Le rôle des adhésions focales des cellules musculaires lisses vasculaires dans la rigidité artérielle et ses liens avec la coagulation

Alexandre Raoul

▶ **To cite this version:**

Alexandre Raoul. Le rôle des adhésions focales des cellules musculaires lisses vasculaires dans la rigidité artérielle et ses liens avec la coagulation. Cardiologie et système cardiovasculaire. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0294 . tel-03702049

HAL Id: tel-03702049
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03702049

Submitted on 22 Jun 2022

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE | BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact bibliothèque : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr
(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE l'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Science de la Vie et de la Santé »

Par **Alexandre RAOUL**

Sous la direction de Patrick LACOLLEY et Véronique REGNAULT

Le rôle des adhésions focales des cellules musculaires lisses vasculaires dans la rigidité artérielle et ses liens avec la coagulation

Soutenance : Le 17 décembre 2021

Membres du jury :

Directeur(s) dethèse :	**Mr Patrick LACOLLEY**	**DR1, UMR_S1116, Université de Lorraine, NancyDR2, UMR_S1116, Université de Lorraine, Nancy**
	Mme Véronique REGNAULT	
Président de jury :	**Philippe RONDE**	**DR1, UMR_7021, Université de Strasbourg, Illkirch**
Rapporteurs :	**Philippe NGUYEN**	**PU-PH, HERVI EA 3801, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims**
	Nadia JESSEL	**DR1, UMR_1260, Université de Strasbourg, Strasbourg**
Examinateurs :	**Phillipe RONDE**	**DR1, UMR_7021, Université de Strasbourg, Illkirch**

UMR_S 1116 INSERM, Défaillance Cardiovasculaire aigue et Chronique – Faculté de Médecine de Nancy, Université de Lorraine

« Tu peux serrer dans ta main une abeille jusqu'à ce qu'elle étouffe.
Elle n'étouffera pas sans t'avoir piqué.
C'est peu de chose, dis-tu Oui, c'est peu de chose.
Mais si elle ne te piquait pas, il y a longtemps qu'il n'y aurait plus d'abeilles. »

Jean Paulhan

Remerciements

Je tiens à remercier le **Dr. Patrick Lacolley**, qui m'a accueilli dans son laboratoire et a supervisé mon travail durant mes années de thèse. Je le remercie particulièrement pour m'avoir toujours fourni les moyens de faire mes expérimentations, m'avoir conseillé sur mon travail et de m'avoir permis de présenter mes travaux dans de nombreuses destinations.

Je tiens également à remercier le **Dr. Véronique Regnault** qui m'a également fait l'honneur de m'accueillir dans le laboratoire et l'équipe 1. Je la remercie pour sa confiance, sa présence au quotidien pour m'encadrer, ses remarques et son soutien durant ces années.

Je tiens à remercier le **Dr. Philippe Nguyen** pour avoir accepté d'être rapporteur de mes travaux de thèse, qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude.

Je tiens à remercier le **Dr. Nadia Jessel** pour avoir également accepté d'être rapporteur de ce travail, je souhaite lui témoigner ma gratitude.

Je tiens à remercier le **Dr. Phillipe Rondé** pour avoir accepté d'être dans mon jury de thèse et de comité de suivi de thèse. Je le remercie particulièrement pour m'avoir accueilli à de nombreuses reprises dans son laboratoire. Durant ces années, son suivi et ses conseils ont su me guider pour l'achèvement de mon travail.

Je tiens à remercier le **Dr. Jeremy Lagrange** pour sa bonne humeur, son humour et son aide au cours de ma thèse et de sa rédaction. Je le remercie particulièrement de m'avoir aidé lors de mes longs séjours post-opératoires et d'avoir toujours réussi à trouver les mots pour garder ma motivation intacte.

Je tiens à remercier le **Dr. Huguette Louis** pour ses conseils, sa patience, les pauses et les histoires toujours factuelles que nous racontions tous dans le bureau.

Je tiens à remercier le **Dr. Nathalie Mercier** pour ses conseils et sa bienveillance, pour m'avoir impliqué dans différents projets et m'avoir permis par des rencontres scientifiques d'explorer d'autres pistes scientifiques.

Je tiens à remercier le **Dr. Zhor RAMDANE-CHERIF** pour sa bonne humeur, son aide pour résoudre mes problèmes informatiques et ses conseils.

Je tiens à remercier le **Dr. Phillipe Carl** pour son accueil, pour sa pédagogie dans ma formation, l'apprentissage de différentes techniques, sa disponibilité et sa bienveillance mais aussi pour son sens de l'humour.

Je tiens à remercier le **Dr. Sophie Pinel** pour avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse et d'avoir su me prodiguer des conseils et avoir suivi mon travail pendant ces années.

Je tiens à remercier le **Dr. Gregory Francius** pour sa bienveillance et sa patience dans notre collaboration au cours de ces années de thèse.

Je tiens à remercier le **Dr. Zhenlin Li** pour son implication dans mes recherches, sa disponibilité et ses conseils lors de mes travaux.

Je tiens à remercier le **Dr. Dominique Dumas** pour m'avoir formé et suivi sur la plateforme d'imagerie, pour sa bonne humeur et nos discussions.

Je tiens à remercier le **Dr. Simon Thornton** pour sa bonne humeur, ses analyses des matchs de rugby et je lui souhaite une retraite agréable.

Je tiens à remercier le **Dr. Simon Toupance** pour son humour, nos discussions et ses conseils vestimentaires toujours pertinents.

Je tiens à remercier le **Pr. Patrick Menu**, ancien directeur de l'école doctorale et **Hélène Primerano** pour leur soutien, leur bienveillance et leur compréhension lors de mes années de thèse. Je les remercie également pour m'avoir permis de participer au conseil de l'école doctorale.

Je tiens à remercier le **Dr Sophie Rahuel-Clermont**, directrice de l'école doctorale pour sa bienveillance et sa compréhension.

Je tiens à remercier le **Dr Cécile DENIS**, pour son implication dans mes recherches, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de mettre en valeur mon travail.

Je tiens à remercier le **Dr Peter Lenting**, pour ses conseils sur l'imagerie et les publications scientifiques et m'avoir fait confiance.

Je tiens à remercier le **Dr. Camille Rouillon** pour avoir partagé mon bureau lors de mes débuts de thèse et m'avoir accueilli et formé aux techniques du laboratoire et surtout m'avoir supporté.

Je tiens à remercier le **Dr. Manon Durand** pour m'avoir supporté pendant toutes ces années de thèse, m'avoir toujours soutenu avec la bonne humeur qui la caractérise. Je lui souhaite de devenir une vraie Parisienne.

Je tiens à remercier la **future Dr. Célia Schellenberg** pour avoir partagé mon bureau durant cette thèse, m'avoir toujours accompagné dans mes aventures avec patience et bienveillance, pour sa bonne humeur et son humour. Je la remercie particulièrement pour nos repas partagés et les fous rires qui ont rythmé notre cohabitation, nos découvertes et son soutien au cours de ma convalescence. Je lui

souhaite le meilleur pour la suite de son parcours.

Je tiens à remercier le **Dr. Cyril Brzenczek** pour son humour, nos discussions et les restaurants que nous avons partagés durant ces années.

Je tiens à remercier **Céline Fremy** pour nos moments de bonne humeur, son humour et nos fous rires.

Je tiens à remercier **Cécile Lakomy** pour sa bienveillance, son humour et son humanité.

Je tiens à remercier **Audrey Isch** et **Frédérique Deschamps** qui m'ont toujours soutenu durant ces années par leur humour et leur professionnalisme.

Je souhaite bon courage **aux étudiants** du laboratoire pour cette belle aventure qu'est une thèse.

Je tiens à remercier **Marylise, Katia et Valérie** pour avoir pris soin de moi pendant une année de convalescence. Je vous remercie pour votre humanité, votre professionnalisme et votre bonne humeur qui chaque jour me permettait d'aller mieux.

Je tiens à remercier **Antonin, Pierre, Vincent, PXI, Doudou, Bryan, Guillaume, François et Sylvain**, mes collègues sportifs de boxe ou de rugby pour m'avoir soutenu et permis de m'évader.

Je remercie **Vincent, Théo, Christophe, Cyril, Fabien, Brahim, Karim, Marine, Léa, Mélissa, Rafik, Thomas, Steve, Damien, Adil, Arslane, Malek et Emeric** pour nos soirées toujours mouvementées, nos discussions et nos fous rires.

Je remercie mes amis d'enfance qui sont comme une seconde famille : **Loïc, Arnaud, Remi, Mady, Gabi, Laura, Melissa, Anelo et Krystel et Laura**. Ce qu'ils m'ont apporté ne saurait être décrit ou quantifié.

Je remercie ma famille proche : **David, Monica, Raph, Gabriel, Mila, Elvire, José, Martine, Gerard, Hélène, Amandine, Sébastien**, vous m'avez permis au quotidien de trouver les ressources et la motivation pour poursuivre ce travail

A mes **grands-parents,** trouvez en ce travail le témoignage de mon amour sincère. Je garde en moi le souvenir de votre fierté et vous dédie cette thèse.

A mon frère **Maxence et Tiffany** sa femme, je n'ai pas les mots pour vous remercier de votre soutien, de votre bonne humeur, votre joie de vivre. Cette thèse est aussi la

vôtre, recevez à travers ces lignes mon admiration pour ce que vous êtes et tout mon amour.

A **mes parents**, mes plus grands soutiens et membres de mon « fan club » je ne peux trouver les mots pour vous témoigner mon amour et ma reconnaissance. Je vous dois l'accomplissement de ce travail et ce que je suis. Je remercie tendrement ma mère pour sa bienveillance et son amour sans failles qui m'a permis de traverser les épreuves de cette thèse et mon père pour ses conseils et son humeur toujours joyeuse qu'importent les moments.

Je voudrais enfin remercier la **Recherche Hospital-Universitaire et l'INSERM** pour avoir financé ces années de thèse.

Sommaire

I. Contexte général 11

II. Contexte bibliographique 12

1) Principes de la rigidité artérielle 12

2) Vitesse de l'onde de pouls et mesure de la rigidité artérielle 12

3) Facteurs déterminants l'élasticité artérielle 13

4) Composition de la paroi artérielle 15

5) Composants fonctionnels de la rigidité artérielle 18

Les composants de la matrice extracellulaire 18

a) L'élastine 18

b) La fibrilline 19

c) Le collagène 20

6) Structure et fonction des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) 21

a) Les modifications des cellules musculaires lisses vasculaires dans les pathologies artérielles 23

b) Les intégrines dans la modulation de la fonction des CMLVs 27

c) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ 29

d) La régulation de la rigidité artérielle et cellulaire par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ 31

e) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et les adhérences focales 33

f) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la physiopathologie artérielle 36

III. Hypothèses et objectifs 38

IV. Matériel et Méthodes 39

1) Modèles de souris invalidées pour la sous unité α_v des intégrines dans les CMLVs 39

2) Conditions expérimentales..... 40

3) Protocole expérimental de fibrose vasculaire par Angiotensine 40

4) Mesure de la pression artérielle..... 41

5) Mesures hémodynamiques *in vivo*..... 43

a) Préparation..... 43

b) Acquisition des mesures de pression 43

c) Echotracking de l'artère carotide 43

6) Culture cellulaire..... 45

7) Plaques de culture cellulaire à rigidité variable 45

8) Immunofluorescence 47

a) Double marquage..... 47

b) Colocalisation..... 47

9) Imagerie et analyse 48

a. Acquisition..... 48

b. Quantification 49

c. Mesure de colocalisation..... 49

10) Microscopie à force atomique..... 50

11) Suivi de la génération de thrombine par thrombinographie 51

a. Expérimentation 51

b. Paramètres des courbes de génération de thrombine 52

c. Peptide RGT et génération de thrombine 53

12) Imagerie dynamique par transfection 54

a) Transfection 54

b) Acquisition d'image sur cellules vivantes 54

c) Analyse d'images 55

13) Statistiques 55

V. Résultats : 56

1) Rigidité cellulaire, adhérences focales et leurs acteurs 56

a) Rigidité cellulaire en fonction de la rigidité matricielle 56

b) Quantification des protéines des adhérences focales en fonction de la rigidité de la MEC : 58

c. Adaptation du protocole de transfection de FAK-GFP aux CMLVs 62

d. Aires des AFs en fonction de la rigidité de la matrice extracellulaire 65

e. Stabilité des adhérences focales en fonction de rigidité matricielle 66

2) Rôle de la rigidité de la matrice extracellulaire dans la génération de thrombine *via* $\alpha_v\beta_3$ 67

a. Génération de thrombine en fonction de rigidités matricielles variables 67

b. Génération de thrombine avec un inhibiteur de β3 69

3) Le facteur von Willebrand et son action sur la CMLVs médié par l'intégrine αvβ3. 72

4) Paramètres mécaniques et cellulaire dans un modèle *in-vivo* de souris invalidée pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ 127

VI. Discussion..... 151

VII. Conclusion :..... 159

VIII. Références bibliographiques..... 160

Annexes..... 181

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique de la mesure de VOP « carotido-fémorale » chez l'homme 13

Figure 2 : Les paramètres de la rigidité artérielle (Patrick Lacolley et al. 2017). 15

Figure 3 : Hétérogénéité et composition de la paroi artérielle (Patrick Lacolley et al. 2017) 17

Figure 4 : Effets de la MEC sur la signalisation des CMLVs. 19

Figure 5 : Impact de l'étirement sur l'activation des voies de signalisation modulant le comportement des CMLVs 22

Figure 6 : Diagramme phénotypique des CMLVs dans les pathologies cardiovasculaires et expressions protéiques 25

Figure 7 : Relief de CMLVs de singes jeunes et âgés d'après (Zhu et al. 2012). 26

Figure 8 : Activation et signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. 30

Figure 9 : Schéma général de la coagulation. 32

Figure 10 : L'interaction prothrombine/intégrine dans l'hémostase et la signalisation cellulaire 33

Figure 11 : L'adaptation de la mécanotransduction entre la cellule et son environnement. 34

Figure 12 : L'adhérence focales mature, la liaison entre la MEC et le noyau cellulaire 35

Figure 13 : Les acteurs et la dynamique des adhérences focales 36

Figure 14 : Invalidation de la sous unité α_v des intégrines dans les CMLVs chez la souris. 40

