilles Faury¹

¹ Laboratoire Hypoxie : Physiopathologie Cardiovasculaire et Respiratoire (HP2), INSERM U 1042, Université Joseph Fourier, Bâtiment Jean Roget, Facultés de Médecine et de Pharmacie, Domaine de La Merci, 38706 La Tronche, France

² Centre de Recherche Cardiovasculaire, Hôpital Européen Georges Pompidou, Université Paris Descartes, INSERM U970, 56 rue Leblanc, 75015 Paris, France

³ Institut Albert Bonniot, Université Joseph Fourier-INSERM U823, Rond-point de la Chantourne, 38706 La Tronche, France

Auteur correspondant : Gilles Faury, Gilles.Faury@ujf-grenoble.fr

Reçu le 24 janvier 2012

Résumé – Les grosses artères permettent au système vasculaire d'être plus qu'une simple voie de circulation du sang dans l'organisme. Les fibres élastiques présentes dans la paroi de ces vaisseaux rendent ceux-ci élastiques et permettent le lissage de la pression et du flux sanguins très discontinus délivrés par le cœur. Cette fonction est impérative pour permettre une hémodynamique correcte. Les fibres élastiques sont constituées d'élastine et de microfibrilles riches en fibrillines qui procurent aux artères leurs propriétés élastiques et qui sont aussi des signaux pouvant se fixer à des récepteurs membranaires relativement spécifiques. Cette double fonction mécanique et de signalisation met les fibres élastiques à la croisée des processus de développement et de vieillissement prenant place dans les vaisseaux sanguins. Une altération de la fonction des gènes de l'élastine ou des fibrillines conduit à des pathologies génétiques lourdes affectant le système cardiovasculaire, comme la sténose aortique supra-valvulaire, ou le syndrome de Williams-Beuren, dans lesquels le déficit de production d'élastine induit des sténoses aortiques, ou le syndrome de Marfan, au cours duquel le déficit de production de fibrilline-1 provoque au contraire l'apparition d'anévrismes aortiques. Des modèles de souris génétiquement modifiées de ces maladies ont permis de mieux comprendre la pathogenèse de ces syndromes. En particulier, il a été montré que les rôles fonctionnels et morphogénétiques de l'élastine et de la fibrilline-1 peuvent s'additionner et donc être complémentaires par certains aspects, alors qu'ils peuvent s'opposer dans d'autres situations. Aussi, il est maintenant avéré que des modifications précoces de la disponibilité en élastine ou fibrilline-1 peuvent altérer la fonction de signalisation normale de ces protéines et conduire à long terme à des modifications de la physiologie vasculaire et des processus de vieillissement.

Mots clés : Élastine / microfibrilles / fibrillines / développement et vieillissement artériels / pathologies génétiques

Abstract – Elastin and microfibrils in vascular development and ageing: complementary or opposite roles?

Large arteries allow the vascular system to be more than a simple route in which the blood circulates within the organism. The elastic fibers present in the wall endow these vessels with elasticity and are responsible for the smoothing of the blood pressure and flow, which are delivered discontinuously by the heart. This function is very important to ensure appropriate hemodynamics. Elastic fibers are composed of elastin (90%) and fibrillin-rich microfibrils (10%) which provide the vessels with elasticity and are also signals able to bind to relatively specific cell membrane receptors. Stimulation of the high affinity elastin

receptor by elastin peptides or tropoelastin – the elastin precursor – triggers an increase in intracellular free calcium in vascular cells, especially endothelial cells, associated with attachment, migration or proliferation. Similar effects of the stimulation of endothelial cells by microfibrils or fibrillin-1 fragments, which bind to integrins, have been demonstrated. This dual function – mechanical and in signaling – makes the elastic fibers an important actor of the development and ageing processes taking place in blood vessels. An alteration of the elastin (*Eln*) or fibrillin (*Fbn*) gene products leads to severe genetic pathologies of the cardiovascular system, such as supravalvular aortic stenosis, or Williams Beuren syndrome – in which elastin deficiency induces aortic stenoses – or Marfan syndrome, in which on the contrary fibrillin-1 deficiency promotes the appearance of aortic aneurysms. Genetically-engineered mouse models of these pathologies (such as *Eln*^{+/-} mice and *Fbn-1*^{+/^{mgΔ}} mice, *Eln*^{+/-}*Fbn-1*^{+/-} mice) have permitted a better understanding of the pathogenesis of these syndromes. In particular, it has been shown that elastin and fibrillin-1 roles can be complementary in some aspects, while they can be opposed in some other situations. For instance, the double heterozygosity in elastin and fibrillin-1 leads to increased arterial wall stress – compared to the level induced by one of these two deficiencies alone – while the decrease in diameter induced by *Eln* deficiency is partly compensated by an additional deficiency in *Fbn-1*. Also, it is now clear that early modifications of elastin or fibrillin-1 availability can alter the normal signaling action of these proteins and lead to long term modifications of the vascular physiology and ageing processes.

Key words: Elastin / microfibrils / fibrillins / vascular development and ageing / genetic pathologies

Abréviations

CMLV, cellule musculaire lisse vasculaire
 EBP, *elastin-binding protein*
Eln, gène de l'élastine
Fbn, gène de la fibrilline
 HUVEC, cellule endothéliale de la veine ombilicale humaine
 LTBP 1-4, protéines de liaison au TGF- β
 MAGP-1 et 2, glycoprotéines associées aux microfibrilles
 MEC, matrice extracellulaire
 MMP, métalloprotéinases matricielles
 MT1-MMP, *membrane-type 1-MMP*
 SASV, sténose aortique supravalvulaire
 SWB, syndrome de Williams-Beuren

De façon similaire à un réseau de communication, le système vasculaire assure à la totalité des cellules de l'organisme une fourniture en substances vitales et l'élimination des déchets métaboliques. Le sang est éjecté du cœur et circule consécutivement à travers différents types de vaisseaux sanguins. Du côté proximal se trouvent les gros troncs artériels élastiques, puis distalement apparaissent ensuite les artères musculaires et les artérioles, les capillaires et les veines. Outre leur fonction de distribution commune à tous les vaisseaux du système artériel, les artères élastiques – telles que l'aorte ascendante, ses principales branches et l'artère pulmonaire – exercent une fonction supplémentaire majeure. Les propriétés élastiques de leur paroi

confèrent à ces artères une capacité d'amortissement des fortes fluctuations de pression et de débit générés par le cycle cardiaque (120 mmHg en systole/80 mmHg en diastole dans l'aorte, contre 120/5 mmHg dans le ventricule gauche, chez l'Homme). En effet, au cours de la systole, les parois élastiques des gros troncs artériels se distendent sous l'effet de l'éjection d'un volume sanguin, générée sous haute pression, et emmagasinent alors de l'énergie qui est restituée lors du retour passif à leurs dimensions diastoliques. Le volume de sang présent dans la lumière est alors compressé par les artères élastiques et poussé en aval pendant la diastole, ce qui permet une continuité du flux même lorsque le cœur ne propulse plus le sang. Ce phénomène d'amortissement connu sous le nom d'effet « *Windkessel* » permet donc de maintenir une pression et un débit sanguin relativement élevés pendant la diastole, transformant progressivement le débit sanguin pulsatile éjecté depuis le ventricule gauche en un flux plus continu et de pression moins fluctuante dans les artères périphériques à destination des organes irrigués (Tedgui & Lévy, 1997 ; Faury, 2001a ; Safar & Boudier, 2005). Ce sont les fibres élastiques, constituants de la matrice extracellulaire (MEC), qui confèrent aux tissus extensibles tels que les vaisseaux sanguins, leurs propriétés élastiques. Elles sont principalement constituées d'élastine (90 %) et de microfibrilles (10 %) (Rosenbloom *et al.*, 1993 ; Kiely *et al.*, 2002a,b). D'autre part, si la MEC, y compris les fibres élastiques, assure un support structural majeur, garant de l'intégrité physique du système vasculaire, elle est également impliquée dans des processus

de signalisation cellulaire, régulant l'assemblage et l'homéostasie du système vasculaire par le biais des interactions cellules-matrice.

Structure-fonction dans la paroi artérielle : le système composite fibres élastiques/collagène

Les vaisseaux sanguins ont des propriétés élastiques non linéaires, c'est-à-dire qu'ils deviennent plus rigides lorsqu'ils se distendent. Ces propriétés très importantes pour la fonction des grosses artères sont dues à la mise en jeu concomitante des fibres élastiques, l'élastine surtout, mais aussi partiellement des microfibrilles (Lillie *et al.*, 1998) et des collagènes qui sont les principaux constituants respectivement de la *media* et l'adventice. La contribution de l'élastine et des collagènes dans l'élasticité non linéaire des artères a été mise en évidence par Roach & Burton (1957), qui ont montré que la rigidité initiale (à faible extension) de la paroi artérielle correspond à l'élasticité de l'élastine, alors que la rigidité plus forte pour des extensions plus élevées représente la contribution des fibres de collagènes qui se tendent progressivement et limitent l'extension du vaisseau. Les fibres élastiques peuvent être étirées jusqu'à une taille plusieurs fois égale à leur longueur initiale avant d'atteindre leur limite d'élasticité. Le module d'élasticité de l'élastine est de l'ordre de 300–400 kPa pour 100 % d'élongation : l'élastine est six fois plus extensible que le caoutchouc. Elle doit ses propriétés élastiques à la réticulation et à sa composition en résidus hydrophobes qui représentent près de 45 % de ses acides aminés (50 % de valine, 30 % de glycine, alanine et proline) (Rosenbloom *et al.*, 1993). L'élastine est présente en très grande quantité dans les artères élastiques (plus de 50 % du poids sec dans l'aorte) et constitue le principal composant des lames élastiques dans les vaisseaux sanguins. Les collagènes sont, contrairement à l'élastine, très peu extensibles (10 % d'extension au maximum) avec un module élastique de 1 GPa, plusieurs centaines de fois plus élevé que celui de l'élastine. Le rapport élastine/collagènes est un indicateur de l'élasticité d'un vaisseau sanguin. Plus ce rapport est élevé, plus le vaisseau est extensible.

Enfin, il a longtemps été supposé que les microfibrilles servaient uniquement d'échafaudage ou de trame pour l'assemblage de l'élastine. Cependant, les microfibrilles riches en fibrillines sont présentes dans la paroi des artères d'invertébrés – dépourvus d'élastine – et de vertébrés aux côtés de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et de fibroblastes, et participent aussi aux propriétés mécaniques, grâce à leur capacité

à s'étirer de manière réversible en faisant passer leur périodicité de 56 à 160 nm (Gibbons & Shadwick, 1989 ; Davison *et al.*, 1995 ; McConnell *et al.*, 1997 ; Lillie *et al.*, 1998 ; Faury, 2001b ; Kielty *et al.*, 2002a,b ; Sherratt *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2009).