Figure 15 : Protocole animal expérimental. 41

Figure 16 : Représentation schématique de la mesure de pression de l'artère caudale dites méthode "tail-cuff" 42

Figure 17 : Schéma des paramètres mesurés et calculés lors de la génération de thrombine 53

Figure 18 : 3 configurations de la chambre de Ludin, d'après Life Imaging Services - Technical data 55

Figure 19 : Rigidité des CMLVs en fonction de gel de rigidité croissante. 57

Figure 20 : Images d'immunofluorescence de CMLVs marquées pour l'α-actine, l'intégrine αvβ3, la taline et la vinculine et leurs quantifications 59

Figure 21 : Images d'immunofluorescence de CMLVs marquées pour FAK totale, FAK phosphorylée, leurs quantifications et leur ratio. 61

Figure 22 : CMLVs transfectées avec de la lipofectamine. 63

Figure 23 : Transfection de FAK-GFP à l'intérieur des CMLVs 64

Figure 24 : Aire des adhérences focales en fonction de la rigidité matricielle. 65

Figure 25 : Images et stabilités des AFs. 66

Figure 26 : Génération de thrombine à la surface des CMLVs en fonction de la rigidité matricielle. 68

Figure 27 : Potentiel endogène de thrombine à la surface des CMLVs en fonction de la rigidité des gels. 69

Figure 28 : Génération de thrombine à la surface des CMLVs incubées avec du RGT en fonction de la rigidité matricielle. 70

Figure 29 : Génération de thrombine en présence d'un inhibiteur de β_3 71

Figure 30 : Le VWF dans la physiopathologie artérielle par les CMLVs et les intégrines $\alpha_v\beta_3$ 127

Liste des tableaux

Tableau 1: Expression et implications des intégrines dans les CMLVs 27

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence 48

Tableau 3 : Aperçu de rigidité cellulaire en fonction de paramètres de l'AFM 153

Abréviations

3-APTMS : 3-aminopropyltrimethoxysilane

AF : Adhérence focale

BSA : Bovine serum albumin (Albumine de sérum bovin)

CD68 : Cluster of différenciation

CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire

COL : Collagène

ERK : Extracellular signal regulated kinase

ETP : Endogenous trombin potential (Potentiel endogène de thrombine)

Facteur IX : FIXa

Facteur V : FVa

Facteur VII : FVIIa

Facteur VIII : FVIIIa

Facteur X : FXa

Facteur XI : FXIa

Facteur XIII : FXIIIa

FAK : Focal adhesion kinase

FAT : Focal adhesion target

FERM : Protéines ezrine/radixine/moesine

FN : Fibronectine

FT : Facteur tissulaire

GFP : Green fluorescent protein

GPa : Giga pascal

Hz : Hertz

KI : Knock-in

KO : Knock-out

Kpa : Kilopascal

LN : Laminine

LRP4 : Low-density lipoprotein receptor-related protein 4

MAP : Mitogen activated proteins

MEC : Matrice extracellulaire

NF-κβ : Nuclear factor κβ

OPN : Ostéopontine

PAD : Pression artérielle diastolique

PAM : Pression artérielle moyenne

PAS : Pression artérielle systolique

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Polymérase chain reaction

P-FAK : Focal adhesion kinase phosphorylée

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PP : Pression pulsée

Prothrombine : FII

RDD : Récepteur à domaine discoidine

ROCK : Rho-associated protein kinase

ROI : Region of interest

SEM : Erreur standard à la moyenne

SHR : Spontaneously hypertensive rat

SM22α : Smooth muscle α

SRF : Serum factor reponse

Sulfo-SANPAH : Sulfosuccinimidyl6(4'-azido-2'-nitrophenyl-amino) hexanoate

Thrombine : FIIa

TIFF : Tagged image file format

TSP : Thrombospondine

Tyr : Tyrosine

VN : Vitronectine

VOP : Vitesse d'onde de pouls

VWF : Facteur von Willebrand

α- SMA : Alpha smooth muscle actin

$\alpha_v{}^{SMKO}$: Souris KO pour la sous-unité des cellules musculaires lisses

I. Contexte général

Selon l'Organisation Mondiale pour la Santé, les pathologies cardiovasculaires seraient responsables de 17,7 millions de morts par an dans le monde, soit plus de 30% des décès. L'évaluation des facteurs de risques des pathologies cardiovasculaires et la compréhension des différents mécanismes physiopathologiques sont des enjeux majeurs de santé.

La compliance des artères permet d'absorber la pulsatilité afin d'obtenir un débit sanguin continu dans les artérioles et les capillaires et de prévenir des dommages sur des organes. Un marqueur prédictif important est la rigidité artérielle qui augmente avec l'âge et certaines pathologies (Zieman *et al.* 2005; Lacolley et al. 2017). La rigidité artérielle comprend la rigidité des différents éléments de la paroi et en particulier des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs) qui sont le type cellulaire principal présent dans la paroi artérielle.

La rigidification des artères peut avoir plusieurs causes comme des modifications des proportions d'élastine et de collagène dans la paroi artérielle ou une augmentation des pressions, mais durant la dernière décennie le rôle des CMLVs est de plus en plus décrit. En effet les interactions des CMLVs avec la matrice extracellulaire (MEC) modifient la signalisation cellulaire et la mécanotransduction *via* des points de contacts d'adhésion focaux qui impliquent différents récepteurs transmembranaires comme les intégrines. (Louis et al. 2007), (Patrick Lacolley et al. 2009) et (Srivatsa et al. 1997).

L'objectif de cette thèse a été d'explorer les fonctions des adhérences focales (AFs) des CMLVs par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et d'évaluer les répercussions cellulaires et moléculaires de l'activation de cette intégrine dans le développement de la rigidité des CMLVs, dans l'hémostase et la physiopathologie artérielle.

II. Contexte bibliographique

1) Principes de la rigidité artérielle

Une fonction majeure des artères de gros calibre est leur compliance, c'est-à-dire leur capacité à amortir les mouvements cardiaques du fait de leur distensibilité. Cette compliance dépend de la géométrie des artères et de la rigidité des différents éléments qui la compose (et de leurs interactions).

L'augmentation de la rigidité artérielle intervient durant le vieillissement, dans la pathogénèse de l'athérosclérose, dans l'insuffisance rénale chronique, mais aussi dans le diabète ou l'hypertension artérielle. Il existe différents indicateurs cliniques de cette rigidité tels que la pression pulsée (PP), les pressions artérielles systolique (PAS) et diastolique (PAD) qui ne représentent que des estimations indirectes. L'étude des données physiopathologiques de la rigidité artérielle justifie d'adopter une stratégie « anti-rigidité » afin de mieux contrôler les risques cardiovasculaires (Safar et al. 2011) (Laurent et al. 2006).

2) Vitesse de l'onde de pouls et mesure de la rigidité artérielle

La rigidité artérielle est mesurée en clinique de manière non-invasive par différentes techniques pour obtenir une valeur de rigidité régionale. En 2006 un consensus a établi les règles de la mesure de la vitesse d'onde de pouls (VOP) (**Figure 1**) (Laurent et al. 2006). Le temps de propagation de l'onde (Δt) est calculé et reporté à la distance mesurée entre les deux sites (Δl). La Société Européenne de Cardiologie prend comme valeur seuil de haut risque 12 m/s pour une VOP carotido-fémorale alors qu'une valeur normale est comprise entre 7 et 8 m/s.

D'autre part, la rigidité locale de certaines artères peut être mesurée en utilisant une méthode à ultrasons. En clinique elle est principalement utilisée pour les mesures carotidiennes ou la formation de plaques d'athérome y est plus fréquente. La mesure

du diamètre interne de l'artère et de ses propriétés élastiques peut être effectuée avec différents types de matériels d'échographie. Ces méthodes permettent de mesurer et de définir les propriétés physiques des vaisseaux comme l'élasticité, la distensibilité et la compliance artérielle.

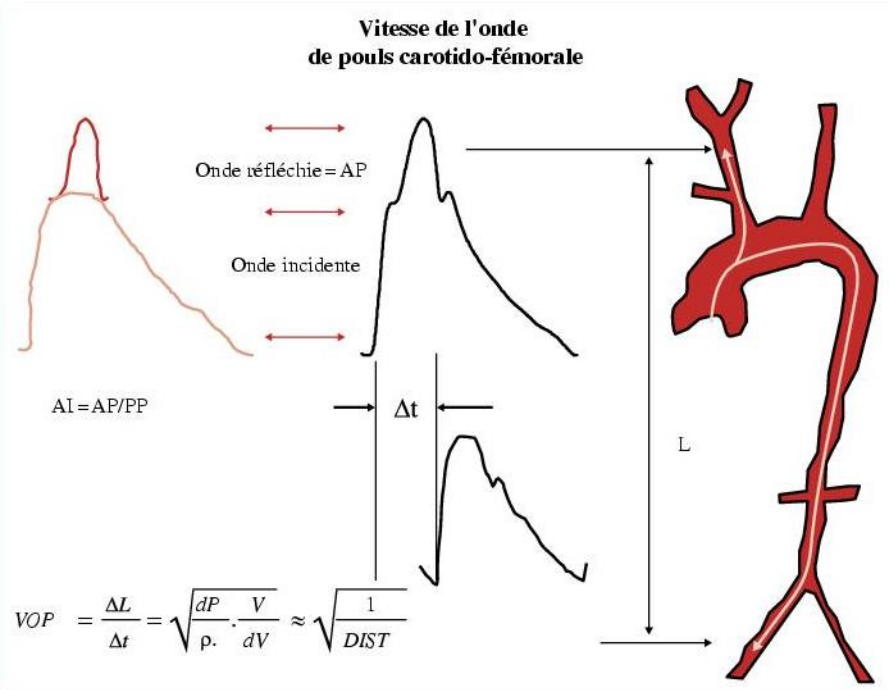


Figure 1: Représentation schématique de la mesure de VOP « carotido-fémorale » chez l'homme.

L'onde de pression est mesurée sur deux sites artériels distants (ΔL) avec un délai (Δt), la VOP correspond à ΔL/Δt (Boutouyrie 2007).

3) Facteurs déterminants l'élasticité artérielle

La capacité des artères à modifier leur diamètre dépend de plusieurs paramètres.

La compliance (C) artérielle est un marqueur de la capacité de l'artère à amortir la charge et les variations de pression lors des différents cycles cardiaques. Elle est définie classiquement par le changement de volume sanguin artériel (ΔV) engendré

par un changement de pression artérielle (ΔP) tel que C = ΔV/ ΔP avec C exprimé en μm^3/mmHg ou m^3/kPa (Hardt et al. 1999).

La distensibilité artérielle est un marqueur de la charge mécanique de la paroi artérielle, elle est définie comme un changement relatif du volume artériel (ΔV/V) pour un changement de pression (ΔV/V/ΔP) (Reneman, Meinders, et Hoeks 2005).

Selon la loi de Hooke l'élasticité correspond à la propriété intrinsèque qu'a un matériau à se déformer sous l'effet d'une contrainte avant de revenir à son état d'origine. Le rapport entre la contrainte exercée et la déformation du matériau permet de définir le module élastique appelé module de Young (Vlachopoulos, O'Rourke, et Nichols 2011). Plus la valeur du module de Young est élevée et plus son élasticité est faible et donc sa rigidité importante (**Figure 2**).

La paroi des artères est composée d'un ensemble de compartiments hétérogènes, l'élasticité de la paroi artérielle correspond à la somme des éléments qui la composent.

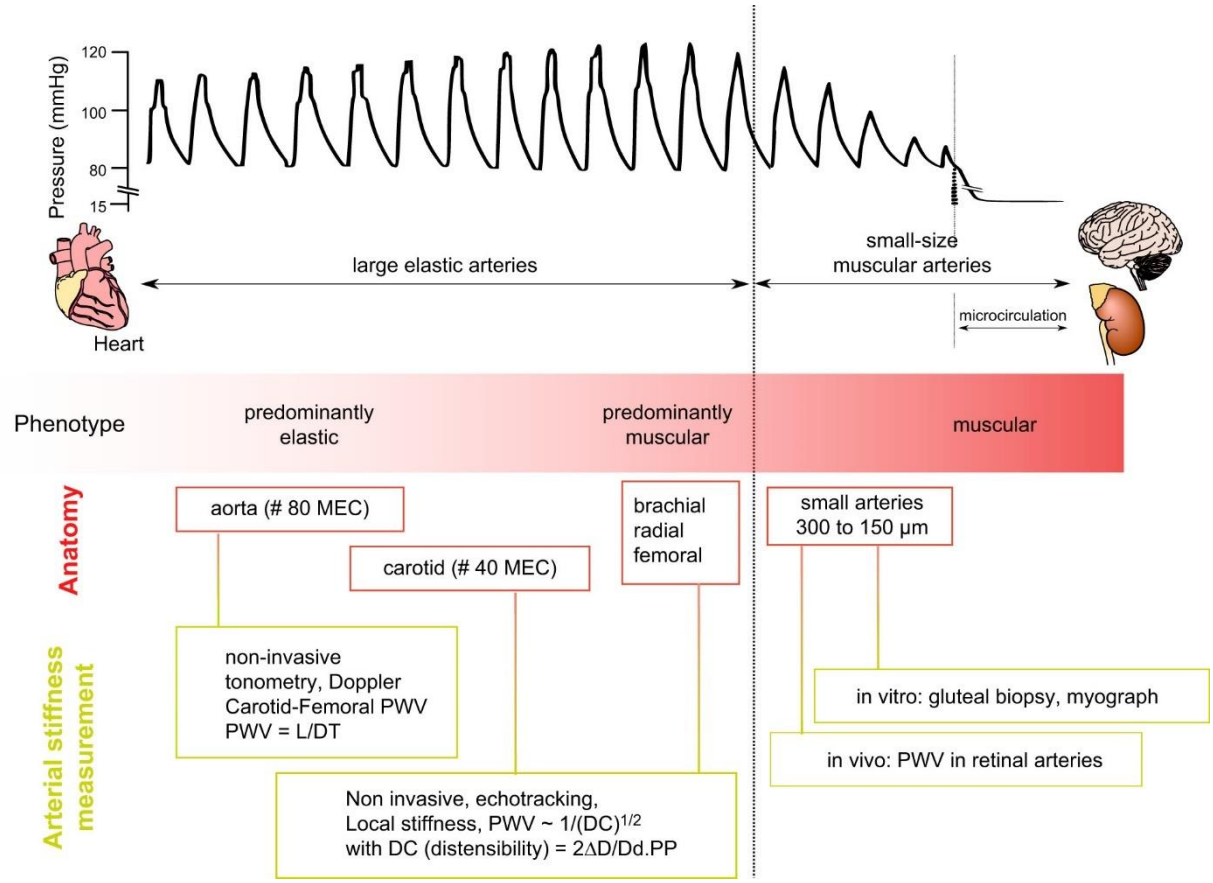


Figure 2 : Les paramètres de la rigidité artérielle (Patrick Lacolley et al. 2017).