Les fibres élastiques et leurs composants

Les fibres élastiques sont les principaux composants de la matrice extracellulaire artérielle. Elles confèrent leurs propriétés élastiques aux tissus extensibles comme la peau, le poumon et les vaisseaux sanguins. L'architecture des fibres élastiques matures est complexe et hautement spécifique du tissu. Dans l'aorte et les grosses artères par exemple, les fibres élastiques forment des lames concentriques séparées par des cellules musculaires lisses. Dans le poumon, elles sont présentes sous forme de fibres fines avec de nombreuses ramifications à travers l'arbre respiratoire. Dans le derme de la peau, les fibres élastiques sont plus épaisses et disposées de manière horizontale (Kielty *et al.*, 2002b). Les fibres élastiques sont constituées d'élastine (90 %), qui constitue le cœur des fibres élastiques dans les tissus adultes, et de microfibrilles (10 %) qui sont des complexes macromoléculaires (avec une vingtaine de composants) et qui sont localisées à la surface des fibres élastiques dans les tissus adultes. De nombreuses autres protéines s'associent à l'élastine et aux microfibrilles et sont classées en plusieurs catégories selon leur localisation dans les fibres élastiques.

L'élastine

Chez les vertébrés, l'élastine est le principal composant des fibres élastiques, conférant aux tissus soumis à des étirements leurs propriétés élastiques. Elle est présente dans des proportions dépassant souvent la moitié du poids du tissu sec. Elle représente plus de 57 % du poids sec de l'aorte ascendante, 50 % des ligaments élastiques, 7 % du poumon et 5 % de la peau (Wise & Weiss, 2009). L'élastine est synthétisée sous forme d'un précurseur, la tropoélastine, qui va s'assembler pour donner naissance au biopolymère extrêmement insoluble et durable qu'est l'élastine. La tropoélastine est codée par un seul gène situé sur le chromosome 7q11.23 chez l'Homme et sur le chromosome 5 chez la souris (Fazio *et al.*, 1991).

Les microfibrilles

Les microfibrilles sont des complexes protéiques de 10–12 nm de diamètre composés d'au moins 17 molécules

(Kielty *et al.*, 2002b) et ont un aspect en collier de perles avec une périodicité de ~56 nm lorsqu'elles ne sont soumises à aucun étirement (Sherratt *et al.*, 2001). Les fibrillines 1 et 2 sont les principaux composants des microfibrilles mais d'autres protéines associées aux microfibrilles ont été décrites, dont les mieux caractérisées sont les glycoprotéines associées aux microfibrilles (MAGP-1 et 2), les protéines de liaison au TGF- β latent (LTBP 1-4) et les protéines de la famille des fibulines (Sakai *et al.*, 1986 ; Lee *et al.*, 1991 ; Corson *et al.*, 2004 ; Kielty, 2006 ; Weigenseil & Mecham, 2007). Les fibrillines 1 et 2 sont des glycoprotéines de grande taille (~350 kDa) dont les gènes sont situés respectivement sur les chromosomes 15 et 5 chez l'Homme, 2 et 18 chez la souris (Lee *et al.*, 1991 ; Pereira *et al.*, 1993 ; Zhang *et al.*, 1994 ; Kielty *et al.*, 2002b ; Hubmacher *et al.*, 2006), alors que le gène de la fibrilline-3, absent chez les rongeurs, est situé sur le chromosome 19 chez l'Homme (Corson *et al.*, 2004). Les fibrillines ont aussi un rôle majeur dans la liaison et la séquestration des facteurs de croissance comme le TGF- β 1 (Neptune *et al.*, 2003 ; Chaudhry *et al.*, 2007) et la BMP-7 (Arteaga-Solis *et al.*, 2001 ; Gregory *et al.*, 2005) dans la matrice extracellulaire.

Régulation de la fonction cellulaire : fibres élastiques et signalisation cellulaire

Outre leur rôle dans la mécanique tissulaire, les fibres élastiques, à l'instar d'autres composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, ont aussi des fonctions dans la signalisation cellulaire. Certains composants des fibres élastiques ont montré clairement des interactions avec des cellules, se traduisant par des messages intracellulaires qui aboutissent à des modulations de leurs fonctions. En particulier, lors du développement vasculaire, comme dans les autres organes, ces interactions sont importantes dans la morphogénèse. De même, au cours du vieillissement ou dans certaines situations pathologiques, les fibres élastiques sont clivées par des protéases, ce qui libère des fragments de composants de fibres élastiques capables d'interagir avec les cellules et de moduler leurs fonctions.

Fonctions biologiques de l'élastine

L'élastine peut réguler l'activité de divers types cellulaires (Faury, 1998 ; Fulop *et al.*, 1998, 2001 ; Duca *et al.*, 2004) et l'identification de récepteurs à l'origine de la signalisation initiée par l'élastine a été le sujet de nombreuses études. Trois protéines de structure et fonction différentes, capables de se lier à l'élastine, ont été purifiées et décrites. Une protéine de 59 kDa liant

l'hexa-peptide dérivé de l'élastine VGVAPG (Blood *et al.*, 1988), l'élastonectine, une glycoprotéine membranaire de 120 kDa (Hornebeck *et al.*, 1986), un récepteur membranaire tri-unitaire comprenant une sous-unité de 67 kDa capable de lier des peptides d'élastine et la tropoélastine, aussi nommée *elastin-binding protein* (EBP) (Mecham *et al.*, 1989 ; Hinek, 1994a,b), et enfin l'intégrine α V β 3 (Rodgers & Weiss, 2004 ; Bax *et al.*, 2009).

Des résultats *in vitro* ont suggéré que l'EBP intervient au cours de l'élastogénèse et module les effets de l'élastine sur la signalisation dans divers types cellulaires ; cependant les études *in vivo* n'avaient alors pas confirmé son rôle. Or, l'EBP a été impliquée dans la prolifération anormale des fibroblastes dans une pathologie humaine, le syndrome de Costello (Hinek *et al.*, 2000). *In vitro*, l'élastine fibreuse est aussi capable par rétroaction négative de réguler le taux de prolifération des CMLV, proportionnellement à la quantité d'élastine présente dans le milieu (Urban *et al.*, 2002). Certains peptides d'élastine circulants sont également capables de déclencher un chimiotactisme envers les cellules endothéliales (Long *et al.*, 1989). La tropoélastine est aussi directement impliquée dans la régulation de l'état contractile des CMLV par son action sur l'organisation de leurs myofibrilles, *via* un effet activateur sur la polymérisation de l'actine (Karnik *et al.*, 2003). D'autre part, de même que la tropoélastine ou l'élastine fibreuse, les peptides d'élastine sont capables de réguler la prolifération et la migration des CMLV (Ooyama *et al.*, 1987 ; Wachi *et al.*, 1995 ; Spofford & Chilian, 2001). Les peptides issus de la dégradation de l'élastine activent le métabolisme calcique des cellules mésenchymateuses (Jacob *et al.*, 1987). Sur les cellules endothéliales, après fixation des peptides d'élastine *via* la séquence VGVAPG et la mise en jeu de la protéine EBP, il a été montré que l'augmentation du calcium intracellulaire active la production de monoxyde d'azote (NO), qui diffuse vers les CMLV et provoque ainsi une vaso-relaxation dépendante de l'âge (Faury *et al.*, 1994, 1995, 1997, 1998b,c). Le NO induit *via* l'activation de la voie PI3-kinase/Akt/NO synthase provoque alors la synthèse et l'activation de MT1-MMP (Membrane-type 1 MMP) par la voie NO/cGMP/Erk1/2 (Fahem *et al.*, 2008). La tropoélastine exerce également la même action vaso-relaxante que les peptides d'élastine (Faury *et al.*, 1998). Les peptides d'élastine augmentent aussi la survie des cellules endothéliales, la migration cellulaire, l'expression et l'activation de ERK1/2 et des proMMP2 et proMT1-MMP *via* la voie PI3K/Akt, des activités sialidases, et activent l'angiogénèse *in vivo* et *in vitro* (Robinet *et al.*, 2005 ; Duca *et al.* 2005, 2007).

Rôle de la fibrilline-1

Les fragments recombinants de fibrilline-1 contenant le motif RGD interagissent avec les récepteurs de type intégrine ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 6$) sur plusieurs types cellulaires incluant les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes (Pfaff *et al.*, 1996 ; Sakamoto *et al.*, 1996 ; Bax *et al.*, 2003, 2007 ; Porst *et al.*, 2006 ; Williamson *et al.*, 2007). Les intégrines sont des récepteurs cellulaires qui sont importants dans plusieurs fonctions cellulaires dont l'adhérence, la migration et la prolifération. Les intégrines jouent aussi un rôle critique dans la morphogénèse vasculaire (Stupack & Cheresch, 2004). Ces fragments recombinants sont impliqués dans l'adhérence et la migration des fibroblastes et des cellules mésangiales *in vitro* (Pfaff *et al.*, 1996 ; Sakamoto *et al.*, 1996 ; Bax *et al.*, 2003, 2007 ; Porst *et al.*, 2006 ; Williamson *et al.*, 2007), et augmentent aussi l'expression et la production de MMP-1 et MMP-3 (Booms *et al.*, 2005). D'autres fragments de fibrilline-1, ne contenant pas le motif RGD, se sont aussi avérés nécessaires pour la signalisation cellulaire. Notamment, les fragments contenant le motif GxxPG, qui est une séquence de reconnaissance de l'EBP (*Elastin Binding Protein*), ont montré des propriétés chimiotactiques envers les macrophages, comparables à celles des fragments de dégradation de l'élastine (Guo *et al.*, 2006). Ces fragments augmentent aussi la production de MMP-1 par des fibroblastes humains (Booms *et al.*, 2006). Les microfibrilles, par l'intermédiaire de la fibrilline-1 entre autres, séquestrent les facteurs de croissance comme le TGF- β . Des fragments de fibrilline-1 contenant la séquence codée par les exons 44-49 (PF10 et PF11) régulent la biodisponibilité du TGF- $\beta 1$ et activent le TGF- β qui est aussi un des éléments clés dans la pathogénèse du syndrome de Marfan, surtout au niveau pulmonaire (Neptune *et al.*, 2003).

La fibrilline-1 est un signal déterminant dans la morphogénèse artérielle. La déficience en fibrilline-1 empêche la maturation de la paroi aortique, en inhibant la différenciation des cellules musculaires lisses, phénomène observé dans la paroi aortique des souris *Fbn-1*^{-/-} (Carta *et al.*, 2006). Ces effets pourraient résulter d'un défaut de signalisation normale des microfibrilles. En effet, nous avons montré que les microfibrilles aortiques, tout comme les peptides d'élastine, déclenchent une signalisation dans les cellules endothéliales en augmentant le niveau de calcium libre intracellulaire au moins en partie par l'intermédiaire de la fibrilline-1, dont un fragment (PF14) induit une signalisation calcique médiée par $\alpha V\beta 3$ et $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules endothéliales, parallèlement à une activation de

la prolifération, de la migration et de l'adhésion de ces cellules (Mariko *et al.*, 2010).