Les méthodes de mesures de la rigidité artérielles dépendent de la section de l'artère et de sa localisation. Même si la méthode de référence de la mesure de la rigidité aortique est la VOP carotido-fémorale mais la VOP à l'échelle locale peut être calculée comme VOP = 1/Distance$^{1/2.}$ PWV : Pulse Wave Velocity ou VOP, D : Diamètre, PP : Pression Partielle.

4) Composition de la paroi artérielle

La paroi artérielle est compartimentée en trois tuniques, l'intima, la média et l'adventice :

- L'intima est la tunique la plus interne de l'artère, elle est directement au contact du flux sanguin, elle est composée d'une monocouche de cellules endothéliales et de la lame limitante élastique interne. Elle fonctionne comme une barrière entre le sang et les tissus intra-pariétaux. L'endothélium joue un rôle majeur dans la modulation basale et dynamique du diamètre artériel en relarguant des

molécules vasomotrices agissant sur la média (Y. Zhao, Vanhoutte, et Leung 2015).

- La média est la tunique médiane de l'artère délimitée par les lames élastiques interne et externe, elle permet la constriction et la dilatation des vaisseaux. Elle contient principalement des CMLVs et une MEC composée d'élastine, de collagène, de glycoprotéines, de protéoglycanes et de fibronectine (Zieman et al. 2005). La média s'organise sous forme de faisceaux, composés de CMLVs et de fibres d'élastine (**Figure 3**). La contraction des faisceaux musculo-élastiques composés de CMLVs et de fibres d'élastine et de collagène peut être initiée mécaniquement par une pression intraluminale ou une déformation de la paroi ou par une activation pharmacologique par la liaison d'un ligand à la surface des cellules.

- L'adventice est la tunique la plus externe et hétérogène de l'artère, elle est composée de terminaisons nerveuses, de tissu adipeux périvasculaire jouant un rôle dans la régulation de la contraction artérielle et la migration des CMLVs (Barandier et al. 2005). L'adventice possède aussi des éléments de soutien et de résistance comme les fibroblastes ou des fibres de collagène qui assurent l'adhérence avec les tissus adjacents (Ruan Cheng-Chao et al. 2010). L'organisation des fibres de collagène parallèlement aux forces exercées sur la paroi permet une résistance aux contraintes mécaniques. L'adventice contient également des *vasa vasorum* et des vaisseaux lymphatiques permettant le transport des éléments sanguins traversant la paroi de l'artère.

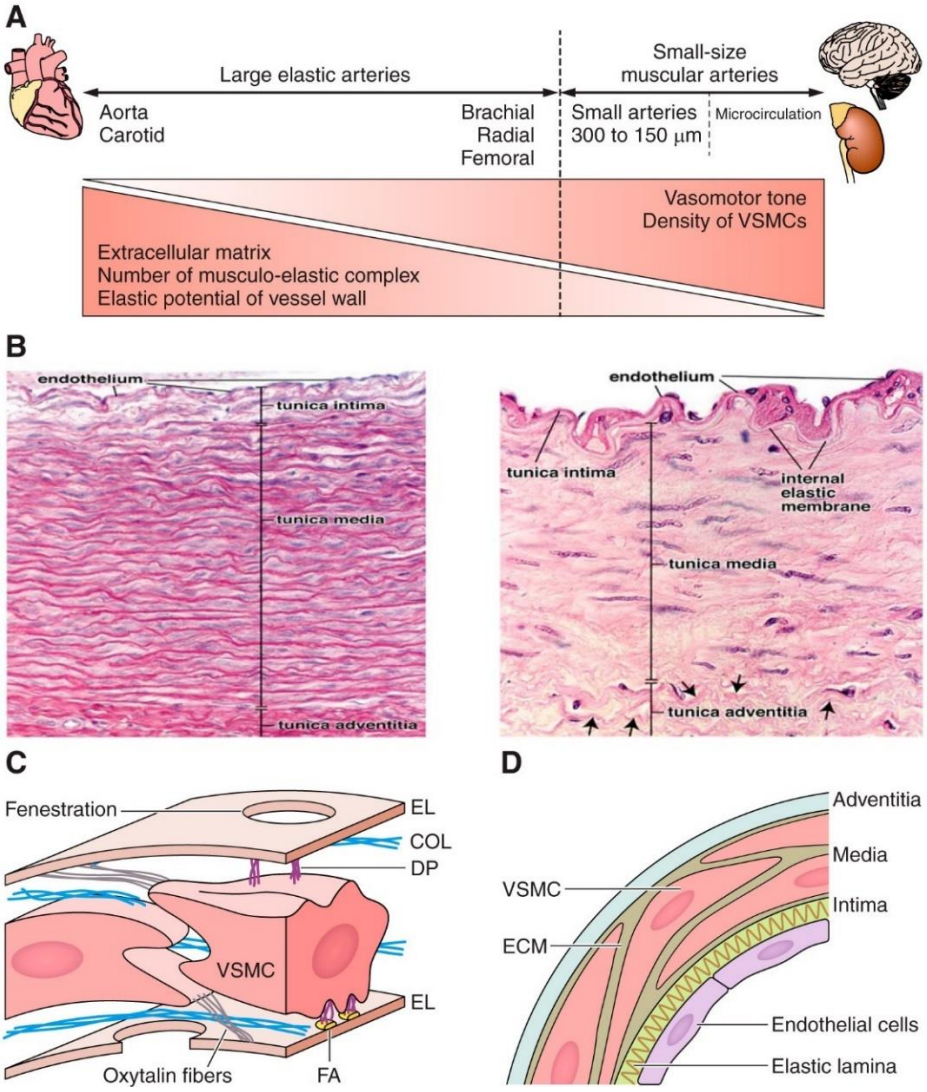


Figure 3 : Hétérogénéité et composition de la paroi artérielle (Patrick Lacolley et al. 2017)

A : Les artères de gros calibres jouent un rôle de conduction des forces et de compliance alors que les artères de petit calibre permettent la distribution du sang vers les organes cibles. La composition de la paroi varie selon le calibre de l'artère et sa fonction. B : A gauche une image histologique d'une artère de gros calibre et à droite une image d'une artère de petit calibre, la paroi artérielle est composée de trois tuniques, l'intima composée de cellules endothéliales, la média composée de CMLVs et de fibres élastiques et l'adventice composée de cellules et de tissu de soutien. C : Schéma de la média d'une artère de gros calibres ou les CMLVs sont encastrées entre des lamelles élastiques et fixées par des plaques denses (DP) composés d'adhérences focales, les lamelles élastiques sont fenestrées (Fen) et du collagène (COL) est présent parallèlement à celles-ci. Les fibres d'oxytalan (Ox) composées de

fibrilline permettent la liaison entre les CMLVs et les lames élastiques. D : Schéma de la média d'une artère de petit calibre, composée de quelques couches de CMLVs dans la média et dispersées de manière lâche dans la MEC.

5) Composants fonctionnels de la rigidité artérielle

Les composants de la matrice extracellulaire

Les artères de gros calibres sont soumises à un stress mécanique cyclique induit par les pressions pulsées.

a) L'élastine

Le réseau de fibre d'élastine contribue jusqu'à 50% en poids sec des vaisseaux. Ce réseau est composé de fibres concentriques séparées par des couches de CMLVs (**Figure 3**). L'arrangement des CMLVs le long des fibres élastiques permets lors de la contraction d'étirer ces fibres, réduisant ainsi leur distance les unes des autres. L'élastine se présente sous une isoforme unique codée par le chromosome 7 chez l'homme (Mithieux et Weiss 2005). Sécrétée sous forme de tropoélastine soluble par les CMLVs, la protéine est transformée dans le milieu extracellulaire en élastine par des protéases. Ces molécules d'élastine s'agrègent et sont stabilisées par la réticulation des lysyl oxydases, formant ainsi un réseau de soutien dense et insoluble (Wise et Weiss 2009). Les molécules d'élastine sous l'effet de contraintes mécaniques peuvent s'étirer jusqu'à 220% de leur longueur initiale sans rupture et de manière réversible. Outre ses propriétés physiques, les molécules d'élastine jouent aussi un rôle sur les CMLVs. En effet, des études *in vitro* ont observé une prolifération moins importante des CMLVs en présence d'élastine (Hinek 1994). Des études génétiques ont montré qu'une mutation sur un allèle codant pour l'élastine était responsable de sténoses aortiques supravalvulaire avec un fort rétrécissement du diamètre des grosses artères (Curran et al. 1993). De même pour des patients atteint d'un syndrome

de Williams la sténose artérielle et l'hypertrophie de la paroi artérielle est dû à un défaut d'assemblage de l'élastine (Patrick Lacolley et al. 2002).

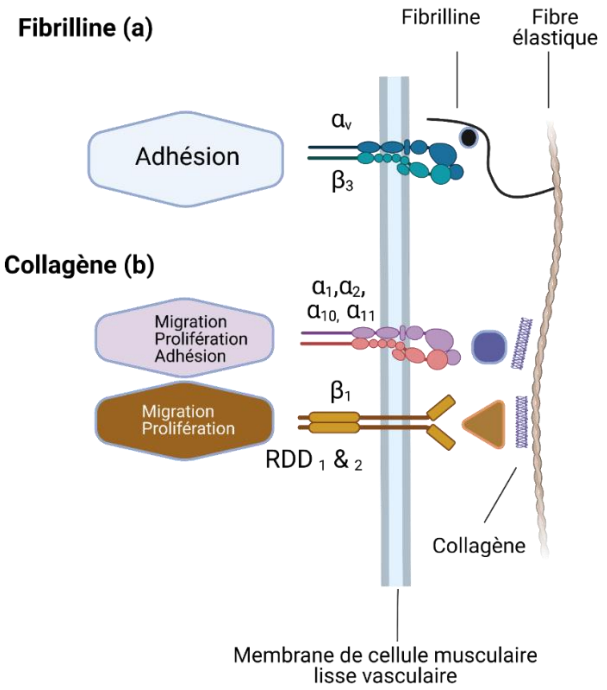


Figure 4 : Effets de la MEC sur la signalisation des CMLVs.
La fibrilline régule l'adhésion via les intégrines $\alpha_v\beta_3$ (a), le collagène régule l'adhésion (b), la migration et la prolifération des CMLVs par l'intermédiaire de récepteurs et de voies de signalisations différentes.

b) La fibrilline

La fibrilline est une microfibrille extracellulaire qui se lie aux fibres d'élastine. Elle possède deux isoformes : la fibrilline-1 codée par le chromosome 15 et la fibrilline-2 codée par le chromosome 5. Les microfibrilles de fibrilline se lient avec des éléments de la MEC comme la vitronectine, la fibronectine ou le collagène (Handford et al. 2000), (Kielty et al. 2002). L'importance structurelle des microfibrilles de fibrilline a été observée dans le syndromes de Marfan où une mutation du gène codant pour la fibrilline-1 entraine plusieurs modification phénotypiques du système cardiovasculaire, oculaire et du cytosquelette (Dietz et al. 1993). Outre son activité structurelle la

fibrilline-1 possède aussi une activité signalétique sur les CMLVs. Des études *in vivo* ont mis en évidence une liaison entre les séquences RGD (Arginine – Glycine – Acide aspartique) situé à l'extrémité de la boucle TB4 et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la surface des CMLVs (**Figure 4a**), régulant la survie, la prolifération et l'adhésion des CMLVs dans la paroi artérielle (Lee et al. 2004).

c) Le collagène

Le collagène est une famille de protéines composée de plus de 24 types différents et environ 38 chaines polypeptidiques différentes (Myllyharju et Kivirikko 2001). Les types I et III sont les plus communs dans la paroi des artères, ils jouent un rôle fondamental dans le maintien de la structure de la paroi artérielle. Une mutation pour le gène codant pour le procollagène de type I entraine une ostéogénèse imparfaite résultant en une dilatation aortique trop importante aboutissant à sa rupture (Kuivaniemi, Tromp, et Prockop 1997). De même une mutation pour les gènes codant pour le procollagène de type III est responsable du syndrome d'Ehlers-Danlos entrainant des ruptures vasculaires (Pepin et al. 2000). Enfin des souris ayant des mutations des gènes codant pour les collagènes de type I et III meurenst prématurément d'hémorragies par ruptures vasculaires indiquant l'importance du collagène dans le maintien de la structure de l'artère. Outre son action structurelle, le collagène joue aussi un rôle dans la signalisation des CMLVs. En effet, le collagène est reconnu par deux classes majeures de récepteurs, les récepteurs de la famille des intégrine β_1 (Giancotti 2000) et les récepteurs à domaines discoïdine (RDD-1 et RDD-2) (Hou, Vogel, et Bendeck 002). Ces deux groupes sont présents à la surface des CMLVs et jouent un rôle dans la migration, la prolifération et l'adhésion (**Figure 4b**).

Historiquement la rigidité artérielle était essentiellement caractérisée comme la rigidité de la matrice extracellulaire et de ses composants comme le réseau d'élastine ainsi que les différents types de collagènes. Cependant des données sur les CMLVs et leurs rôles dans la mécanobiologie ont permis de mettre en évidence leur contribution majeure dans la rigidité artérielle. En effet une augmentation des interactions CMLVs-matrice au niveau des points focaux entraine une rigidité artérielle plus élevée. L'importance de ces interactions CMLVs-matrice a initialement été rapportée chez le rat hypertendu (ou SHR pour Spontaneously Hypertensive Rat) où la surexpression d'intégrines et de fibronectine augmente les sites d'attachements entre la matrice et les CMLVs sans modification de l'élastine et du collagène. Ces modifications contribuent à l'adaptation mécanique de la paroi artérielle du rat SHR soumis à des contraintes plus élevées (Bezie et al. 1998).

6) Structure et fonction des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLVs)

Les CMLVs sont les cellules majoritaires de la paroi artérielle bien que leurs distributions soient inégales tout au long de l'arbre artériel. En effet les artères de gros calibres possèderont un nombre plus important d'unité musculo-élastique, et une élasticité plus importante leur permettant de mieux absorber l'onde de pouls par rapport aux artères de petits diamètres plus densément riches en CMLVs et qui assurent le maintien d'un tonus vasomoteur jusqu'à la microcirculation et les tissus cibles (Resch et al. 2011).

Les CMLVs sont soumises à des contraintes hémodynamiques constantes mais différentes selon leur localisation dans l'arbre artériel. Les CMLVs détectent et répondent à divers stimuli mécaniques. C'est ce qui définit le concept de mécanobiologie : la cellule perçoit un état mécanique et cela détermine des réponses cellulaires (Humphrey et Schwartz 2021). Les forces mécaniques régulent la

signalisation et l'expression des gènes pour maintenir une fonction optimale des vaisseaux. Ces signaux se propagent à l'intérieur et entre les CMLVs, les intégrines liées à la MEC transmettent les forces de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire des filaments d'actine, des filaments intermédiaires et des microtubules (Wiesner, Legate, et Fässler 2005). Les complexes de jonctions de cadhérine permettent la propagation de cellules à cellules. Les contraintes mécaniques permettent l'activation de voies de signalisation régulant la prolifération, la migration et la contraction (Halka et al. 2008) (**Figure 5**).

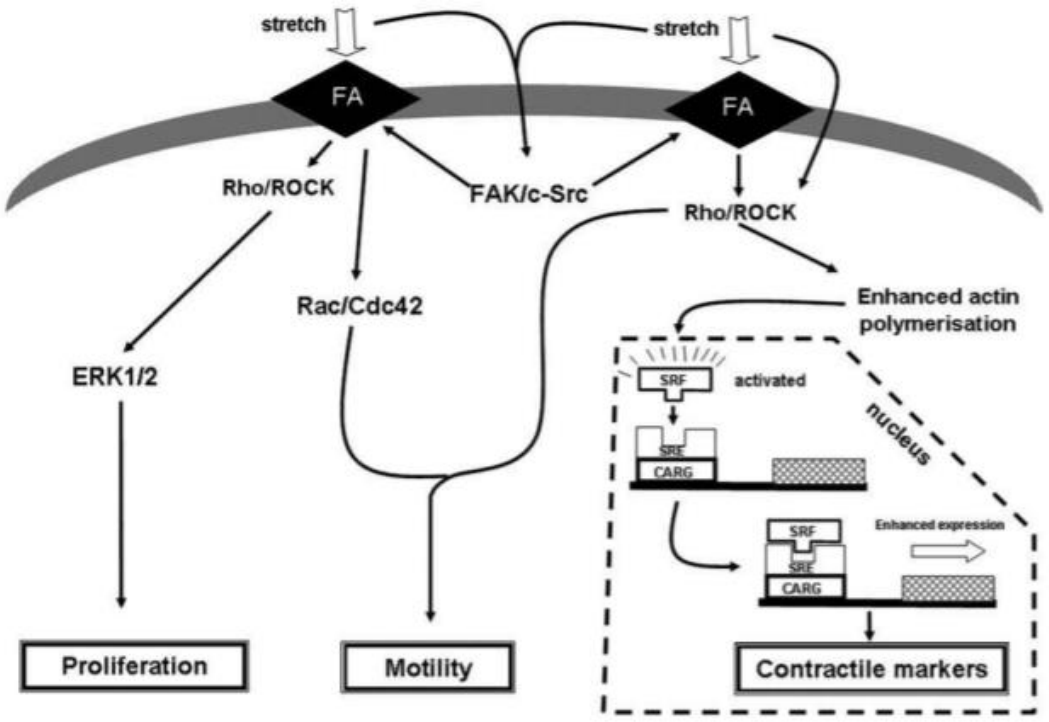


Figure 5 : Impact de l'étirement sur l'activation des voies de signalisation modulant le comportement des CMLVs

Les contraintes mécaniques exercées sur les CMLVs induisent l'activation des adhérences focales (AFs) qui elles-mêmes favorisent l'activation des complexes Rho/Rho-associated protein kinase (ROCK) et Focal adhésion kinase (FAK)/c-Src. La conséquence est une augmentation de l'expression des marqueurs de la contractilité et de la prolifération des CMLVs (Halka et al. 2008).

La sollicitation mécanique de la paroi des artères joue également un rôle dans la régulation du phénotype des CMLVs, par l'activation de la voie Rho/ROCK par les AFs, ou des facteurs de transcription comme le complexe SRF (Serum Factor Reponse)-myocardine permettant l'expression de gènes de différenciation comme SM22α (smooth muscle protein 22 alpha), l'α-SMA (α-smooth muscle actin), la smootheline, la desmine, la caldesmone et la calponine (**Figure 5**), (Mack et al. 2001) ; (Owens, Kumar, et Wamhoff 2004) et (Hellstrand et Albinsson 2005). Les fibres de stress des CMLVs composées d'α-SMA (une isoforme spécifique) sont les composants majoritaires des cellules et permettent la mécanotransduction et la transmission cellulaire (Qiu et al. 2010). Des contraintes mécaniques induisent une prolifération des CMLVs par l'activation des mitogen activated proteins (MAP) kinases ERK (*extracellular signal regulated kinase*) 1/2 et la voie de la phosphoinositide 3-kinase ou PI3K (Albinsson et Hellstrand 2007).

a) Les modifications des cellules musculaires lisses vasculaires dans les pathologies artérielles

Les CMLVs ont pour fonction physiologique principale la régulation du tonus vasculaire par leur contraction et leur relaxation à l'intérieur de la paroi artérielle. Elles expriment une large gamme de protéines contractiles dont l'α-SMA, les chaînes lourdes de la myosine 1 et 2, la calponine et la smootheline. Cependant les CMLVs ne sont pas différenciées de manière terminale et conservent donc une plasticité phénotypique. En effet des signaux extracellulaires permettent à ces cellules une dédifférenciation passant d'un phénotype contractile à un phénotype migratoire, prolifératif ou sécrétoire (Sinha, Iyer, et Granata 2014) et (Patrick Lacolley et al. 2017).

La différenciation des CMLVs dépend de paramètres hémodynamiques, de facteurs de croissance, de voie de signalisation régulant la motilité artérielle et l'interactions

ligand-récepteur. Outre leur rôle contractile, les CMLVs interviennent dans la production de la MEC, la formation néo-intimale et le remodelage vasculaire par un changement vers un phénotype synthétique avec un rôle de réparation de la paroi artérielle (Kanda et al. 2000) ; (Michel, Li, et Lacolley 2012) et (Durham et al. 2018).

En conditions physiologiques, les CMLVs avec un phénotype contractile peuvent se modifier *in vitro* vers un phénotype adipogène caractérisé par l'expression de marqueurs adipocytaires comme l'adipsine ou la leptine et pouvant faciliter la formation de plaques d'athérome (Davies et al. 2005). Les CMLVs peuvent aussi se dédifférencier en cellules spumeuses, exprimant des marqueurs cellulaires identiques aux macrophages comme le CD68 (*cluster of différenciation 68*) ou le Galectine-3/Mac2 et induire des lésions d'artériosclérose (épaississement et perte d'élasticité de la paroi des artères) de la paroi (Swirski et Nahrendorf 2014) et (Samouillan et al. 2012). Le développement de vésicules calcifiantes, l'expression protéique d'ostéocalcine et d'ostéopontine avec une disparition des marqueurs de contractilité traduisent un changement du phénotype contractile vers un phénotype chondrogénique (**Figure 6**), (Shanahan et al. 2011).

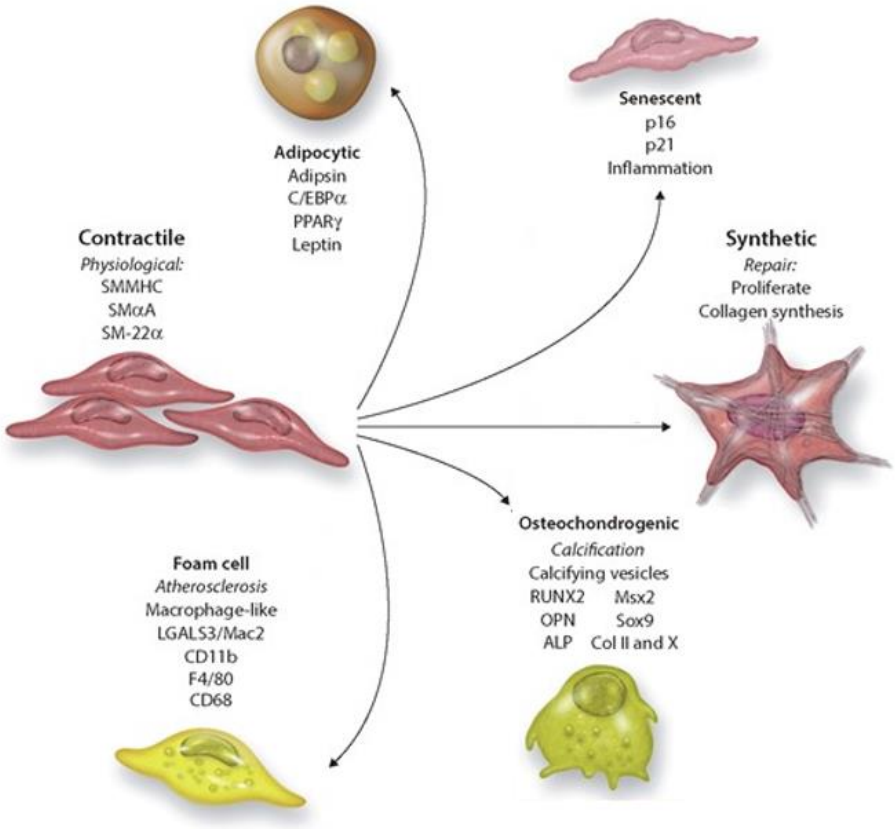


Figure 6 : Diagramme phénotypique des CMLVs dans les pathologies cardiovasculaires et expressions protéiques.

Les changements phénotypiques sont caractérisés par des changements d'expression protéique dans les CMLVs répondant à des signaux cellulaires et extra-cellulaires et entrainant des pathologies diverses (Durham et al. 2018).

L'augmentation de la rigidité artérielle est étiologiquement retrouvée dans de nombreuses pathologies vasculaires comme l'athérosclérose, l'hypertension artérielle ou dans les accidents vasculaires cérébraux. Cette augmentation se traduit conjointement par des modifications intrinsèques des CMLVs et de la MEC avec une augmentation du collagène et une diminution de l'élastine *in situ*. Les CMLVs étant prédominantes dans la paroi, et ayant des propriétés mécaniques liées à leur cytosquelette et aux variations d'expression de leurs protéines, elles pourraient jouer

un rôle prédominant dans la modulation de la rigidité artérielle par leur rigidité cellulaire propre. En effet, des CMLVs issues de singes âgés ont une rigidité mesurée à l'aide d'un microscope à force atomique plus importante que celles issues de singes jeunes (Qiu et al. 2010). Cette augmentation de la rigidité cellulaire s'accompagne d'une augmentation du réseau de filaments d'actine reflétant d'importants changements du cytosquelette (**Figure 7**), (Zhu et al. 2012).

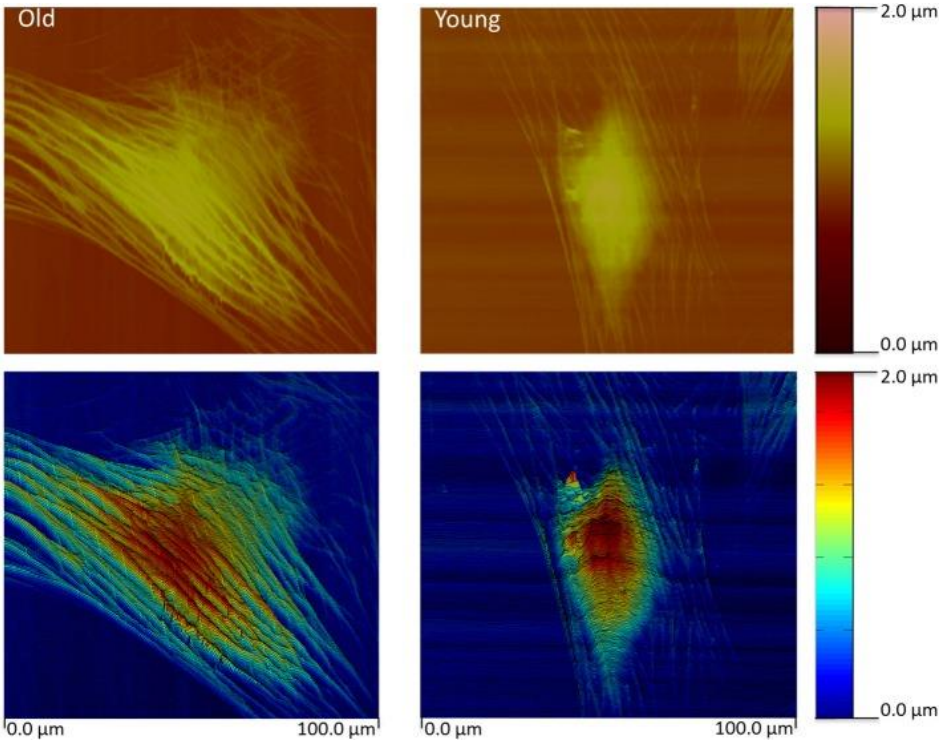


Figure 7 : Relief de CMLVs de singes jeunes et âgés d'après (Zhu et al. 2012).