Rôle des autres composants des microfibrilles

De manière générale, les microfibrilles interagissent *in vitro* avec plusieurs types cellulaires, incluant les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (Bax *et al.*, 2003) et sont les médiateurs de l'adhérence de ces cellules. Aussi, les microfibrilles isolées induisent *in vitro* une stimulation de la signalisation calcique dans les cellules endothéliales (Mariko *et al.*, 2010). Plusieurs composants des microfibrilles contenant le motif RGD, comme les fibrillines, la fibuline-5 et la MAGP-2, interagissent aussi avec les cellules par l'intermédiaire des intégrines. La fibuline-5 interagit avec les cellules endothéliales humaines (HUVECs) de manière dépendante de la séquence RGD (Nakamura *et al.*, 2002). Elle annule la capacité des cellules endothéliales à effectuer le bourgeonnement angiogénique (*sprouting*) sous l'effet du VEGF, en inhibant leur prolifération et l'invasion dans une matrice de Matrigel (Albig & Schiemann, 2004). MAGP-2 qui, contrairement à son homologue MAGP-1, contient un domaine RGD, interagit fortement avec plusieurs types cellulaires (fibroblastes, chondrocytes, ostéoblastes, cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) *via* l'intégrine $\alpha V\beta 3$. Elle intervient dans le processus d'étalement de toutes ces cellules à l'exception des cellules endothéliales (Gibson *et al.*, 1999). LTBP-1 interagit avec les cellules musculaires lisses de rats diabétiques *via* l'intégrine $\beta 3$ et accélère la migration de ces cellules, ce qui suggère sa contribution à l'épaississement intimal chez ces rats (Kanzaki & Otabe, 2003). LTBP-1 favorise aussi la différenciation des cellules souches embryonnaires en endothélium (Gualandris *et al.*, 2000). La décorine, un petit protéoglycane riche en leucine, inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales humaines et la formation de structures tubulaires endothéliales *in vitro* (Davies *et al.*, 2001). Le versican, protéoglycane abondant de la paroi de vaisseaux sanguins, augmente la prolifération et la migration des cellules endothéliales, et lie l'intégrine $\beta 1$ (Kenagy *et al.*, 2006).

Altérations génétiques des fibres élastiques, vieillissement et pathologies vasculaires

L'élastogénèse est un processus complexe s'opérant par la succession de multiples étapes hiérarchisées (figure 1). C'est pourquoi des mutations dans des gènes

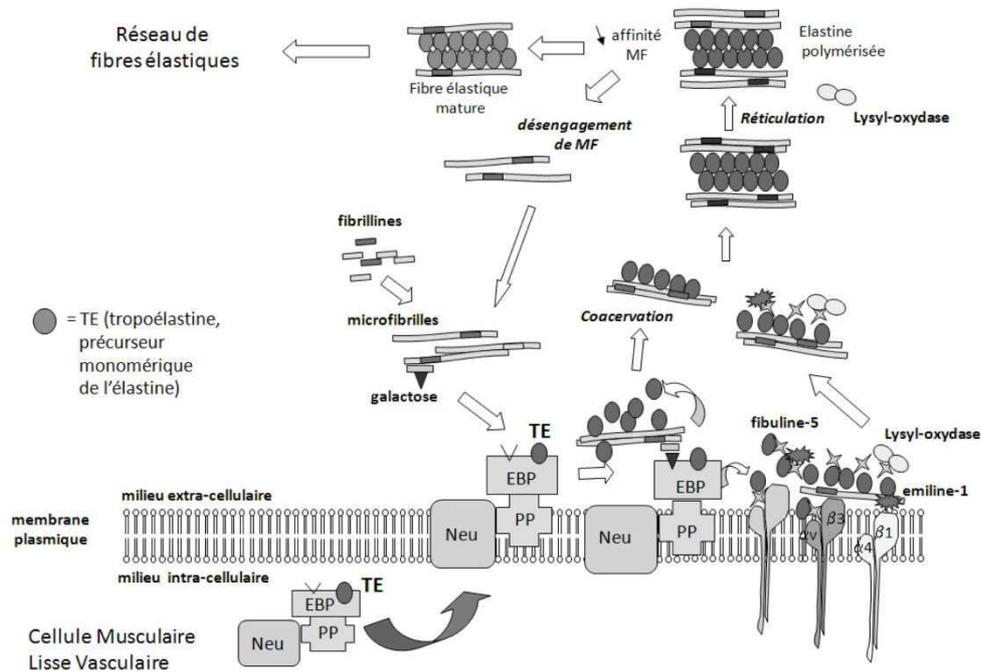


Fig. 1. Assemblage des fibres élastiques au cours du développement. Lire la figure de bas en haut. Les cellules musculaires lisses vasculaires synthétisent la tropoélastine (TE), précurseur de l'élastine, qui est exportée hors de la cellule par une protéine chaperone trimérique (EBP : *elastin binding protein* ; Neu : neuraminidase ; PP : *protective protein*). La TE est assemblée avec les microfibrilles et polymérisée grâce à l'intervention de différents processus et molécules, dont l'établissement de liaisons croisées réalisées par la famille des lysyl-oxydases (LOX). La fibre élastique mature est intégrée dans les tissus, à qui elle procure des propriétés d'élasticité.

impliqués dans la formation des fibres élastiques sont susceptibles de provoquer des pathologies, notamment au niveau cardiovasculaire. Les causes génétiques de l'altération de l'élastogenèse sont multiples. Leur nature et les pathologies associées sont listées ci-dessous :

- Mutations au niveau des fibrillines : des mutations de la fibrilline-1 provoquent le syndrome de Marfan, caractérisé par l'apparition d'anévrismes plus ou moins sévères (Dietz *et al.*, 1991, 2005 ; Robinson & Booms, 2001). Il s'agit d'une pathologie autosomique dominante héréditaire, qui se traduit au niveau cardiovasculaire par une malformation et une insuffisance cardiaque, ainsi que des anévrismes et dissections aortiques corrélées à une migration et une réduction du nombre de CMLV (Lee *et al.*, 1991 ; Ramirez *et al.*, 1993). Plusieurs hypothèses essaient d'expliquer les causes de cette pathologie : (1) le

modèle dominant négatif, selon lequel la mutation de la fibrilline-1 interfère avec la formation des fibres élastiques et (2) le modèle de l'haplo-insuffisance qui considère que la baisse de la quantité de fibrilline-1 en dessous d'un seuil critique est à l'origine du syndrome de Marfan (Aoyama *et al.*, 1994 ; Eldadah *et al.*, 1995 ; Judge *et al.*, 2004), et (3) un modèle plus récent qui repose sur l'augmentation de la signalisation induite par le TGF- β par suite de la mutation de la fibrilline-1 ou de l'un des récepteurs 1 et 2 du TGF- β (T β R1 et T β R2) (Neptune *et al.*, 2003 ; Stheneur *et al.*, 2008). Des mutations de la fibrilline-2 induisent une arachnodactylie contracturale congénitale (Arteaga-Solis *et al.*, 2001). D'autres fibrillinopathies existent, telles que le syndrome de Shprintzen-Goldberg (Sood *et al.*, 1996 ; Robinson *et al.*, 2006), le syndrome MASS

- (Dietz *et al.*, 1993) ou « *Ectopia lentis* » familiale (Ades *et al.*, 2004).
- Défaut d'assemblage des fibres élastiques lié à une forte concentration péricellulaire de glycosaminoglycane (dermatane sulfate, chondroïtine sulfate) : syndrome de Hurler, syndrome de Costello.
 - Sécrétion de tropoélastine mutée, mutations des gènes fibuline-4 et fibuline-5 : *Cutis laxa*.
 - Mutations au niveau du gène de la β -galactosidase induisant un déficit en EBP (récepteur à l'élastine-laminine) : gangliosidose-GM1 et maladie de Morquio B.
 - Déficit de production de tropoélastine : sténose aortique supra- valvulaire (SASV), qui apparaît isolément ou comme un des symptômes du syndrome de Williams-Beuren (SWB). La sténose artérielle est due à une hyperprolifération des CMLV – engendrée par le déficit en élastine – qui augmente le volume de la paroi au détriment de la lumière vasculaire.

La mise en cause des fibrillines

Les mutations dans les gènes de la fibrilline-1 sont associées au syndrome de Marfan (Lee *et al.*, 1991 ; Kielty & Shuttleworth, 1995 ; Robinson & Godfrey, 2000). Les causes principales de morbi-mortalité de ce syndrome sont des atteintes cardiovasculaires caractérisées par des dilatations et des ruptures aortiques de type anévrismales. L'étude de modèles murins déficients en fibrilline-1, qui reproduisent en partie la pathologie humaine, suggère l'importance des microfibrilles dans la structure et l'homéostasie des fibres élastiques plutôt que dans leur assemblage (Pereira *et al.*, 1999). En effet, les CMLV des souris déficientes en fibrilline-1 présentent une transition d'un état contractile quiescent vers un phénotype synthétique prolifératif. Cette manifestation s'accompagne d'une production accrue de MMP qui pourraient être à l'origine de la fragilité de la paroi artérielle (Bunton *et al.*, 2001). Une étude récente suggère que la fibrilline-2 serait impliquée dans les phases initiales de l'assemblage des fibres élastiques, et ce de façon partiellement redondante avec la fibrilline-1, qui pourrait donc compenser le déficit en fibrilline-2, expliquant ainsi l'absence d'atteinte vasculaire (Carta *et al.*, 2006).

La déficience quantitative en fibrilline-1 rend les lames élastiques plus fragiles et donc plus susceptibles de rompre à la suite d'un étirement répétitif qui leur est appliqué dans la paroi aortique. De plus, la déficience quantitative en fibrilline-1 pourrait empêcher une bonne organisation des fibres de collagène par les microfibrilles dans l'adventice, ce qui affaiblit la

capacité de cette tunique à limiter la dilatation maximale de l'aorte. L'aorte serait alors soumise à un stress qui conduirait à la dilatation aortique et au remodelage de la paroi artérielle. L'étirement subi par les cellules musculaires lisses de la paroi et/ou la rupture de l'interaction entre ces cellules et les fibres élastiques pourrait induire un changement de phénotype de ces cellules qui se mettraient à synthétiser les MMPs. Ces dernières pourraient être synthétisées aussi par les cellules monocytaires qui s'infiltreraient dans la *média* comme dans certains cas d'anévrismes (Koch *et al.*, 1990 ; Kuivaniemi *et al.*, 2008).

Le tableau de la pathogénèse du syndrome de Marfan pourrait être complété dans l'avenir par la perturbation de la signalisation induite par la fibrilline-1 dans les cellules endothéliales (Mariko *et al.*, 2010) et musculaires lisses vasculaires.

La mise en cause de l'élastine

La sténose aortique supra- valvulaire (SASV) est une pathologie vasculaire obstructive décrite pour la première fois en 1842 (D'Cruz & Millers, 1964). La SASV peut être sporadique, transmise selon le mode autosomique dominant isolé ou encore se rattacher au syndrome de Williams-Beuren (SWB) (Williams *et al.*, 1961 ; Beuren *et al.*, 1962). Ces deux pathologies génétiques font partie des maladies rares puisque leur incidence a été estimée respectivement à une naissance sur 25 000 pour la SASV (Ewart *et al.*, 1994) et à une naissance sur 20 000 à 50 000 pour le SWB (Duba *et al.*, 2002). Des études de génétique moléculaire menées chez l'Homme ont mis en évidence l'existence d'un lien direct entre des mutations dans un des deux allèles du gène de l'élastine (hétérozygotie) et la survenue de la SASV (Curran *et al.*, 1993 ; Ewart *et al.*, 1993a,b ; Olson *et al.*, 1995). C'est pourquoi l'haplo-insuffisance du gène de l'élastine est, dans la majorité des cas, le mécanisme à l'origine de la SASV non syndromique.

Le SWB est provoqué par la délétion d'une région entière (1,5–2 Mb) sur le chromosome 7q11.23, aboutissant à la perte totale d'un des deux allèles du gène de l'élastine et d'au moins 14 autres gènes avoisinants (Ewart *et al.*, 1993b ; Francke, 1999). Les individus affectés présentent alors une hémizygotie du gène de l'élastine. Si les cellules de patients SASV ne déposent approximativement que 50 % d'élastine, comparativement à des cellules normales, celles de patients atteints du SWB n'en déposent que 15 %. Comme son nom l'indique, la SASV est généralement caractérisée par un rétrécissement important de l'aorte ascendante,

juste au-dessus des valves aortiques, ou bien elle est diffuse, avec des sténoses plus ou moins continues le long de l'aorte (Vaideeswar *et al.*, 2001). D'autres artères peuvent également être touchées (Zalzstein *et al.*, 1991 ; Eronen *et al.*, 2002).

L'hypertension est fréquente chez les patients SASV et SWB, elle résulte parfois de sténoses de l'artère rénale mais est le plus souvent inexplicée (Eronen *et al.*, 2002 ; Cherniske *et al.*, 2004). La seule stratégie thérapeutique disponible à ce jour est de nature chirurgicale : aortoplastie, endarterectomie, etc. Un suivi médical régulier est indispensable en raison du risque élevé de développer une cardiopathie ou une hypertension artérielle. Si elle n'est pas corrigée, la SASV conduit à une élévation de la pression intracardiaque et à une hypertrophie myocardique, qui peuvent aboutir à une défaillance cardiaque et au décès du patient. De plus la sténose des artères coronaires et cérébrales augmente fortement le risque d'infarctus du myocarde et cérébral (Nakanishi *et al.*, 1996 ; Bonnet *et al.*, 1997).

Les modèles murins de déficit génétique des composants des fibres élastiques

Afin de mieux étudier et comprendre la pathogenèse des maladies précédemment décrites, des modèles expérimentaux ont été générés chez la souris. Nous décrivons ici quelques modèles qui impliquent l'élastine et la fibrilline-1.

Invalidation du gène de l'élastine (*Eln*) chez la souris

Les premières études ont révélé un certain nombre de similitudes avec les caractéristiques des patients : les souris *Eln*^{+/-} présentent à l'âge adulte une forte hypertension (systémique et pulmonaire), une hypertrophie cardiaque ainsi qu'un remodelage de la paroi artérielle caractérisé par une augmentation du nombre de lames élastiques (+38 %) en dépit de la réduction du contenu en élastine (-50 %), la présence de lames élastiques plus fines et plus souvent fragmentées avec des contours irréguliers, et une accumulation sub-endothéliale de matrice extracellulaire se traduisant par une réduction du diamètre interne et une diminution de l'extensibilité de ces artères, malgré l'absence de réelle sténose (Li *et al.*, 1998b ; Faury *et al.*, 1999, 2003 ; Pezet *et al.*, 2008 ; Shifren *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent aussi qu'au cours du développement, les artères des souris *Eln*^{+/-} organisent des unités lamellaires supplémentaires, afin de compenser la perte d'élasticité et de support biomécanique liée au déficit en élastine.

D'autre part, étant donné le rôle structural essentiel accordé jusque-là à l'élastine, l'hypothèse alors émise était qu'une déficience totale en élastine conduirait à une dilatation artérielle, éventuellement jusqu'à la rupture, de façon similaire au phénotype observé dans les mutations du collagène et de la fibrilline-1 (Pereira *et al.*, 1997). En fait, de façon tout à fait inattendue, il a été observé que les souris nouveau-nées totalement déficientes en élastine (*Eln*^{-/-}) mourraient dans les 72 h après la naissance d'occlusion vasculaire causée par une prolifération sous-endothéliale excessive et une accumulation de CMLV (Li *et al.*, 1998a). Le même processus a d'ailleurs été reproduit *in vitro*, sur des explants d'artères de souris *Eln*^{-/-}, indiquant que cette hyperprolifération de CMLV ne résultait pas d'un éventuel stress hémodynamique mais d'un processus de signalisation direct (Li *et al.*, 1998a).

L'élastine est alors apparue comme un élément clé de la régulation de la prolifération, migration et différenciation des CMLV, indispensable à la morphogenèse artérielle et stabilisant la structure de ces vaisseaux. Des expériences *in vitro* ont confirmé par la suite l'effet inhibiteur direct de l'élastine sur la prolifération des CMLV. En effet, des études récentes menées sur des cellules déficientes en élastine (*Eln*^{-/-}), ou provenant de patients SVAS et SWB, ont permis d'élucider en partie la voie de signalisation liée au contrôle de la prolifération des CMLV par l'élastine. Ainsi, des CMLV *Eln*^{-/-} cultivées *in vitro* prolifèrent à un taux deux fois plus élevé que les cellules témoins, ne forment pas d'appareil contractile et présentent un chimiotactisme exagéré vis-à-vis de substances exogènes. Toutes ces caractéristiques de phénotype immature peuvent être annulées par l'addition d'élastine recombinante dans le milieu de culture (Karnik *et al.*, 2003). Il a également été démontré que l'élastine exercerait ses fonctions régulatrices par l'intermédiaire d'une voie de signalisation liée à une protéine G (Urban *et al.*, 2002).

Les souris *Eln*^{+/-} ont par ailleurs permis d'étudier les conséquences du déficit en élastine sur le vieillissement du système cardiovasculaire. Chez la souris, comme chez l'Homme, le vieillissement artériel s'accompagne d'une rigidification et d'une dilatation des gros troncs artériels élastiques, avec un épaississement de l'aorte proximale. Les artères élastiques de souris *Eln*^{+/-}, hypertendues, présentent, comme les artères de souris *Eln*^{+/+}, une dilatation au cours du vieillissement mais, curieusement, leur paroi ne s'épaissit pas. De façon très intéressante, la comparaison des profils d'extensibilité des artères de souris en fonction de l'âge et du génotype a mis en évidence des similitudes entre les artères de souris *Eln*^{+/-} adultes avec celles de souris *Eln*^{+/+} âgées. L'augmentation de la rigidité

artérielle liée au vieillissement résulterait plutôt d'altérations des propriétés mécaniques intrinsèques des fibres élastiques elles-mêmes, donc de la structuration des fibres élastiques et non d'une variation notable du contenu de leurs constituants. Une altération de la fonction endothéliale a aussi été observée chez les souris *Eln*^{+/-}. L'ensemble de ces résultats suggère donc que le déficit en élastine pourrait conduire à un vieillissement prématuré de la paroi artérielle. Enfin, la vasoconstriction médiée par les agonistes α -adrénergiques diminue normalement avec l'âge chez les souris *Eln*^{+/+}, mais pas chez les souris *Eln*^{+/-}, ce qui suggère cette fois que les souris *Eln*^{+/-} pourraient paradoxalement être aussi protégées contre certains effets normaux du vieillissement. L'ensemble de ces résultats a montré que des variations précoces dans la disponibilité de l'élastine peut conduire, à long terme, à une modification des processus de vieillissement (Pezet *et al.*, 2008).

Invalidation du gène de la fibrilline-1 (*Fbn-1*) chez la souris

Pour comprendre la pathogénèse du syndrome de Marfan, plusieurs modèles de souris portant des mutations dans le gène de la fibrilline-1 ont été créés. Les souris *mg* Δ sont générées par délétion des exons 19–24 (remplacés par une cassette NeoR), codant pour les domaines cbEGF8-TB3, dans le gène de la fibrilline-1. Chez l'humain, les mutations dans cette région du gène de la fibrilline-1 sont associées à la forme néonatale du syndrome de Marfan. L'allèle mutant est exprimé à hauteur de seulement 10 % par rapport à l'allèle sauvage chez les souris *Fbn-1*^{*mg* Δ /*mg* Δ} (Pereira *et al.*, 1997). On note chez ces souris la présence de fragmentations focales des fibres élastiques et une accumulation de matrice amorphe. Des microfibrilles sont cependant formées malgré la présence de fibrilline mutante. Si les souris hétérozygotes (*Fbn-1*^{*mg* Δ /+}) sont viables et fertiles avec peu de différences perceptibles par rapport aux souris sauvages jusqu'à l'âge adulte, les homozygotes (*Fbn-1*^{*mg* Δ /*mg* Δ}) meurent 2 à 3 semaines après la naissance en moyenne, des suites de dissections anévrismales de l'aorte ascendante. L'incapacité des microfibrilles à soutenir le stress hémodynamique dans l'adventice semble être la cause de la dilatation aortique.

Un autre modèle de souris mutée pour la fibrilline-1 a été accidentellement créé par insertion de la cassette NeoR dans l'intron 18 sans réarrangement de la séquence génique codante (souris *mgR*). L'allèle mutant est exprimé à hauteur de 15–20 % par rapport

à l'allèle sauvage (Pereira *et al.*, 1999). Les souris hétérozygotes (*Fbn-1*^{*mgR*/+}) sont viables et ne présentent pas d'anomalies majeures durant leur vie. Les souris homozygotes (*Fbn-1*^{*mgR*/*mgR*}) meurent au bout de 3 à 6 mois après la naissance d'insuffisance pulmonaire et vasculaire. Les souris homozygotes présentent des anomalies squelettiques (cyphose, excroissance des côtes). Au niveau vasculaire, ces souris développent une calcification médiale des fibres élastiques à partir de 6 semaines, une hyperplasie intimale typiquement détectable à partir de 9 semaines, et plus tard une inflammation adventitielle. Les zones où surviennent ces événements sont spatialement proches. Une étude biomécanique sur l'aorte de ces souris montre une augmentation de la rigidité vasculaire (Marque *et al.*, 2001). Ces souris montrent aussi, au niveau de l'aorte, des ruptures fréquentes de leurs lames élastiques, qui en devenant plus lisses, perdent leur connexion avec les cellules musculaires lisses (Bunton *et al.*, 2001). Dans l'aorte, les microfibrilles lient les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses adjacentes aux fibres élastiques à travers des structures appelées « filaments de connexion » (Davis *et al.*, 1993, 1994). La perte de ces connexions survient dans l'aorte des souris *Fbn-1*^{*mgR*/*mgR*} (Bunton *et al.*, 2001).

L'étude des deux modèles de souris *mg* Δ et *mgR* a montré que des fibres élastiques morphologiquement normales sont présentes (entre les lésions focales et dans les tissus normaux) malgré la mutation de la fibrilline-1. Il en avait été conclu que la fibrilline-1 joue un rôle plutôt dans l'homéostasie tissulaire que dans le développement des fibres élastiques et des tissus. Le fait que l'expression du gène de la fibrilline-2 précède celle de la fibrilline-1 et ait lieu pendant le développement a soulevé l'hypothèse selon laquelle la fibrilline-2 jouerait un rôle prépondérant dans l'assemblage des fibres élastiques. Cette hypothèse a été démentie par le fait que la déficience en fibrilline-2 n'a pas montré d'effet apparent sur l'élastogénèse (Chaudhry *et al.*, 2001).