Le réseau de filaments d'actine est plus vaste et dense chez les singes âgés par rapport aux jeunes (Zhu et al. 2012). Cependant il existe une disparité dans les mesures invitro du module de Young cellulaire. En effet les données de rigidité des CMLVs dans la bibliographique sont variables, la rigidité de CMLVs de singes jeunes et âgés étaient respectivement d'environ 3,5 et de 22 kPa par nanoindentation (Zhu et al. 2012) ou d'environ 10 et 17 kPa pour (Seawright et al. 2018). Pour des CMLVs

aortiques de souris le module de Young basal est d'environ 6 kPa (McCallinhart et al. 2020).

b) Les intégrines dans la modulation de la fonction des CMLVs

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques αβ présents à la surface des CMLVs, ce sont les principaux récepteurs pour les ligands de la MEC permettant la formation d'un complexe protéique appelé Adhérence Focale. Il existe de nombreux types et combinaisons de sous unités différentes ayant chacune leurs ligands et mécanismes (**Tableau 1**), (Mousa *et al.* 1997). La liaison des intégrines aux protéines de la MEC est finement régulée par des changements de conformation de l'intégrine. En effet, au repos l'intégrine possède une faible affinité pour son récepteur, cependant après une activation *via* des contraintes mécaniques ou une signalisation intracellulaire, l'affinité des intégrines augmentent, régulant par conséquent une large gamme de fonctions cellulaires. Par exemple, après une lésion de l'endothélium vasculaire chez des singes, les CMLVs migrent pour former une néo-intima possédant moins de sous unités β_1 actives suggérant que cette intégrine sert au maintien des CMLVs dans un phénotype contractile (Koyama et al. 1996).

Tableau 1: Expression et implications des intégrines dans les CMLVs.

Sous unité α	Sous unité β	Ligands	Expression dans les CMLVs *in vivo*	Implications dans les CMLVs
α_1	β_1	Col I, Col II, Col III, Col IV, COL VIII, LN I. (Yamamoto et al. 1994)	Hautement exprimée dans les CMLVs aortiques et coronaires (Louis et al. 2007)	Prolifération et migration (Loufrani et al. 2008)
α_3	β_1	COL I, LN, FN. (Yamamoto et al. 1994)	Isoforme a3A hautement exprimée (Aa et al. 1997)	La délétion du gène codant cette intégrine entraine la mort des souris

				en période néonatale (Kreidberg et al. 1996).
α_4	β_1	VCAM-1, FN, OPN. (Yamamoto et al. 1994)	Vaisseaux en cours de développement ou nouvellement formés, aorte embryonnaire (Sheppard et al. 1994).	Augmente la prolifération et entraine la fibrose (Reindel et al. 2013).
α_5	β_1	FN, OPN. (Yamamoto et al. 1994)	Média des artères coronaires saines et avec athérosclérose, artère aortique (Pickering et al. 2000).	Migration des CMLVs par la voie FAK/Rac1. Contribue au tonus myogénique (Sun et al. 2008) .
α_6	β_1	CCN1, LN (Kortesmaa et al. 2000).	Artères carotidiennes (Matsumae Hironobu et al. 2008).	Régule l'adhésion et la prolifération (Matsumae Hironobu et al. 2008).
α_6	β_4	LN (Kortesmaa et al. 2000).	Canal artériel fœtal (Cremona et al. 1994).	Rôle non identifié
α_7	β_1	LN (Yao et al. 1996).	Isoforme hautement exprimée dans les CMLVs aortiques (Yao et al. 1996).	Empêche la prolifération, maintien du phénotype contractile (Yao et al. 1996), (Welser Jennifer V. et al. 2007).

α_8	β_1	FN, Ténascine, VN (Schnapp, Hatch, et al. 1995).	Très exprimée dans les CMLV aortiques (Schnapp, Breuss, et al. 1995).	Maintien du phénotype différencié, (Zargham et Thibault 2006)
α_v	β_3	VN, FN, OPN, LN, TSP, COL I, COL IV, Ténascine-C, Fibrinogène, Prothrombine, VWF (Clyman, Mauray, et Kramer 1992), (Clyman et al. 1994), (Yee et al. 1998), (Jérémy Lagrange et al. 2021).	Hautement exprimée dans les CMLVs aortiques et artérioles crémaster, surexpression après une lésion vasculaire (Hoshiga et al. 1995), (Wu et al. 1998).	Migration, adhésion, apoptose (Srivatsa et al. 1997) (von Wnuck Lipinski et al. 2006). Hémostase *via* l'augmentation de la génération de thrombine (Mao et al. 2012).

COL : Collagène, LN : Laminine, OPN : Ostéopontine, FN : Fibronectine, VN : Vitronectine, TSP : Thrombospondine, VWF : Facteur von Willebrand.

Les intégrines jouent un rôle majeur dans le devenir de la CMLV et de ses différentes fonctions, l'hétérogénéité de ses sous unités et leurs implications en font des cibles thérapeutiques et de recherche de choix.

c) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est impliquée dans un ensemble de mécanismes cellulaires complexes. Elle joue un rôle dans la réorganisation du cytosquelette et module la formation de fibres de stress et l'entrée de calcium en activant la voie du facteur nucléaire κβ (NF-kB). Cette activation dépendante de facteurs de croissance en fait une cible thérapeutique de choix dans le processus tumoral en diminuant l'angiogenèse et en favorisant l'apoptose (Eliceiri et Cheresh 2001) et (Rüegg et

Mariotti 2003). Elle est aussi impliquée dans l'adhésion cellulaire en liant des éléments spécifiques de la MEC. En effet elle est capable de reconnaitre des motifs peptidiques RGD contenus dans la fibronectine et la vitronectine. La migration des CMLVs par des modifications de forces dans les fibres de stress est diminuée en présence d'antagonistes de cette intégrine. Le mécanisme fait intervenir une réduction de l'interaction entre la CMLV et la MEC d'une part et une diminution de la signalisation cellulaire par l'intégrine d'autre part (**Figure 8**), (Rupp, Czirók, et Little 2004).

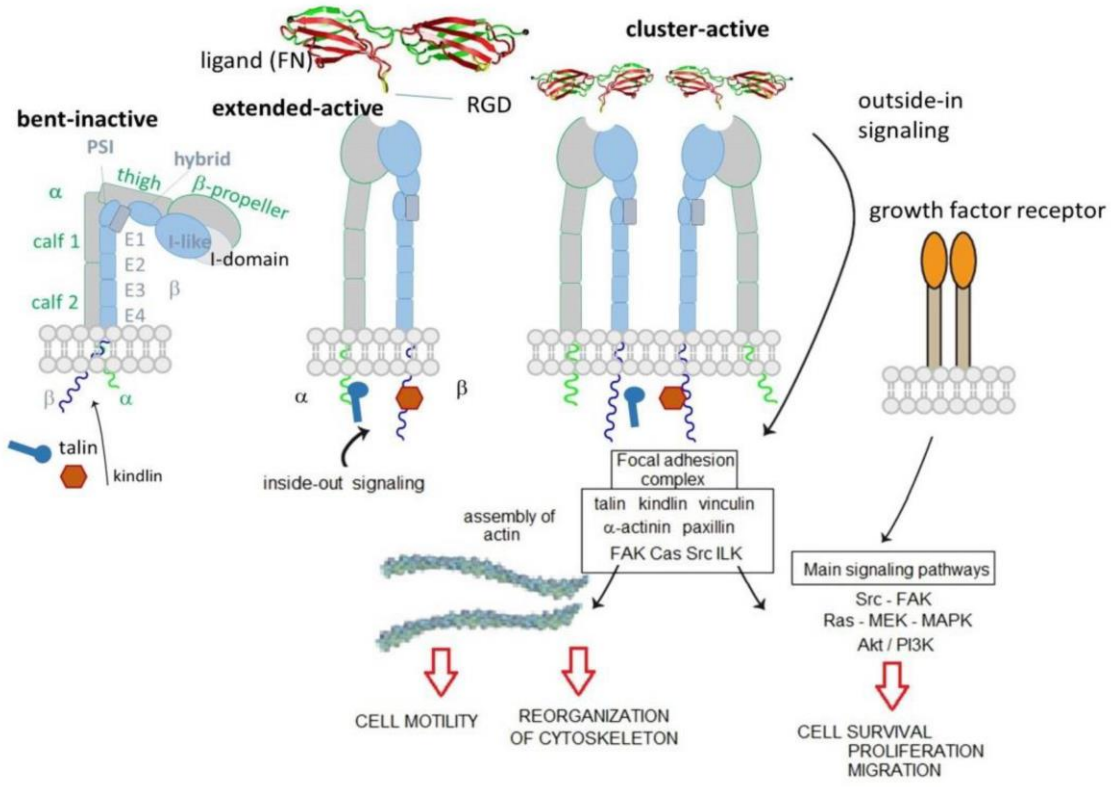


Figure 8 : Activation et signalisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Le passage de l'intégrine d'une forme inactive à une forme active permet la liaison de son ligand via le domaine RGD, ce qui entraine l'activation de voies de signalisation. Le recrutement et le regroupement de protéines cytoplasmiques permettent la mobilité cellulaire, la réorganisation du cytosquelette. Le couplage de l'intégrine à des récepteurs de facteurs de croissance induit une modification de la survie, de la prolifération et de la migration des CMLVs (J. Zhao et al. 2020).

d) La régulation de la rigidité artérielle et cellulaire par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ permet une signalisation de l'intérieur vers l'extérieur par la fixation de son ligand, des protéines cytoplasmiques se lient et changent de conformation. Parallèlement, il y a aussi une signalisation de l'extérieur vers l'intérieur impliquée dans le devenir cellulaire. Des contraintes mécaniques cycliques appliquées sur la paroi favorisent la synthèse de protéines du cytosquelette et contractiles ainsi que l'activation de la voie de signalisation Rho (Zeidan et al. 2003). Dans les mêmes conditions de contraintes, des CMLVs bronchiques expriment plus de protéines contractiles et possèdent un cytosquelette modifié par rapport à des cellules cultivées sur un milieu statique. De plus, les cellules soumises à une action mécanique ont une orientation perpendiculaire à la force appliquée et plus de fibres de stress. Les AFs qui correspondent à un regroupement d'intégrines et de protéines cytoplasmiques fortement liées au cytosquelette sont plus nombreuses et longues lorsque les cellules sont exposées à des contraintes mécaniques (Romer, Birukov, et Garcia 2006) et (Smith, Garcia, et Kogerman 1997). Un étirement cellulaire entraine une activation plus importante de la protéine FAK, très impliquée dans les AFs et dans la dynamique de réassemblage du cytosquelette et des filaments d'actine. FAK est une protéine à tyrosine kinase ubiquitaire de 125 kDa. Elle possède un domaine N-terminal de protéines ezrine/radixine/moesine (FERM), un domaine kinase central et un domaine C-terminal correspondant aux AFs (FAT ou *focal adhesion targeting).* Elle est exprimée dans les cellules musculaires lisses et joue un rôle important dans la signalisation cellulaire des AFs. Une délétion du gène codant pour FAK chez des souris entraine des défauts de morphogénèse et une diminution de la mobilité cellulaire *in vitro* (Ilić et al. 1995). L'autophosphorylation de FAK sur la tyrosine 397 (Tyr397) est une étape majeure nécessaire à sa liaison à la sous unité p85 du PI3K (Schlaepfer, Mitra, et Ilic 2004). Des cellules humaines de mélanomes surexprimant

l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ liée à la fibronectine possèdent une rigidité mesurée par microscope à force atomique plus importante suggérant qu'une augmentation de l'expression de cette intégrine est liée à une augmentation de la rigidité cellulaire (Lacaria et al. 2020).

En plus des rôles décrits ci-dessus l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ intervient dans un autre processus. Elle est capable de lier la prothrombine ce qui entraine une augmentation de la génération de thrombine à la surface des CMLVs (**Figure 10**) (Mao et al. 2012). La génération de thrombine nécessite, outre un récepteur pour la prothrombine, des facteurs de coagulation, des phospholipides procoagulants et du calcium. La réaction enzymatique de clivage de la prothrombine en thrombine par le complexe prothrombinase est nécessaire pour la conversion de fibrinogène en fibrine (**Figure 9**).

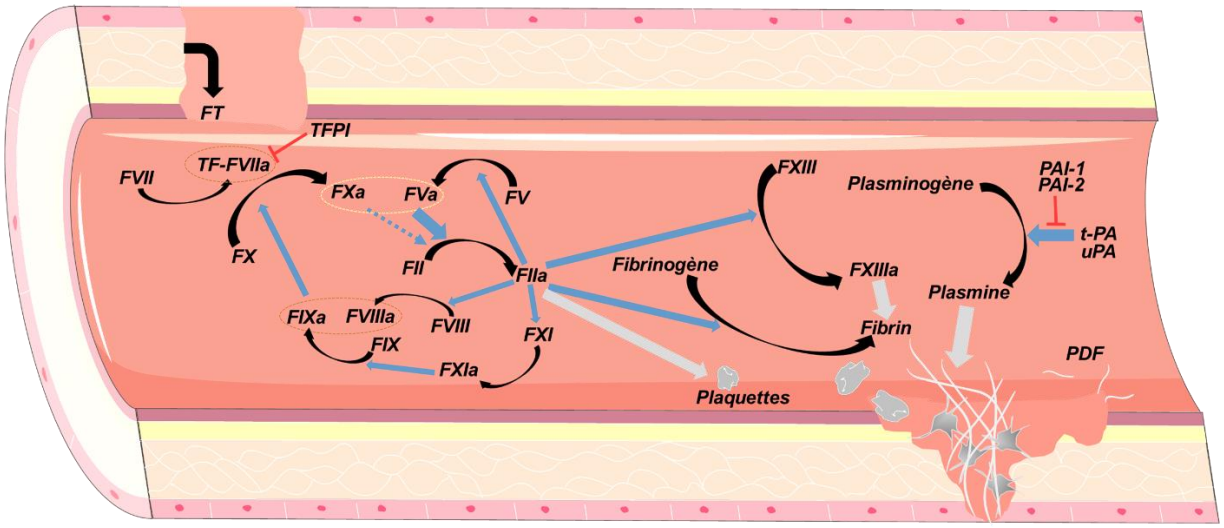


Figure 9 : **Schéma général de la coagulation.**

Schéma général de la cascade de la coagulation, en présence d'une brèche vasculaire le sous endothélium relâche du facteur tissulaire (FT) induisant l'activation du facteur VII (FVIIa) et du facteur X (FXa). Le FXa permet le clivage de la prothrombine (FII) en thrombine (FIIa). L'auto-amplification de la formation de FIIa a lieu par l'activation du facteur V (FVa), du facteur VIII (FVIIIa) et du facteur XI (FXIa). Le FXIa permet l'activation du facteur IX (FIXa) qui activera, avec le FVIIIa, le FX. La thrombine permet de cliver le fibrinogène induisant la formation de fibrine insoluble qui sera stabilisée par l'activation du facteur XIII (FXIIIa) (Jeremy Lagrange et Wenzel 2019).

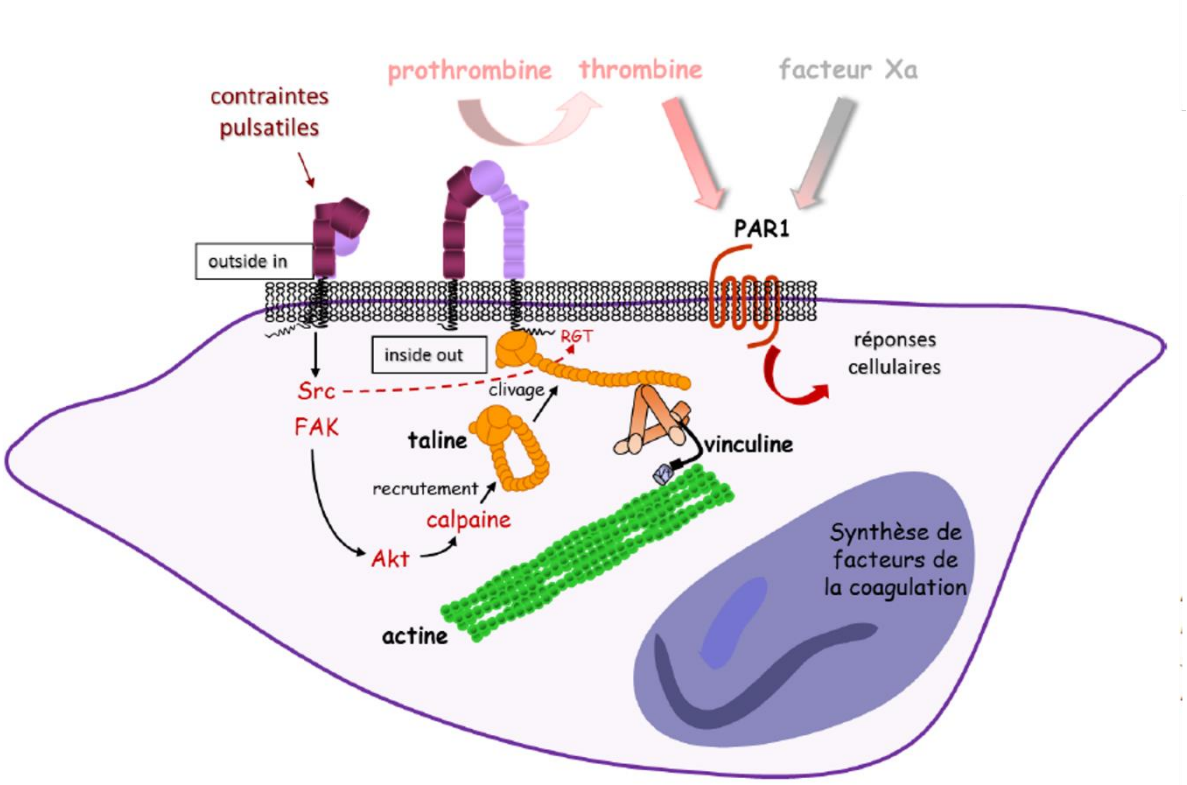


Figure 10 : L'interaction prothrombine/intégrine dans l'hémostase et la signalisation cellulaire.

Les contraintes pulsatiles induisent un changement de conformation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui lui permet de passer dans une conformation active et de lier la prothrombine. Cette liaison favorise la conversion de prothrombine en thrombine

e) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et les adhérences focales

Les CMLVs s'adaptent constamment aux forces exercées sur elles et aux changements de la MEC. Ce phénomène de mécanotransduction traduit une liaison constante entre la cellule et son milieu par l'intermédiaire des AFs. Ces AFs forment non seulement un lien structurel entre la cellule et son environnement mais permettent également d'établir un échange entre les forces mécaniques et les signaux de régulation à l'intérieur de la cellule (**Figure 11**) (Galbraith et al. 2002). Les AFs sont largement étudiées dans différentes pathologies et principalement dans les processus tumoraux, elles participent à la prolifération, la migration, la différenciation et même

l'apoptose (Provenzano et Keely 2011) ; (Gardel et al. 2008) ; (Guvendiren et Burdick 2010) et (Wang, Dembo, et Wang 2000).

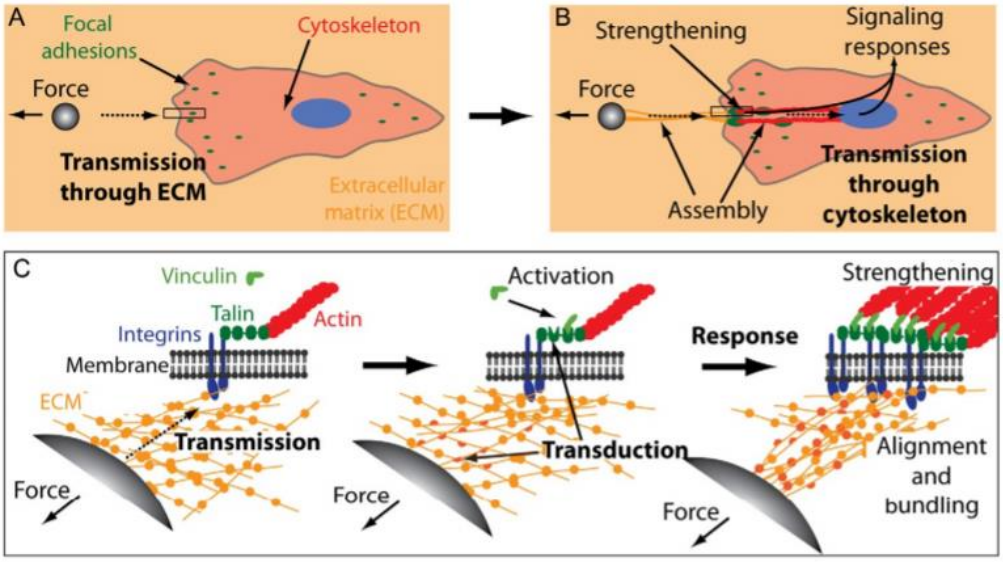


Figure 11 : L'adaptation de la mécanotransduction entre la cellule et son environnement.

A : Les cellules présentent dans une MEC déformable subissent des contraintes mécaniques à leur surface qui sont détectées à l'endroit des AFs ; B : La perception de ces forces entraine une consolidation des AFs et le recrutement de fibres de stress afin de transmettre les forces à travers le cytosquelette jusqu'au noyau et permettre des modifications de signalisation et d'expression génique. C : Le niveau de force appliqué induit des changements conformationnels et un recrutement de protéines augmentés lorsque les forces sont plus importantes (Hoffman 2014).

La mécanotransduction régulée par les AFs met en jeu un processus complexe impliquant de nombreuses protéines. L'intégrine en conformation activée possède une forte affinité pour des protéines de la MEC. La fixation de ces ligands aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ entraine la formation d'un complexe d'AFs. Lors de la fixation de la fibronectine à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en conformation active, la taline (une protéine intra-cytoplasmique) se déplie pour se fixer à l'extrémité β de l'intégrine et augmenter encore l'interaction MEC-Intégrine. Le recrutement de protéines des AFs intracellulaires comme la vinculine, la

paxilline ou l'α-actine (ou α-SMA), la phosphorylation de la protéine FAK et leur regroupement en complexe d'adhérence focale sont essentiels à la maturation de l'AF (**Figure 12 et 13**) (Kanchanawong et al. 2010).

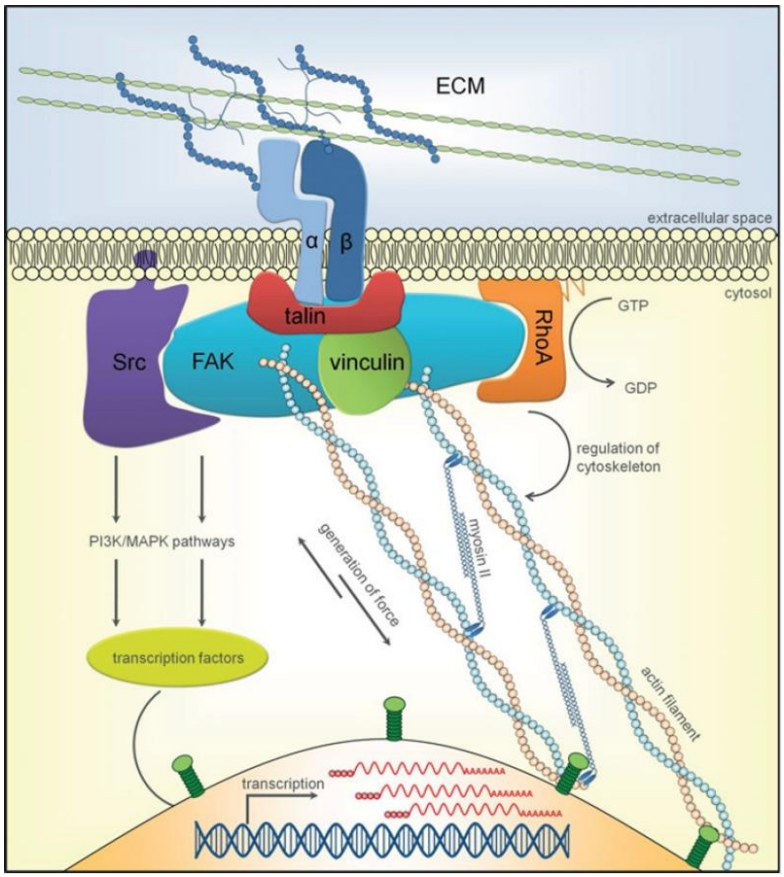


Figure 12 : L'adhérence focales mature, la liaison entre la MEC et le noyau cellulaire.

Le complexe ligand récepteur entraine le recrutement et le regroupement de protéines intra-cytoplasmiques induisant une polymérisation des filaments d'actine et un recrutement de myosine II afin de générer une force jusqu'au noyau induisant l'expression génique de protéines impliquées dans les AFs.

Les AFs sont des phénomènes dynamiques d'assemblage et de désassemblages au cours du temps. Leur maturation s'effectue avec un recrutement croissant de protéines d'adhésion afin d'augmenter la polymérisation de l'actine et la capacité contractile des CMLVs avec des dynamiques d'AFs allant de quelques secondes à quelques minutes (**Figure 13**). Le désassemblage des AFs est essentiel pour la motilité cellulaire et le

réarrangement du cytosquelette. La phosphorylation de la paxilline sur les résidus Tyr31 et Tyr118 est essentiel pour le désassemblage de FAK. Une délétion de Tyr31 et Tyr118 de la paxilline entraine une réduction de la fréquence de désassemblage des AFs (Webb et al. 2004).

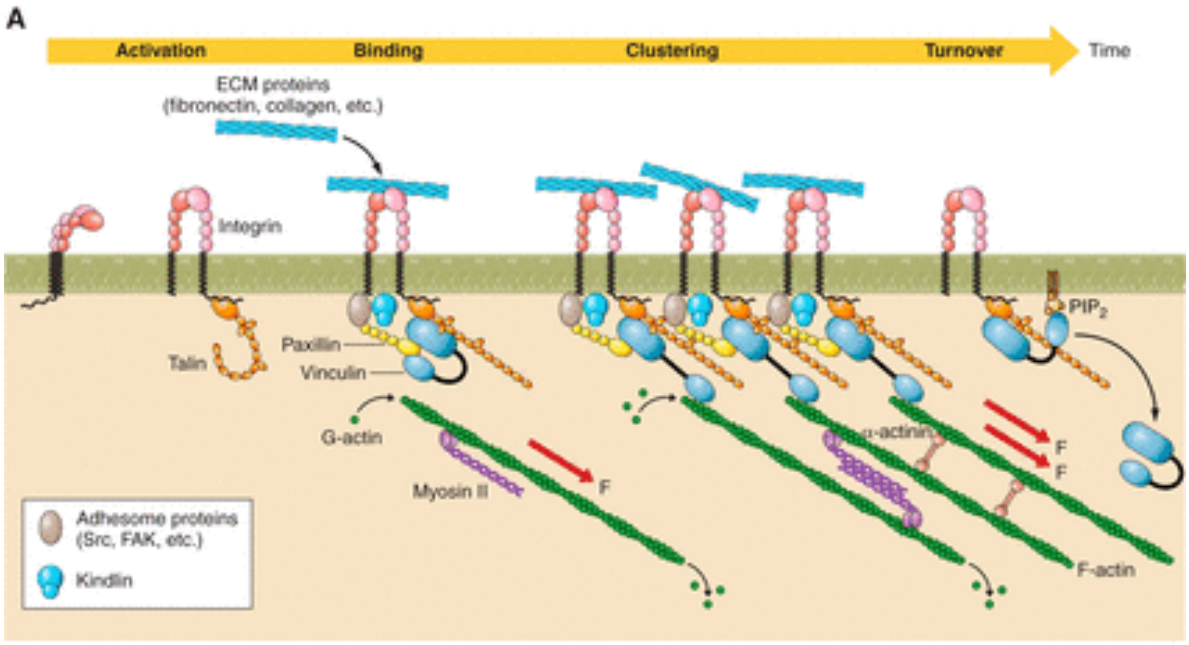


Figure 13 : Les acteurs et la dynamique des adhérences focales.