Un troisième modèle de souris a été créé pour permettre de trancher entre les deux hypothèses de pathogénèse du syndrome de Marfan, à savoir le modèle dominant négatif et le modèle de l'haplo-insuffisance. Ce modèle de souris porte une mutation ponctuelle qui substitue la cystéine 1039 dans le domaine cbEGF11 par une glycine (mutation C1039G) (Judge *et al.*, 2004). La mutation correspondante (C1039Y) chez l'Homme aboutit à la forme classique du syndrome de Marfan (Schrijver *et al.*, 1999). Le niveau d'expression de l'allèle portant la mutation C1039G reste inchangé par rapport à celui de l'allèle sauvage. Les souris hétérozygotes (*Fbn-1*^{C1039G/+}) montrent une difformité squelettique, des zones focales d'épaississement de la

media avec désorganisation et fragmentation des lames élastiques ainsi que de fréquents dépôts de protéoglycans dans l'aorte. Il a également été mis en évidence, *in vitro*, sur des fibroblastes murins, une altération de la formation des microfibrilles. Les souris *Fbn-1^{C1039G/+}* présentent, comme les souris *Fbn-1^{mgΔ/mgΔ}*, une augmentation de la signalisation par le TGF- β qui peut être prévenue par des anticorps le neutralisant ou par le losartan, un bloqueur du récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT1) (Habashi *et al.*, 2006). Alors que les souris non traitées sont affectées par une dilatation de la racine aortique, un épaississement de la paroi aortique, et une augmentation de la signalisation du TGF- β , les souris traitées conservent l'intégrité de leur paroi aortique avec des caractéristiques semblables à celles des souris sauvages. Le traitement par le losartan prévient également le défaut de septation alvéolaire (Habashi *et al.*, 2006). Le rôle central de la signalisation par le TGF- β dans la pathogenèse du syndrome de Marfan a remis en question le modèle selon lequel cette pathologie serait uniquement due à la faiblesse structurale des tissus, qui résulte d'une déficience en microfibrilles. Les souris hétérozygotes *Fbn-1^{C1039G/+}* présentent une contractilité altérée et une synthèse accrue de MMP-2 et 9 au niveau de l'aorte thoracique (Chung *et al.*, 2007a) et, au niveau de l'aorte thoracique, une altération de la relaxation dépendante de l'endothélium (Chung *et al.*, 2007b).

Pour comprendre le rôle de la fibrilline-1 indépendamment des mutations observées dans le syndrome de Marfan, un dernier modèle de souris complètement déficient en fibrilline-1 (*Fbn-1^{-/-} = Fbn-1^{mgN/mgN}*) a été généré par interruption de l'exon 1 du gène par une cassette NeoR (Carta *et al.*, 2006). Contrairement aux précédentes mutations, celle-ci abolit toute expression de l'allèle mutant. Alors que les souris hétérozygotes (*Fbn-1^{mgN/+}*) sont viables et fertiles, les souris homozygotes (*Fbn-1^{mgN/mgN}*) meurent dans les deux premières semaines après la naissance de rupture d'anévrisme, de dysfonctionnement pulmonaire et/ou de collapsus du diaphragme (Carta *et al.*, 2006). Les souris homozygotes présentent une malformation et une excroissance des côtes. C'est un phénotype inédit par rapport aux autres modèles de souris mutées pour la fibrilline-1 et le syndrome de Marfan, en ce sens que l'anévrisme touche toute l'aorte ascendante au lieu de la seule racine aortique et que la désorganisation des unités lamellaires de la *media* s'étend sur toute la longueur de l'aorte ascendante. Les lames élastiques sont plus fines et désorganisées et la maturation de la paroi de l'aorte ascendante est altérée chez ces souris.

Tous ces résultats suggèrent que la fibrilline-1 joue un rôle important dans le développement et la matu-

ration des fibres élastiques et de la paroi aortique pendant le développement fœtal et surtout pendant la croissance postnatale.

Récemment, nos travaux ont aussi permis d'étudier les conséquences d'une altération du gène de la fibrilline-1 (souris *Fbn-1^{mgΔ/+}*) sur le processus de vieillissement. Nos résultats et ceux d'autres équipes montrent que la déficience quantitative de la fibrilline-1 entraîne une altération précoce des fibres élastiques qui sont plus fragmentées dès l'âge adulte, alors que ce phénomène est généralement associé au vieillissement artériel (Mariko *et al.*, 2011). La déficience en fibrilline-1 rend les fibres élastiques plus fragiles et la fréquence de fragmentations, déjà importante dans l'aorte de souris *Fbn-1^{mgΔ/+}* adultes, le devient encore plus chez les souris âgées du même génotype lorsqu'elles sont comparées aux souris sauvages, avec l'apparition d'anévrismes aortiques à une fréquence anormale qui augmente avec l'âge. La conséquence de la fragmentation des lames élastiques est l'accroissement du diamètre artériel qui survient au cours du vieillissement (Camilleri, 1992 ; Greenwald, 2007). En effet, on note une dilatation de l'aorte ascendante apparaissant avec l'âge, comme chez les souris sauvages. Chez les souris *Fbn-1^{mgΔ/+}* adultes, le diamètre artériel est de même calibre que celui des souris sauvages âgées et il s'accroît encore plus avec l'âge. Au cours du vieillissement normal, la dilatation aortique est compensée par un épaississement de la paroi pour limiter le stress. Cette compensation de la dilatation par une augmentation de l'épaisseur de la paroi aortique est observée chez les souris sauvages âgées mais aussi chez les souris *Fbn-1^{mgΔ/+}* adultes. Elle est curieusement absente dans la paroi de l'aorte ascendante de souris âgées *Fbn-1^{mgΔ/+}*. Enfin, il a été montré que les souris *Fbn-1^{mgΔ/+}* sont hypotendues et que la réponse vasomotrice de l'aorte ascendante à la phényléphrine est altérée chez ces souris au cours du vieillissement. Cette réponse est même presque absente dans les cas où le vaisseau est anévrisimal (Mariko *et al.*, 2011).

Conclusion et perspectives

Comprendre la signalisation par la fibrilline-1 et l'élastine, ainsi que les conséquences de leur déficit quantitatif sur le système vasculaire à différents stades de la vie, permet de mieux décrire le rôle de ces protéines dans la physiologie vasculaire et d'aider à décrypter la pathogenèse du syndrome de Marfan, de la SVAS et du SWB. Nos travaux ont permis de valider, sur les plans structural et fonctionnel, les souris *Fbn-1^{mgΔ/+}* comme un bon modèle du syndrome de Marfan et

pourraient aider à concevoir de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées contre cette pathologie.

Les différents modèles murins portant des mutations variées dans le gène de la fibrilline-1 et mimant certaines caractéristiques du syndrome de Marfan ont montré que la fibrilline-1 contribue à la morphogénèse vasculaire. Notre étude chez les souris *Fbn-1^{mgΔ/+}* confirme ce fait et montre qu'une baisse de la quantité de fibrilline-1 conduit à l'altération du développement et du vieillissement du système cardiovasculaire. Cette altération a lieu tant sur le plan structural que fonctionnel. L'absence d'une quantité suffisante de fibrilline-1 se répercute sur la formation des lames élastiques, qui semblent fragilisées et se fragmentent très tôt dans la vie post-natale. La fibrilline-1 interagit avec les cellules vasculaires et induit une signalisation dans les cellules endothéliales *via* les récepteurs intégrines. Elle régule les fonctions comme la prolifération et la migration des cellules endothéliales, deux phénomènes importants dans la morphogénèse vasculaire. Ceci suggère que la fibrilline-1 pourrait avoir un rôle important dans ce phénomène. La perte de cette signalisation induite par la fibrilline-1 dans les cellules vasculaires pourrait être une explication de l'altération du développement aortique observée en cas de déficit quantitatif de la fibrilline-1. Ce déficit a des répercussions sur le système vasculaire qui ressemblent à celles observées chez les souris âgées sauvages.

D'autre part, le déficit en élastine modifie également le fonctionnement à l'âge adulte et le vieillissement du système vasculaire. Les souris *Eln^{+/-}* adultes présentent des signes de vieillissement prématuré, tels qu'une rigidité artérielle semblable à celle d'artères de souris sauvages âgées, ainsi qu'une dégradation des fibres élastiques, pouvant être liée aux effets secondaires résultant d'une charge mécanique accrue et chronique. Malgré cela, curieusement, leur durée de vie est quasiment identique à celle des souris *Eln^{+/+}*. *A contrario*, les souris *Eln^{+/-}* âgées ne montrent pas certaines altérations caractéristiques du vieillissement (épaississement de la paroi des artères élastiques et altération de la fonction vasoconstrictrice de l'aorte ascendante), bien que la fonction endothéliale soit fortement altérée, ce qui est un facteur de risque important dans la genèse de diverses pathologies cardiovasculaires.

Comme pour la fibrilline-1, la quantité d'élastine est déterminante dans la morphogénèse artérielle. La déficience en fibrilline-1 a, chez la souris, des répercussions opposées à celles de l'haplo-insuffisance en élastine, à savoir respectivement la dilatation contre la sténose, et l'hypotension contre l'hypertension. Des études récentes ont montré que la double mutation *Eln^{+/-}; Fbn-1^{+/-}* chez la souris conduit dans certains

cas à des effets additifs des deux mutations, mais dans d'autres à des compensations partielles d'une mutation par l'autre, comme par exemple concernant les conséquences sur le diamètre aortique (Carta *et al.*, 2009). Ces deux composants majeurs, bien qu'appartenant tous les deux aux mêmes fibres élastiques, pourraient donc avoir au moins en partie des rôles opposés dans la morphogénèse vasculaire. De même, il semble que c'est au cours du développement et notamment au moment de l'élastogénèse, que se joue une grande partie du devenir à terme du système cardiovasculaire. Les conditions initiales influent fortement sur la fonction cardiovasculaire de l'âge adulte et la prédisposition à développer ou non des pathologies vasculaires, ce qui ouvre également des possibilités en terme de prévention. Par exemple, l'une des principales causes du syndrome de Marfan étant la déficience quantitative en fibrilline-1, l'induction de l'expression de cette dernière très tôt après la naissance pourrait être considérée comme une stratégie thérapeutique prometteuse. L'expression de la fibrilline-1 humaine chez les souris *Fbn-1^(C1039G/+)*, modèles du syndrome de Marfan, restaure les paramètres histologiques (absence de fragmentation de lames élastiques et de dépôt de protéoglycane) et morphométriques de la paroi aortique chez ces souris (Judge *et al.*, 2004). De nouvelles pistes thérapeutiques vont donc sans doute s'ouvrir dans l'avenir.

Enfin, le vieillissement altéré du système vasculaire des souris *Fbn-1^{+/-mgΔ}* et *Eln^{+/-}* est un atout majeur pour la compréhension des mécanismes régissant le vieillissement artériel. L'ensemble des résultats obtenus témoigne du fait que, à encore plus long terme, des déterminants du vieillissement et des altérations de la fonction cardiovasculaire associées (hypertension artérielle, remodelage vasculaire adaptatif et pathologique) pourraient se trouver dans les étapes précoces du développement vasculaire et en particulier l'élastogénèse. L'étude du vieillissement de ces souris a suggéré qu'il pourrait y avoir non pas *un* processus de vieillissement, mais *des* processus alternatifs, en fonction des conditions initiales.

Références

- Ades L.C., Holman K.J., Brett M.S., Edwards M.J., Bennetts B., *Ectopia lentis* phenotypes and the FBN1 gene. *Am J Med Genet A*, 2004, 126, 284-289.
- Albig A.R., Schiemann W.P., Fibulin-5 antagonizes vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling and angiogenic sprouting by endothelial cells. *DNA Cell Biol*, 2004, 23, 367-379.

- Aoyama T., Francke U., Dietz H.C., Furthmayr H., Quantitative differences in biosynthesis and extracellular deposition of fibrillin in cultured fibroblasts distinguish five groups of Marfan syndrome patients and suggest distinct pathogenetic mechanisms. *J Clin Invest*, 1994, 94, 130-137.
- Arteaga-Solis E., Gayraud B., Lee S.Y., Shum L., Sakai L., Ramirez F., Regulation of limb patterning by extracellular microfibrils. *J Cell Biol*, 2001, 154, 275-281.
- Bax D.V., Bernard S.E., Lomas A., Morgan A., Humphries J., Shuttleworth C.A., Humphries M.J., Kielty C.M., Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Biol Chem*, 2003, 278, 34605-34616.
- Bax D.V., Mahalingam Y., Cain S., Melody K., Freeman L., Younger K., Shuttleworth C.A., Humphries M.J., Couchman J.R., Kielty C.M., Cell adhesion to fibrillin-1: identification of an Arg-Gly-Asp-dependent synergy region and a heparin-binding site that regulates focal adhesion formation. *J Cell Sci*, 2007, 120, 1383-1392.
- Bax D.V., Rodgers U.R., Bilek M.M., Weiss A.S., Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRRK motif and integrin alphaVbeta3. *J Biol Chem*, 2009, 284, 28616-28623.
- Beuren A.J., Apitz J., Harmjan D., Supravalvular aortic stenosis in association with mental retardation and a certain facial appearance. *Circulation*, 1962, 26, 1235-1240.
- Blood C.H., Sasse J., Brodt P., Zetter B.R., Identification of a tumor cell receptor for VGVAPG, an elastin-derived chemotactic peptide. *J Cell Biol*, 1988, 107, 1987-1993.
- Bonnet D., Cormier V., Villain E., Bonhoeffer P., Kachaner J., Progressive left main coronary artery obstruction leading to myocardial infarction in a child with Williams syndrome. *Eur J Pediatr*, 1997, 156, 751-753.
- Booms P., Pregla R., Ney A., Barthel F., Reinhardt D.P., Pletschacher A., Mundlos S., Robinson P.N., RGD-containing fibrillin-1 fragments upregulate matrix metalloproteinase expression in cell culture: a potential factor in the pathogenesis of the Marfan syndrome. *Hum Genet*, 2005, 116, 51-61.
- Booms P., Ney A., Barthel F., Moroy G., Counsell D., Gille C., Guo G., Pregla R., Mundlos S., Alix A.J., Robinson P.N., A fibrillin-1-fragment containing the elastin-binding-protein GxxPG consensus sequence upregulates matrix metalloproteinase-1: biochemical and computational analysis. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 40, 234-246.
- Bunton T.E., Biery N.J., Myers L., Gayraud B., Ramirez F., Dietz H.C., Phenotypic alteration of vascular smooth muscle cells precedes elastolysis in a mouse model of Marfan syndrome. *Circ Res*, 2001, 88, 37-43.
- Camilleri J.P., Structural approach of vascular aging. *Presse Med*, 1992, 21, 1184-1187.
- Carta L., Pereira L., Arteaga-Solis E., Lee-Arteaga S.Y., Lenart B., Starcher B., Merkel C.A., Sukoyan M., Kerkis A., Hazeki N., Keene D.R., Sakai L.Y., Ramirez F., Fibrillins 1 and 2 perform partially overlapping functions during aortic development. *J Biol Chem*, 2006, 281, 8016-8023.
- Carta L., Wagenseil J.E., Knutsen R.H., Mariko B., Faury G., Davis E.C., Starcher B., Mecham R.P., Ramirez F., Discrete contributions of elastic fiber components to arterial development and mechanical compliance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29, 2083-2089.
- Chaudhry S.S., Gazzard J., Baldock C., Dixon J., Rock M.J., Skinner G.C., Steel K.P., Kielty C.M., Dixon M.J., Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice. *Hum Mol Genet*, 2001, 10, 835-843.
- Chaudhry S.S., Cain S.A., Morgan A., Dallas S.L., Shuttleworth C.A., Kielty C.M., Fibrillin-1 regulates the bioavailability of TGFbeta1. *J Cell Biol*, 2007, 176, 355-367.
- Cherniske E.M., Carpenter T.O., Klaiman C., Young E., Bregman J., Inogna K., Schultz R.T., Pober B.R., Multisystem study of 20 older adults with Williams syndrome. *Am J Med Genet A*, 2004, 131, 255-264.
- Chung A.W., Au Yeung K., Sandor G.G., Judge D.P., Dietz H.C., Van Breemen C., Loss of elastic fiber integrity and reduction of vascular smooth muscle contraction resulting from the upregulated activities of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the thoracic aortic aneurysm in Marfan syndrome. *Circ Res*, 2007a, 101, 512-522.
- Chung A.W., Au Yeung K., Cortes S.F., Sandor G.G., Judge D.P., Dietz H.C., Van Breemen C., Endothelial dysfunction and compromised eNOS/Akt signaling in the thoracic aorta during the progression of Marfan syndrome. *Br J Pharmacol*, 2007b, 150, 1075-1083.
- Corson G.M., Charbonneau N.L., Keene D.R., Sakai L.Y., Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics*, 2004, 83, 461-472.
- Curran M.E., Atkinson D.L., Ewart A.K., Morris C.A., Leppert M.F., Keating M.T., The elastin gene is disrupted by a translocation associated with supravalvular aortic stenosis. *Cell*, 1993, 73, 159-168.
- D'Cruz I.A., Miller R.A., Norman Chevers. A description of congenital absence of pulmonary valves and supravalvular aortic stenosis in the 1840's. *Br Heart J*, 1964, 26, 723-725.
- Davies Cde L., Melder R.J., Munn L.L., Mouta-Carreira C., Jain R.K., and Boucher Y., Decorin inhibits endothelial migration and tube-like structure formation: role of thrombospondin-1. *Microvasc Res*, 2001, 62, 26-42.
- Davis E.C., Smooth muscle cell to elastic lamina connections in developing mouse aorta. Role in aortic medial organization. *Lab Invest*, 1993, 68, 89-99.

- Davis E.C., Immunolocalization of microfibril and microfibril-associated proteins in the subendothelial matrix of the developing mouse aorta. *J Cell Sci*, 1994, 107, 727–736.
- Davison I.G., Wright G.M., DeMont M.E., The structure and physical properties of invertebrate and primitive vertebrate arteries. *J Exp Biol*, 1995, 198, 2185–2196.
- Dietz H.C., Cutting G.R., Pyeritz R.E., Maslen C.L., Sakai L.Y., Corson G.M., Puffenberger E.G., Hamosh A., Nanthakumar E.J., Curristin S.M., Stetten G., Meyers D.A., Francomano C.A., Marfan syndrome caused by a recurrent *de novo* missense mutation in the fibrillin gene. *Nature*, 1991, 352, 337–339.
- Dietz H.C., McIntosh I., Sakai L.Y., Corson G.M., Chalberg S.C., Pyeritz R.E., Francomano C.A., Four novel FBN1 mutations: significance for mutant transcript level and EGF-like domain calcium binding in the pathogenesis of Marfan syndrome. *Genomics*, 1993, 17, 468–475.
- Dietz H.C., Loeys B., Carta L., Ramirez F., Recent progress towards a molecular understanding of Marfan syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2005, 139C, 4–9.
- Duba H.C., Doll A., Neyer M., Erdel M., Mann C., Hammerer I., Utermann G., Grzeschik K.H., The elastin gene is disrupted in a family with a balanced translocation t(7;16)(q11.23;q13) associated with a variable expression of the Williams-Beuren syndrome. *Eur J Hum Genet*, 2002, 10, 351–361.
- Duca L., Floquet N., Alix A.J., Haye B., Debelle L., Elastin as a matrikine. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, 49, 235–244.
- Duca L., Lambert E., Debret R., Rothhut B., Blanchevoye C., Delacoux F., Hornebeck W., Martiny L., Debelle L., Elastin peptides activate extracellular signal-regulated kinase 1/2 *via* a Ras-independent mechanism requiring both p110gamma/Raf-1 and protein kinase A/B-Raf signaling in human skin fibroblasts. *Mol Pharmacol*, 2005, 67, 1315–1324.
- Duca L., Blanchevoye C., Cantarelli B., Ghoneim C., Dedieu S., Delacoux F., Hornebeck W., Hinek A., Martiny L., Debelle L., The elastin receptor complex transduces signals through the catalytic activity of its Neu-1 subunit. *J Biol Chem*, 2007, 282, 12484–12491.
- Eldadah Z.A., Brenn T., Furthmayr H., Dietz H.C., Expression of a mutant human fibrillin allele upon a normal human or murine genetic background recapitulates a Marfan cellular phenotype. *J Clin Invest*, 1995, 95, 874–880.
- Eronen M., Peippo M., Hiippala A., Raatikka M., Arvio M., Johansson R., Kahkonen M., Cardiovascular manifestations in 75 patients with Williams syndrome. *J Med Genet*, 2002, 39, 554–558.
- Ewart A.K., Morris C.A., Ensing G.J., Loker J., Moore C., Leppert M., Keating M., A human vascular disorder, supravalvular aortic stenosis, maps to chromosome 7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993a, 90, 3226–3230.
- Ewart A.K., Morris C.A., Atkinson D., Jin W., Sternes K., Spallone P., Stock A.D., Leppert M., Keating M.T., Hemizygoty at the elastin locus in a developmental disorder, Williams syndrome. *Nat Genet*, 1993b, 5, 11–16.
- Ewart A.K., Jin W., Atkinson D., Morris C.A., Keating M.T., Supravalvular aortic stenosis associated with a deletion disrupting the elastin gene. *J Clin Invest*, 1994, 93, 1071–1077.
- Fahem A., Robinet A., Cauchard J.H., Duca L., Soula-Rothhut M., Rothhut B., Soria C., Guenounou M., Hornebeck W., Bellon G., Elastokine-mediated up-regulation of MT1-MMP is triggered by nitric oxide in endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40, 1581–1596.
- Faury G., Role of the elastin-laminin receptor in the cardiovascular system. *Pathol Biol*, 1998, 46, 517–526.
- Faury G., Role of elastin in the development of vascular function. Knock-out study of the elastin gene in mice. *J Soc Biol*, 2001a, 195, 151–156.
- Faury G., Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathol Biol (Paris)*, 2001b, 49, 310–325.
- Faury G., Ristori M.T., Verdetti J., Jacob M.P., Robert L., Role of the elastin-laminin receptor in the vasoregulation. *C R Acad Sci III*, 1994, 317, 807–811.
- Faury G., Ristori M.T., Verdetti J., Jacob M.P., Robert L., Effect of elastin peptides on vascular tone. *J Vasc Res*, 1995, 32, 112–119.
- Faury G., Chabaud A., Ristori M.T., Robert L., Verdetti J., Effect of age on the vasodilatory action of elastin peptides. *Mech Ageing Dev*, 1997, 95, 31–42.
- Faury G., Usson Y., Robert-Nicoud M., Robert L., Verdetti J., Nuclear and cytoplasmic free calcium level changes induced by elastin peptides in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998a, 95, 2967–2972.
- Faury G., Garnier S., Weiss A.S., Wallach J., Fulop T. Jr., Jacob M.P., Mecham R.P., Robert L., Verdetti J., Action of tropoelastin and synthetic elastin sequences on vascular tone and on free Ca²⁺ level in human vascular endothelial cells. *Circ Res*, 1998b, 82, 328–336.
- Faury G., Maher G.M., Li D.Y., Keating M.T., Mecham R.P., Boyle W.A., Relation between outer and luminal diameter in cannulated arteries. *Am J Physiol*, 1999, 277, 1745–1753.
- Faury G., Pezet M., Knutsen R.H., Boyle W.A., Heximer S.P., McLean S.E., Minkes R.K., Blumer K.J., Kovacs A., Kelly D.P., Li D.Y., Starcher B., Mecham R.P., Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J Clin Invest*, 2003, 112, 1419–1428.
- Fazio M.J., Mattei M.G., Passage E., Chu M.L., Black D., Solomon E., Davidson J.M., Uitto J., Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet*, 1991, 48, 696–703.