Après l'activation des intégrines et la fixation des protéines de la MEC, un recrutement de protéines intra-cytoplasmique (taline, vinculine, paxilline, FAK) liées entre elles permet la transmission de l'information vers les filaments d'actine et leur polymérisation avec le recrutement de protéines contractiles comme l'α-actine ou la myosine III. Cette cascade de signalisation est dynamique et entraine des assemblages et désassemblages des protéines impliquées (Patrick Lacolley et al. 2017).

f) L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la physiopathologie artérielle

Les facteurs de la coagulation interviennent dans des mécanismes cellulaires indépendants de leur fonction primaire dans l'hémostase. Le facteur von Willebrand (VWF) est une protéine essentielle dans l'hémostase, elle intervient dans le recrutement des plaquettes au point de lésion des vaisseaux lors de l'hémostase primaire mais aussi dans l'hémostase secondaire (la coagulation) où elle sert de

transporteur pour le facteur VIII. Dans la paroi artérielle, le VWF est sécrété à la fois au niveau apical, mais également au niveau basal des cellules endothéliales, suggérant que le VWF pourrait avoir des actions dans les couches du sous endothélium et donc sur les CMLVs (Sporn, Marder, et Wagner 1986). Le lien entre VWF, devenir cellulaire et pathologie vasculaire a été établi par des modifications cellulaires dans la prolifération, l'angiogenèse et la modulation de la réponse immunitaire. Par l'intermédiaire de la voie de signalisation Notch le VWF intervient dans la maturation de la paroi artérielle (Scheppke et al. 2012). De même, le facteur VWF est un ligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ au niveau des CMLVs par sa séquence RGD (Denis et al. 1993).

III. Hypothèses et objectifs

Notre hypothèse de travail et que les CMLVs et leurs fonctions peuvent être modulées par des modifications de la rigidité de la paroi et de la matrice médiées par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à leurs membranes. Des modifications de la rigidité et de l'intégrine induiraient des changements structuraux et fonctionnels des CMLVs et des modifications de paramètres structuraux dans un modèle *in-vivo*.

Nos objectifs sont de mettre en évidence l'implication majeure des CMLVs et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans différentes fonctions de la paroi artérielle comme la rigidité artérielle, l'hémostase et la prolifération intimale. Il s'agit aussi de corréler ces observations à celles recueillies *in-vivo* chez un modèle de souris α_v^{smKO}.

Les objectifs détaillés étaient :

- D'évaluer la modification de la rigidité des CMLVs lorsque la rigidité de la MEC est augmentée.

- De mesurer l'évolution de l'expression protéique des protéines impliquées dans les AFs consécutivement à des rigidités variables de la MEC.

- D'observer la dynamique des AFs sur des matrices de rigidités variables après transfection des CMLVs par la protéine FAK marquée en utilisant des techniques d'imagerie moléculaire.

- D'analyser la participation des CMLVs et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans l'hémostase sur des rigidités de matrices différentes et en conditions pathologiques de prolifération intimale en présence de VWF.

- D'analyser le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ *in-vivo* dans les modifications des paramètres artériels avec un modèle transgénique in-vivo.

IV. Matériel et Méthodes

1) Modèles de souris invalidées pour la sous unité α_v des intégrines dans les CMLVs

Des souris C57B/6 ont été invalidées pour la sous unité α_v à l'aide du système Cre-Lox. Ces souris ont été obtenues en croisant deux lignées : les souris floxées pour la sous unité α_v des intégrines ($\alpha_v^{flox/flox}$) données par le Dr. Adam Lacy Hulbert (Massachusetts General hospital Boston, USA) et des souris SM22-Cre^{ERT2} (lignée avec l'insertion du gène, *Knock-in* = KI) codant pour l'enzyme Cre-recombinase inductible par le contrôle du promoteur SM22, données par le Dr. Zenlin Li (CNRS UMR_8256, Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, France). Les contrôles de cette étude ont été les souris $\alpha_v^{+/+}$, $\alpha_v^{flox/+}$ et $\alpha_v^{flox/flox}$, tandis que les souris $\alpha_v^{flox/flox}$ $Cre^{SMKI/+}$ et $\alpha_v^{flox/flox}$ $Cre^{SMKI/SMKI}$ étant considérées comme double *Knock-out* (KO ou α_v^{SMKO}). L'induction de la délétion de l'intégrine a été réalisée pour les souris âgées de deux mois par injection consécutive de tamoxifène (10 mg/mL dilué dans de l'huile d'arachide) par voie intrapéritonéale durant trois jours : pour une souris de 25 g, Jour 1 – Injection de 200 µL/souris, Jour 2 et 3 – Injection de 100 µL/souris (**Figure 14**)

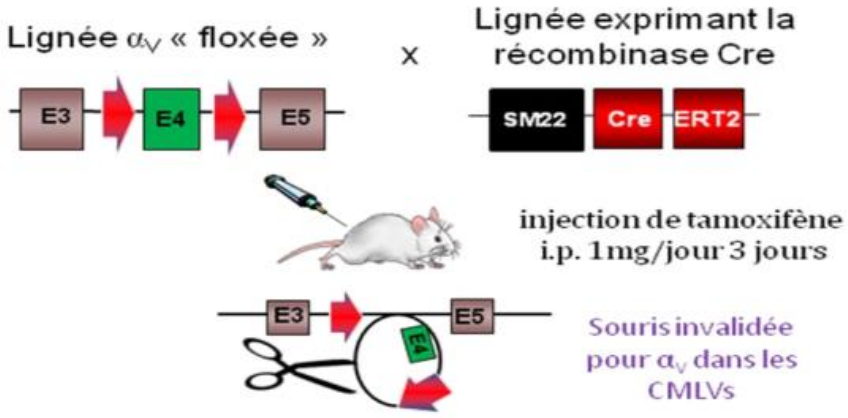


Figure 14 : Invalidation de la sous unité α_v des intégrines dans les CMLVs chez la souris.

Des souris mâles et femelles adultes ont été utilisées dans cette étude après un génotypage par PCR. Les mesures hémodynamiques de la pression artérielle ont été réalisées par pléthysmographie, les mesures de rigidité et des propriétés élastiques par échotracking de l'artère carotide, la vasoréactivité par un myographe de Mulvany.

2) Conditions expérimentales

Les souris ont été hébergées selon les normes d'élevage en vigueur et en accord avec les recommandations européenne (directive 2010/63/UE, arrêté du 01/02/2013) et le CELMEA (Comité d'Ethique Lorrain en Matière d'Expérimentation Animale - n°66). La température était comprise entre 20 et 22 °C et l'humidité entre 55 et 65% avec des cycles jour-nuit de 12 heures et une alimentation standard avec de l'eau à volonté.

3) Protocole expérimental de fibrose vasculaire par Angiotensine

À la suite de l'injection de tamoxifène et l'invalidation de l'intégrine α_v, les animaux ont été anesthésiés par inhalation d'isoflurane volatile à 3-3,5% sous débit d'oxygène 1,5 L/min. Les souris ont été traitées par de l'Angiotensine II (Ang II) afin d'induire une augmentation de la pression artérielle et une fibrose vasculaire. Une mini-pompe osmotique placée en sous-cutané a été implantée afin de diffuser l'Ang II durant 28

jours. Deux groupes expérimentaux ont été constitués, l'un contenant des souris sauvages (dites *wild type*, WT) et α_v^{SMKO} qui ont reçu respectivement une faible dose d'Ang II (0,3 mg/kg/jour) et l'autre une forte dose d'Ang II (1,5 mg/kg/jour). Un groupe contrôle a été réalisé avec une opération sans pose de mini-pompe (**Figure 15**).

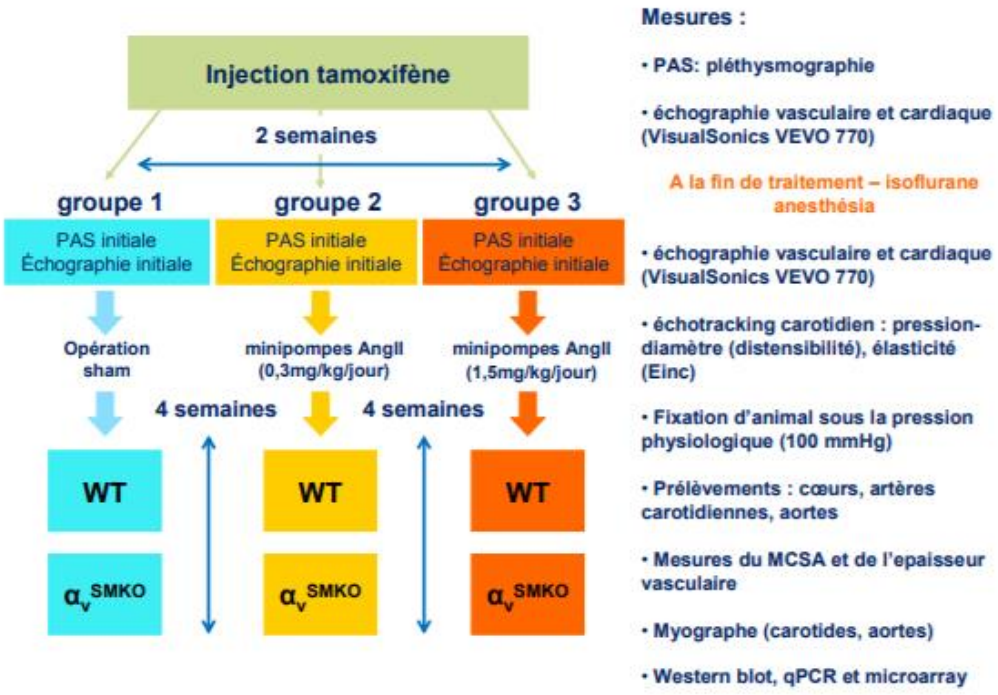


Figure 15 : Protocole animal expérimental.

Protocole expérimentale allant de l'injection du tamoxifène aux prélèvements des organes. PAS = Pression artérielle systolique, MCSA = Surface de coupe transversale médiale - media cross-sectional area.

4) Mesure de la pression artérielle

La pléthysmographie permet d'acquérir des mesures hémodynamiques *in vivo* chez l'animal conscient en mesurant les déplacements de volume. Les animaux ont été préalablement placés dans un compartiment de contention chauffant (Hatteras Instruments, Blood Pressure Analysis System, model SC-1000) afin d'augmenter la vasodilatation des artères périphériques. La pression est mesurée sur l'artère caudale

de l'animal, la queue est placée dans un manchon gonflable comprimant l'artère. Lorsque la pression exercée par le manchot est à l'équilibre avec la pression systolique de l'artère caudale cette dernière est comprimée afin de bloquer l'afflux sanguin. Cet arrêt est détecté par un capteur photoélectrique et analysé par l'enregistreur comme étant la valeur *in vivo* de la pression systolique à l'aide du logiciel SC 1000 BP analysis system (Hatteras Instruments, Inc. NC, USA) (**Figure 16**).

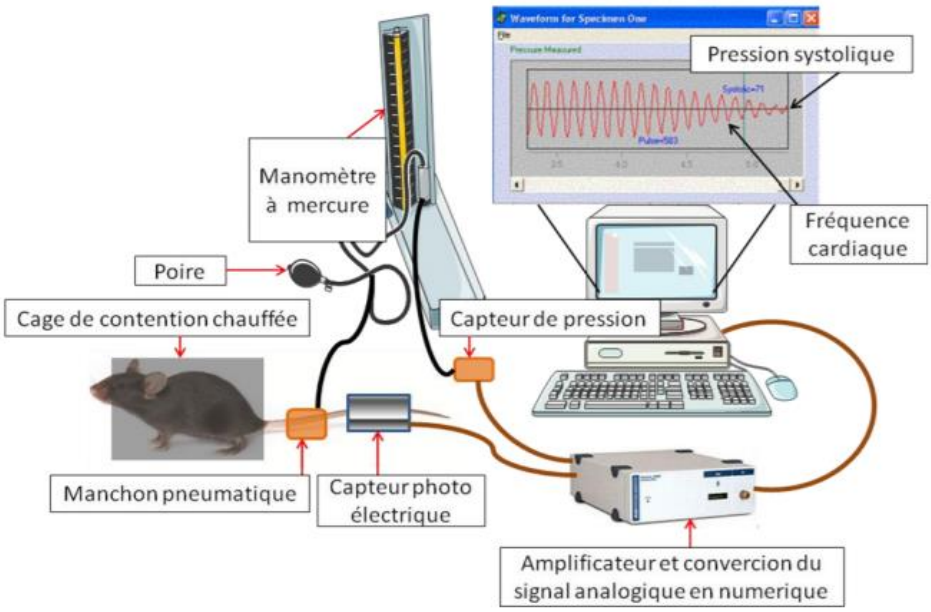


Figure 16 : Représentation schématique de la mesure de pression de l'artère caudale dites méthode "tail-cuff".

Chaque animal est acclimaté durant 2 à 3 jours à ce protocole, les acquisitions obtenues à la suite de ces entrainements sont reproductibles et utilisées pour l'analyse. Les mesures ont été effectuées avant l'implantation des minipompes puis 26 à 28 jours après le début du traitement.

5) Mesures hémodynamiques *in vivo*

a) Préparation

Les animaux ont été anesthésiés selon le protocole précédemment décrit. Un cathéter de polyéthylène de 2 cm (PE-5, BioSeb, France) a été introduit dans l'artère carotide gauche et l'artère carotide droite a été enduite de gel de contact. Le cathéter était relié à un capteur de pression (P23XL, Becton Dickinson) rempli de sérum physiologique hépariné (50 UI/mL).

b) Acquisition des mesures de pression

L'acquisition des mesures de pressions systoliques (PAS) et diastolique (PAD) a été effectuée avec un système d'enregistrement Ponemah P3Plus 4.9. La pression pulsée (PP), correspondant à la différence entre PAS et PAD, et la pression artérielle moyenne (PAM) correspondant à : PAD+PP/3 étaient calculées.

c) Echotracking de l'artère carotide

Les paramètres mesurés correspondent à des variations de pression et de diamètre artérielle durant le cycle cardiaque. Ces techniques ont déjà été utilisées précédemment chez la souris au laboratoire (P. Lacolley et al. 2001) (Louis et al. 2007). La variation systolique et diastolique du diamètre carotidien est mesurée *in vivo* par des ultrasons dérivés de l'échographie, et cela est complété par une méthode de poursuite d'échos (*échotracking*).