- Francke U., Williams-Beuren syndrome: genes and mechanisms. *Hum Mol Genet*, 1999, 8, 1947-1954.
- Fulop T. Jr., Jacob M.P., Khalil A., Wallach J., Robert L., Biological effects of elastin peptides. *Pathol Biol (Paris)*, 1998, 46, 497-506.
- Fulop T., Jacob M.P., Wallach J., Hauck M., Seres I., Varga Z., Robert L., The elastin-laminin receptor. *J Soc Biol*, 2001, 195, 157-164.
- Gibbons C.A., Shadwick R.E., Functional similarities in the mechanical design of the aorta in lower vertebrates and mammals. *Eperientia*, 1989, 45, 1083-1088.
- Gibson M.A., Leavesley D.I., Ashman L.K., Microfibril-associated glycoprotein-2 specifically interacts with a range of bovine and human cell types via alphaVbeta3 integrin. *J Biol Chem*, 1999, 274, 13060-13065.
- Greenwald S.E., Ageing of the conduit arteries. *J Pathol*, 2007, 211, 157-172.
- Gregory K.E., Ono R.N., Charbonneau N.L., Kuo C.L., Keene D.R., Bachinger H.P., Sakai L.Y., The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem*, 2005, 280, 27970-27980.
- Gualandris A., Annes J.P., Arese M., Noguera I., Jurukovski V., Rifkin D.B., The latent transforming growth factor-beta-binding protein-1 promotes *in vitro* differentiation of embryonic stem cells into endothelium. *Mol Biol Cell*, 2000, 11, 4295-4308.
- Guo G., Booms P., Halushka M., Dietz H.C., Ney A., Stricker S., Hecht J., Mundlos S., Robinson P.N., Induction of macrophage chemotaxis by aortic extracts of the mgR Marfan mouse model and a GxxPG-containing fibrillin-1 fragment. *Circulation*, 2006, 114, 1855-1862.
- Habashi J.P., Judge D.P., Holm T.M., Cohn R.D., Loeys B.L., Cooper T.K., Myers L., Klein E.C., Liu G., Calvi C., Podowski M., Neptune E.R., Halushka M.K., Bedja D., Gabrielson K., Rifkin D.B., Carta L., Ramirez F., Huso D.L., Dietz H.C., Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science*, 2006, 312, 117-121.
- Hinek A., Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein. *Cell Adhes Commun*, 1994a, 2, 185-193.
- Hinek A., Rabinovitch M., 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol*, 1994b, 126, 563-574.
- Hinek A., Smith A.C., Cutiongco E.M., Callahan J.W., Gripp K.W., Weksberg R., Decreased elastin deposition and high proliferation of fibroblasts from Costello syndrome are related to functional deficiency in the 67-kD elastin-binding protein. *Am J Hum Genet*, 2000, 66, 859-872.
- Hornebeck W., Tixier J.M., Robert L., Inducible adhesion of mesenchymal cells to elastic fibers: elastinectin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83, 5517-5520.
- Hubmacher D., Tiedemann K., Reinhardt D.P., Fibrillins: from biogenesis of microfibrils to signaling functions. *Curr Top Dev Biol*, 2006, 75, 93-123.
- Jacob M.P., Fulop T. Jr., Foris G., Robert L., Effect of elastin peptides on ion fluxes in mononuclear cells, fibroblasts, and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84, 995-999.
- Judge D.P., Biery N.J., Keene D.R., Geubtner J., Myers L., Huso D.L., Sakai L.Y., Dietz H.C., Evidence for a critical contribution of haploinsufficiency in the complex pathogenesis of Marfan syndrome. *J Clin Invest*, 2004, 114, 172-181.
- Kanzaki T., Otabe M., Latent transforming growth factor-beta binding protein-1, a component of latent transforming growth factor-beta complex, accelerates the migration of aortic smooth muscle cells in diabetic rats through integrin-beta3. *Diabetes*, 2003, 52, 824-828.
- Karnik S.K., Brooke B.S., Bayes-Genis A., Sorensen L., Wythe J.D., Schwartz R.S., Keating M.T., Li D.Y., A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development*, 2003, 130, 411-423.
- Kenagy R.D., Plaas A.H., Wight T.N., Versican degradation and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 2006, 16, 209-215.
- Kielty C.M., Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med*, 2006, 8, 1-23.
- Kielty C.M., Shuttleworth C.A., Fibrillin-containing microfibrils: structure and function in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 1995, 27, 747-760.
- Kielty C.M., Sherratt M.J., Shuttleworth C.A., Elastic fibres. *J Cell Sci*, 2002a, 115, 2817-2828.
- Kielty C.M., Baldock C., Lee D., Rock M.J., Ashworth J.L., Shuttleworth C.A., Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2002b, 357, 207-217.
- Koch A.E., Haines G.K., Rizzo R.J., Radosevich J.A., Pope R.M., Robinson P.G., Pearce W.H., Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol*, 1990, 137, 1199-1213.
- Kuivaniemi H., Platsoucas C.D., Tilson M.D. 3rd., Aortic aneurysms: an immune disease with a strong genetic component. *Circulation*, 2008, 117, 242-252.
- Lee B., Godfrey M., Vitale E., Hori H., Mattei MG., Sarfarazi M., Tsiouras P., Ramirez F., Hollister D.W., Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature*, 1991, 352, 330-334.
- Li D.Y., Brooke B., Davis E.C., Mecham R.P., Sorensen L.K., Boak B.B., Eichwald E., Keating M.T., Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature*, 1998a, 393, 276-280.

- Li D.Y., Faury G., Taylor D.G., Davis E.C., Boyle W.A., Mecham R.P., Stenzel P., Boak B., Keating M.T., Novel arterial pathology in mice and humans hemizygous for elastin. *J Clin Invest*, 1998b, 102, 1783–1787.
- Lillie M.A., David G.J., Gosline J.M., Mechanical role of elastin-associated microfibrils in pig aortic elastic tissue. *Connect Tissue Res*, 1998, 37, 121–141.
- Long M.M., King V.J., Prasad K.U., Freeman B.A., Urry D.W., Elastin repeat peptides as chemoattractants for bovine aortic endothelial cells. *J Cell Physiol*, 1989, 140, 512–518.
- Mariko B., Ghandour Z., Raveaud S., Quentin M., Usson Y., Verdetti J., Huber P., Kielty C., Faury G., Microfibrils and fibrillin-1 induce integrin-mediated signaling, proliferation and migration in human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299, C977–C987.
- Mariko B., Pezet M., Escoubet B., Bouillot S., Andrieu J.P., Starcher B., Quaglino D., Jacob M.P., Huber P., Ramirez F., Faury G., Fibrillin-1 genetic deficiency leads to pathological aging of arteries in mice. *J Pathol*, 2011, 224, 33–44.
- Marque V., Kieffer P., Gayraud B., Lartaud-Idjouadiene I., Ramirez F., Atkinson J., Aortic wall mechanics and composition in a transgenic mouse model of Marfan syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21, 1184–1189.
- McConnell C.J., DeMont M.E., Wright G.M., Microfibrils provide non-linear elastic behaviour in the abdominal artery of the lobster *Homarus americanus*. *J Physiol*, 1997, 499, 513–526.
- Mecham R.P., Hinek A., Entwistle R., Wrenn D.S., Griffin G.L., Senior R.M., Elastin binds to a multifunctional 67-kilodalton peripheral membrane protein. *Biochemistry*, 1989, 28, 3716–3722.
- Nakamura T., Lozano P.R., Ikeda Y., Iwanaga Y., Hinek A., Minamisawa S., Cheng C.F., Kobuke K., Dalton N., Takada Y., Tashiro K., Ross Jr. J., Honjo T., Chien K.R., Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis *in vivo*. *Nature*, 2002, 415, 171–175.
- Nakanishi T., Iwasaki Y., Momma K., Imai Y., Supravalvular aortic stenosis, pulmonary artery stenosis, and coronary artery stenosis in twins. *Pediatr Cardiol*, 1996, 17, 125–128.
- Neptune E.R., Frischmeyer P.A., Arking D.E., Myers L., Bunton T.E., Gayraud B., Ramirez F., Sakai L.Y., Dietz H.C., Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet*, 2003, 33, 407–411.
- Olson T.M., Michels V.V., Urban Z., Csiszar K., Christiano A.M., Driscoll D.J., Feldt R.H., Boyd C.D., Thibodeau S.N., A 30 kb deletion within the elastin gene results in familial supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet*, 1995, 4, 1677–1679.
- Ooyama T., Fukuda K., Oda H., Nakamura H., Hikita Y., Substratum-bound elastin peptide inhibits aortic smooth muscle cell migration *in vitro*. *Arteriosclerosis*, 1987, 7, 593–598.
- Pereira L., D'Alessio M., Ramirez F., Lynch J.R., Sykes B., Pangilinan T., Bonadio J., Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum Mol Genet*, 1993, 2, 1762.
- Pereira L., Andrikopoulos K., Tian J., Lee S.Y., Keene D.R., Ono R., Reinhardt D.P., Sakai L.Y., Biery N.J., Bunton T., Dietz H.C., Ramirez F., Targetting of the gene encoding fibrillin-1 recapitulates the vascular aspect of Marfan syndrome. *Nat Genet*, 1997, 17, 218–222.
- Pereira L., Lee S.Y., Gayraud B., Andrikopoulos K., Shapiro S.D., Bunton T., Biery N.J., Dietz H.C., Sakai L.Y., Ramirez F., Pathogenetic sequence for aneurysm revealed in mice underexpressing fibrillin-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96, 3819–3823.
- Pezet M., Jacob M.P., Escoubet B., Gheduzzi D., Tillet E., Perret P., Huber P., Quaglino D., Vranckx R., Li D.Y., Starcher B., Boyle W.A., Mecham R.P., Faury G., Elastin haploinsufficiency induces alternative aging processes in the aorta. *Rejuvenation Res*, 2008, 11, 97–112.
- Pfaff M., Reinhardt D.P., Sakai L.Y., Timpl R., Cell adhesion and integrin binding to recombinant human fibrillin-1. *FEBS Lett*, 1996, 384, 247–250.
- Porst M., Plank C., Bieritz B., Konik E., Fees H., Dotsch J., Hilgers K.F., Reinhardt D.P., Hartner A., Fibrillin-1 regulates mesangial cell attachment, spreading, migration and proliferation. *Kidney Int*, 2006, 69, 450–456.
- Ramirez F., Pereira L., Zhang H., Lee B., The fibrillin-Marfan syndrome connection. *Bioessays*, 1993, 15, 589–594.
- Roach M.R., Burton A.C., The reason for the shape of the distensibility curves of arteries. *Can J Biochem Physiol*, 1957, 35, 681–690.
- Robinet A., Fahem A., Cauchard J.H., Huet E., Vincent L., Lorimier S., Antonicelli F., Soria C., Crepin M., Hornebeck W., Bellon G., Elastin-derived peptides enhance angiogenesis by promoting endothelial cell migration and tubulogenesis through upregulation of MT1-MMP. *J Cell Sci*, 2005, 118, 343–356.
- Robinson P.N., Booms P., The molecular pathogenesis of the Marfan syndrome. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58, 1698–1707.
- Robinson P.N., Godfrey M., The molecular genetics of Marfan syndrome and related microfibrilopathies. *J Med Genet*, 2000, 37, 9–25.
- Robinson P.N., Arteaga-Solis E., Baldock C., Collod-Beroud G., Booms P., De Paepe A., Dietz H.C., Guo G., Handford P.A., Judge D.P., Kielty C.M., Loeys B., Milewicz D.M., Ney A., Ramirez F., Reinhardt D.P., Tiedemann K., Whiteman P., Godfrey M., The molecular genetics of Marfan syndrome and related disorders. *J Med Genet*, 2006, 43, 769–787.
- Rodgers U.R., Weiss A.S., Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie*, 2004, 86, 173–178.

- Rosenbloom J., Abrams W.R., Mecham R., Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *Faseb J*, 1993, 7, 1208–1218.
- Safar M.E., Boudier H.S., Vascular development, pulse pressure, and the mechanisms of hypertension. *Hypertension*, 200, 46, 205–209.
- Sakai L.Y., Keene D.R., Engvall E., Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol*, 1986, 103, 2499–2509.
- Sakamoto H., Brockelmann T., Cheresch D.A., Ramirez F., Rosenbloom J., Mecham R.P., Cell-type specific recognition of RGD- and non-RGD-containing cell binding domains in fibrillin-1. *J Biol Chem*, 1996, 271, 4916–4922.
- Schrijver I., Liu W., Brenn T., Furthmayr H., Francke U., Cysteine substitutions in epidermal growth factor-like domains of fibrillin-1: distinct effects on biochemical and clinical phenotypes. *Am J Hum Genet*, 1999, 65, 1007–1020.
- Sherratt M.J., Wess T.J., Baldock C., Ashworth J., Purslow P.P., Shuttleworth C.A., Kielty C.M., Fibrillin-rich microfibrils of the extracellular matrix: ultrastructure and assembly. *Micron*, 2001, 32, 185–200.
- Sherratt M.J., Baldock C., Haston J.L., Holmes D.F., Jones C.J., Shuttleworth C.A., Wess T.J., Kielty C.M., Fibrillin microfibrils are stiff reinforcing fibres in compliant tissues. *J Mol Biol*, 2003, 332, 183–193.
- Shifren A., Durmowicz A.G., Knutsen R.H., Faury G., Mecham R.P., Elastin insufficiency predisposes to elevated pulmonary circulatory pressures through changes in elastic artery structure. *J Appl Physiol*, 2008, 105, 1610–1619.
- Sood S., Eldadah Z.A., Krause W.L., McIntosh I., Dietz H.C., Mutation in fibrillin-1 and the Marfanoid-craniosynostosis (Shprintzen-Goldberg) syndrome. *Nat Genet*, 1996, 12, 209–211.
- Spofford C.M., Chilian W.M., The elastin-laminin receptor functions as a mechanotransducer in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280, H1354–H1360.
- Stheneur C., Collod-Beroud G., Faivre L., Gouya L., Sultan G., Le Parc J.M., Moura B., Attias D., Muti C., Sznajder M., Claustres M., Junien C., Baumann C., Cormier-Daire V., Rio M., Lyonnet S., Plauchu H., Lacombe D., Chevallier B., Jondeau G., Boileau C., Identification of 23 TGFBR2 and 6 TGFBR1 gene mutations and genotype-phenotype investigations in 457 patients with Marfan syndrome type I and II, Loays-Dietz syndrome and related disorders. *Hum Mutat*, 2008, 29, E284–E295.
- Stupack D.G., Cheresch D.A., Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 2004, 64, 207–238.
- Tedgui A., Lévy B., Biologie de la paroi artérielle. 1997, Masson, Paris.
- Urban Z., Riazi S., Seidl T.L., Katahira J., Smoot L.B., Chitayat D., Boyd C.D., Hinek A., Connection between elastin haploinsufficiency and increased cell proliferation in patients with supravalvular aortic stenosis and Williams-Beuren syndrome. *Am J Hum Genet*, 2002, 71, 30–44.
- Vaideswar P., Shankar V., Deshpande J.R., Sivaraman A., Jain N., Pathology of the diffuse variant of supravalvular aortic stenosis. *Cardiovasc Pathol*, 2001, 10, 33–37.
- Wachi H., Seyama Y., Yamashita S., Suganami H., Uemura Y., Okamoto K., Yamada H., Tajima S., Stimulation of cell proliferation and autoregulation of elastin expression by elastin peptide VPGVG in cultured chick vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 1995, 368, 215–219.
- Wagenseil J.E., Mecham R.P., New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2007, 81, 229–240.
- Wang M.C., Lu Y., Baldock C., Fibrillin Microfibrils: a key role for the interbead region in elasticity. *J Mol Biol*, 2009, 388, 168–179.
- Williams J.C., Barratt-Boyes B.G., Lowe J.B., Supravalvular aortic stenosis. *Circulation*, 1961, 24, 1311–1318.
- Williamson M.R., Shuttleworth A., Canfield A.E., Black R.A., Kielty C.M., The role of endothelial cell attachment to elastic fibre molecules in the enhancement of monolayer formation and retention, and the inhibition of smooth muscle cell recruitment. *Biomaterials*, 2007, 28, 5307–5318.
- Wise S.G., Weiss A.S., Tropoelastin. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41, 494–497.
- Zalzstein E., Moes C.A., Musewe N.N., Freedom R.M., Spectrum of cardiovascular anomalies in Williams-Beuren syndrome. *Pediatr Cardiol*, 1991, 12, 219–223.
- Zhang H., Apfelroth S.D., Hu W., Davis E.C., Sanguinetti C., Bonadio J., Mecham R.P., Ramirez F., Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J Cell Biol*, 1994, 124, 855–863.

Résumé

Les fibres élastiques sont constituées d'élastine et de microfibrilles riches en fibrilline-1, dont les mutations génétiques respectives conduisent à des pathologies cardiovasculaires graves impliquant l'apparition de sténoses (syndrome de Williams-Beuren, WBS) ou d'anévrismes (syndrome de Marfan, MS) aortiques. Nous avons étudié et comparé les effets de l'élastine (kappa-élastine, kE et tropoélastine recombinante, rTE) et des microfibrilles (MF et le fragment PF14 de la fibrilline-1) sur la signalisation dans les cellules vasculaires. Sur les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC), la kE, la rTE et les MF activent le complexe récepteur de l'élastine (ERC) et les intégrines, la production de messagers intracellulaires et, avec une efficacité variable, des canaux calciques de la membrane cellulaire et du réticulum endoplasmique, mobilisant à la fois le calcium extra- et intra-cellulaire. Les microfilaments d'actine ne sont impliqués que dans le cas de la signalisation liée à l'élastine. Toutes les protéines étudiées augmentent aussi la prolifération et l'adhésion des HUVEC, ainsi que la production ou la dégradation –à travers l'activation de métalloprotéases matricielles (MMP)- de plusieurs composés de la matrice extracellulaire. La capacité de migration des HUVEC est augmentée par la kE, rTE et PF14 alors qu'elle est diminuée par les MF. Aussi, chez le rat, ces protéines induisent une synthèse de l'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales, résultant en une vasodilatation aortique. PF14 présente de plus un pouvoir vasocontractant en absence de l'endothélium indiquant qu'il stimule aussi particulièrement les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Pour étudier ces interactions sur modèle cellulaire, un protocole de culture de CMLV d'aorte de souris adultes, âgées, ou déficientes pour les gènes de l'élastine ou de la fibrilline-1, a été mis au point. Les protéines des fibres élastiques produisent dans ces cellules une montée du niveau de calcium intracellulaire dont les caractéristiques varient suivant la protéine, l'âge ou le génotype des animaux. Ces travaux confirment le rôle majeur de l'élastine et de la fibrilline-1 dans la régulation des fonctions des cellules vasculaires. Malgré quelques différences, les fragments d'élastine et de fibrilline-1 stimulent souvent de manière similaire les cellules vasculaires. Ceci suggère que les processus biologiques contraires observés dans les MS et WBS mettent aussi en cause d'autres facteurs, probablement liés à d'autres signalisations, par exemple à la voie du TGF- β ou aux différences de mécanisme et de cinétique du dépôt de l'élastine et de la fibrilline-1 lors de l'assemblage des fibres élastiques.

Abstract

Elastic fibres are composed of elastin and fibrillin-1 rich microfibrils, whose genetic mutations result in severe cardiovascular pathologies characterized by aortic stenosis (Williams syndrome, WS) or aneurysm (Marfan Syndrome, MS), respectively. We studied and compared the effect of elastin (kappa-elastin, kE and recombinant tropoelastin, rTE) and microfibrils (MF and PF14, fibrillin-1 fragment) on vascular cell signaling. In human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), kE, rTE and MF activated the elastin receptor complex (ER) and integrins, the production of intracellular messengers and, with varying efficiencies, membrane and endoplasmic reticulum calcium channels, mobilizing both intra- and extra-cellular calcium. Actin microfilaments were involved only in the case of elastin signaling. All these proteins enhanced the proliferation and adhesion of HUVECs, as well as synthesis or degradation –through matrix metalloproteinase (MMP) activation- of several extracellular matrix components. HUVEC migration was enhanced by kE, rTE and PF14 and diminished by MF. Also, in rats, these proteins induced nitric oxide (NO) synthesis by endothelial cells, resulting in aortic vasodilatation, although PF14 had an additional constrictor effect on endothelium-free aorta, indicating that PF14 also stimulates vascular smooth muscle cells (VSMCs). To study these interactions in a cellular model, we designed a new protocol to culture VSMCs from aorta of adult, aged, and elastin or fibrillin-1 knock-out mice. Elastic fibre proteins induced an increase in VSMC intracellular calcium level, which characteristics varied with the protein, age and genotype of mice. These findings confirm the major role of elastin and fibrillin-1 in the regulation of vascular cell functions. Despite some differences, elastin and fibrillin-1 often stimulated vascular cells similarly. This suggests that the onset of the contradictory features observed in MS and WS also involve additional factors, probably linked to other signaling pathways, for instance the TGF- β pathway or the differences in the mechanism and kinetic of elastin and fibrillin-1 depositions during elastic fiber assembly.