L'onde ultrasonique est placée sur l'artère carotidienne primitive droite, permettant ainsi l'enregistrement des échos vibratoires des parois internes et externes de l'artère. La visualisation est effectuée sur un écran oscilloscopique (Philips PM 3057). Le diamètre et la surface de la lumière artérielle sont déterminés en mesurant les distances entre les interfaces acoustiques « sang-paroi artérielle » durant le cycle cardiaque. Les mesures sont acquises durant 3 cycles successifs de 4 secondes. A

l'aide de ces deux mesures, une courbe pression-diamètre est reconstituée dans l'intervalle de pression systolo-diastolique selon une fonction arc-tangente décrite par trois paramètres indépendants α, β, γ.

Le calcul des paramètres mécaniques s'effectue comme suit :

- Les modifications de la lumière artérielle en fonction de la pression artérielle (courbe pression-diamètre) sont calculées à partir de ces trois paramètres α, β, γ selon le modèle décrit par Langewouters (Tardy et al. 1991) :

$$LCSA = \alpha [\pi/2 + \tan\text{-}1 (P-\beta)/\gamma]$$

ou LCSA (Lumen Cross Sectional Area) correspond à la surface sectionnelle de la lumière artérielle et P la pression.

- La distensibilité est le rapport de la compliance circonférentielle à la surface de la lumière :

$$\text{Distensibilité} = (1/LCSA) \times (\delta LCSA/\delta P)$$

- Le module élastique incrémentiel (Einc) permet d'évaluer les propriétés mécaniques intrinsèques du matériau constituant la paroi, indépendamment de la géométrie de l'artère :

$$Einc = 3/ \text{Distensibilité} \times (1 + LCSA\text{-}MCSA)$$

ou la MCSA (Media Cross Sectional Area) représente la surface sectionnelle de la média. Les mesures de MCSA nécessaires au calcul du module élastique sont déterminées *in vitro* par méthode histomorphométrique après fixation au formol. La surface de la lumière artérielle ainsi que la distensibilité sont calculées *in vivo* à la PAM.

- L'élasticité du matériau est évaluée à partir des courbes reliant la contrainte circonférentielle subie par l'artère au Einc. La contrainte circonférentielle WS (Wall Stress) témoigne de l'impact de la pression sur la paroi du vaisseau. Elle

se calcule à partir des valeurs de LCSA et de MCSA pour différents niveaux de pression artérielle :

$$WS = (2\ LCSA \times P) / MCSA$$

6) Culture cellulaire

Les CMLVs humaines issues d'aortes de donneurs (CC-2571, Lonza) ont été cultivées dans du milieu SmBM™ Basal Médium (CC-3181, Lonza) complété avec un kit SmGM-2™ Smooth Muscle SingleQuots™ (CC-4149, Lonza) composé d'insuline, de facteur de croissance pour fibroblaste humain, de gentamicine, d'amphotéricine, de sérum fœtal bovin et de facteur de croissance épidermique. Les cellules ont été utilisées pour toutes les expérimentations entre les passages 5 et 8. Le milieu de culture des cellules était renouvelé trois fois par semaine et les cellules étaient cultivées dans un incubateur à 37°C avec un taux de CO_2 de 5%.

7) Plaques de culture cellulaire à rigidité variable

Afin de réaliser les images dynamiques en collaboration avec le laboratoire CNRS UMR-7021 des gels de polyacrylamide devaient être élaborés sur des lamelles de 18 mm.

Les lamelles rectangulaires (C9802, Merck) étaient déposées dans une boite recouverte de parafilm sous hotte chimique aspirante, juxtaposé aux lamelles, à l'intérieur de la boite était déposé un récipient avec 1 mL de surfasil 10% (42800, Pierce) dilué dans du chloroforme durant 15 minutes. Les lamelles rondes de 18 mm de diamètre (50-948-975, Thermo Fischer Scientific) étaient déposées dans une boite recouverte de parafilm. 200 µL de NaOH étaient déposés sur chaque lamelle pendant 5 minutes puis aspirés, ensuite 100 µL de 3-aminopropyltrimethoxysilane (3-APTMS) (28-1778, Sigma) étaient déposés sur chaque lamelle pendant 5 minutes puis aspirés. Trois rinçages successifs avec 200 µL d'eau MiliQ étaient réalisés. Ensuite, 200 µL de

Glutaraldéhyde 0.5% étaient déposés pendant 20 minutes puis aspirés et rincés à l'eau MiliQ.

Les différentes concentrations et quantités d'acrylamide 30% (A3574, Sigma-Aldrich) et de bis acrylamide 1% (294381, Sigma-Aldrich) étaient calculées en fonction du module de Young voulu d'après les travaux présentés en Annexe 1 (Yeung et al. 2005). Les deux solutions étaient transférées dans un erlenmeyer à vide et dégazées durant 10 minutes. La polymérisation était lancée en ajoutant dans un tube 2,5 µL d'ammonium persulfate dilué à 10%, 0,75 µL de tétraméthyléthylènediamine (17919, Termofisher) et la solution d'acrylamide/bis acrylamide et l'HEPES (ph de 8) afin d'arriver à un volume final de 500 µL. Ensuite, 30 µL étaient immédiatement prélevés et déposés au centre de chaque lamelle ronde, celles-ci étaient recouvertes avec les lamelles rectangulaires et incubées 10 minutes à 37°C pour polymériser. Les deux lamelles étaient ensuite séparées et le gel polymérisé sur la lamelle ronde était rincé dans 3 mL de tampon phosphate salin (PBS). Sous hotte stérile, les gels étaient transférés dans une plaque 6 puits et recouverts de 200 µL de sulfosuccinimidyl6(4'-azido-2'-nitrophenyl-amino) hexanoate (Sulfo-SANPAH, 1mg/mL, 22589, Pierce) afin de permettre la liaison chimique entre le gel et le fibronectine. La plaque était placée sous une lampe UV à 365 nm durant 20 minutes. Le surplus de solution de sulfo-SANPAH est rincé et les gels à nouveau placés sous une lampe UV à 365 nm durant 20 minutes.

La plaque était rincée jusqu'à disparition de la coloration orange. Sur chaque lamelle 200 µL de fibronectine (0.1 mg/mL) (C-43060, Promocell) étaient déposés et incubés pendant 15 minutes à 37°C. L'ensemencement était réalisé avec 60 000 cellules par puit.

8) Immunofluorescence

a) Double marquage

Après détachement des puits des plaques commercialisées, les cellules ont été placées sur des lamelles en verre borosilicaté puis fixées au paraformaldéhyde durant 10 minutes à température ambiante. Chaque lame est ensuite rincée 3 fois au PBS-Tween (PBS contenant 0,5% de Tween 20, PBST) puis incubée 30 minutes avec du PBST-Triton (PBST contenant 0,5% de Triton, PBST-T) avant 3 nouveaux rinçages. Les liaisons non spécifiques ont été bloquées avec une solution de PBS-T contenant 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) durant 30 minutes puis les lames ont été rincées. Ces dernières ont été incubées durant 1 heure avec l'anticorps primaire (**Tableau 2**) dilué dans une solution de PBS-T BSA à 1% puis rincées au PBST. Elles ont ensuite été incubées durant 2 heures à l'obscurité avec un anticorps secondaire conjugué avec un fluorochrome Alexa Fluor® 555 ou Alexa Fluor® 488 (anti-mouse A21127, anti-rabbit A21206, Invitrogen). Après 3 rinçages au PBST, les noyaux ont été marqués au DRAQ5 dilué au 1000ème dans du PBS (62251, Thermo Scientific). Enfin, après rinçage les lames ont été montées avec un milieu de montage (F46680, Sigma). Des contrôles négatifs ont également été réalisés et correspondent à des échantillons où les anticorps primaires n'ont pas été déposés.

b) Colocalisation

Les CMLVs ont été ensemencées dans des chambres de culture sur lame séparable avec 7500 cellules par cuves et incubées en présence ou en absence de VWF (purifié à partir de Wilfactin (LFB-Biomédicaments)). Le marquage pour observer la colocalisation de deux protéines reprend le même protocole que celui détaillé dans la partie III.1. avec les anticorps primaires (anti-LRP4, MAB5928 Biotechne ; anti-VWF polyclonal, A0082 Dako et anti-VWF monoclonal synthétisé et fourni par le laboratoire Hémostase Inflammation Thrombose, INSERM UMR S1176 de Paris) qui ont été

incubés deux à deux dans le même temps durant 2 heures à température ambiante. Après rinçage, une sonde Duolink® (Duolink®-Proximity Ligation Assay (Duolink®-PLA) In Situ kit) a été ajoutée et incubée durant 30 minutes à 37°C. Après 3 rinçages au PBST, les noyaux ont été marqués au DRAQ5 dilué au 1000ème dans du PBS (62251, Thermo Scientific). Enfin les lames ont été rincées 3 fois au PBST et montées avec un milieu de montage (F46680, Sigma). Des contrôles négatifs ont également été réalisés et correspondent à des échantillons où les anticorps primaires n'ont pas été déposés.

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence.

Antigènes	Références	Dilution
FAK total	AHO0502 Thermofisher	200ème
FAK phosphorylé	Sc-374668 SantaCruz	200ème
Intégrine $\alpha_v\beta_3$	BS-1310R BiossAntibodies	200ème
Taline	MA5-28133 Invitrogen	200ème
Vinculine	700062 Invitrogen	300ème
α-Actine	PA5-17308 Invitrogen	300ème
LRP4	MAB5948 Bio-Techne	200ème
Facteur von Willebrand	A0082 Dako	300ème

9) Imagerie et analyse

a. Acquisition

Les images ont été acquises avec un microscope confocal Supercontinuum Leica TCS SP5 X à l'aide d'un objectif 40x à immersion à eau et d'un objectif 100x à immersion à huile. Le mode séquentiel a permis l'acquisition des images sur trois canaux différentiellement (488, 555 et 633 nm) en explorant verticalement de l'extrémité haute à l'extrémité basse l'échantillon en z-stack (avec un pas de 1 µm). La platine motorisée permettait l'acquisition automatique des différentes images avec un repositionnement

précis. Les images ont été acquises par balayage avec 4096 niveaux de gris (12 bits) et une résolution de 1024 x 1024 pixels et enregistrées en fichier Tagged image file format (TIFF).

b. Quantification

Les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ version 1.8.0_172. Les stacks ont été importés dans le logiciel. Un seuil unique pour l'entièreté des images a été défini afin d'éliminer le bruit de fond. Chaque cellule a été détourée individuellement et la région d'intérêt (ROI) a été sauvegardée *via* l'outil ROI Manager pour être transposée sur chaque stack. Après sélection des ROI l'outil *Measure* avec les options *Area* et *Mean grey value* active dans *Set Measurements* permettait d'obtenir l'intensité moyenne de la ROI sélectionnée et l'aire de cette dernière. Les intensités des cellules par stack selon les différentes conditions ont été calculées selon la formule :

Intensité moyenne de la cellule : Intensité moyenne / Aire de la ROI

Les différentes intensités par cellule ont été moyennées sur l'ensemble des stacks.

c. Mesure de colocalisation

Les images ont été analysées comme décrit précédemment, le plugin *colocalization finder* a permis de sélectionner les deux images avec les deux marquages à analyser et le nuage de points afin d'éliminer le bruit de fond et de calculer le coefficient de Pearson basé sur l'intensité moyenne des pixels. Les résultats d'un coefficient de Pearson sont compris entre -1 et 1, les résultats proches de 0 indiquent qu'aucune corrélation n'est mesurée entre la localisation des pixels, et les résultats proches de -1 et 1 indiquent une forte corrélation négative ou positive entre la localisation des pixels. Les coefficients de Pearson ont été calculés pour chaque cellule et stack et une moyenne a été réalisée pour la totalité des stacks.

10) Microscopie à force atomique

Au moment des expérimentations avec le microscope à force atomique nous ne possédions pas au laboratoire les techniques de synthèse de gel de rigidité variable décrites précédemment. Nous avons utilisé des plaques 24 puits avec des gels de polyacrylamide de rigidité déterminée (Matrigen™ softwell, 7500 cellules par puit) contenant les cellules vivantes, le verre des puits était détaché des plaques par pression et immergé dans un milieu sans phénol. Les mesures de module élastique ont été réalisées à température ambiante à l'aide d'un microscope à force atomique MFP3D-BIO (Asylum Research Technology, Oxford Instruments, Mannheim, Allemagne). Les mesures ont été acquises en mode « Force Map » en milieu aqueux à une fréquence de 1 Hz. La force maximale appliquée par la pointe sur l'échantillon variait de 1,75 à 2 nN afin d'éviter des dommages sur les cellules. La calibration des leviers a été réalisée à partir du calcul de la pente des courbes force - distance mesurées sur une référence en verre (déflexion du levier par rapport au déplacement du scanner piézo-électrique). Le module d'Young a été obtenu en ajustant les calculs théoriques de la force appliquée en fonction de l'indentation (c'est-à-dire de la déformation ou de la profondeur de pénétration du levier dans la cellule) en utilisant le modèle de Hertz pour une géométrie conique de l'indenteur :

$$F = \{2 E \tan\alpha / [\pi (1 - \nu 2)]\} \cdot \delta 2$$

où F est la force, δ est la profondeur d'indentation, E est le module d'Young, ν est le coefficient de Poisson et α est le demi-angle au sommet de la sonde AFM.

Un algorithme développé au LCPME par Polyakov et al. (LCPME, UMR 7564, Vandoeuvre les Nancy) a été utilisé afin de calculer le module de Young courbe par courbe et ainsi de générer une cartographie des propriétés mécaniques pour plusieurs

groupes de cellules. Une moyenne des mesures réalisée sur au moins 5 cellules a été effectuée pour obtenir la rigidité globale par condition.

11) Suivi de la génération de thrombine par thrombinographie

a. Expérimentation

La thrombinographie permet de suivre la cinétique de la génération de thrombine en plasma pauvre ou riche en plaquettes et également à la surface des CMLVs adhérentes en culture. Un substrat fluorigène permet le suivi de l'activité de la thrombine. Un fluorimètre (Fluoroskan Ascent, Labsystems) permet d'acquérir les mesures de fluorescence générées par le clivage du substrat fluorigène. Le logiciel Thrombinoscope BV (Synapse, Maastricht, Pays-Bas) permet ensuite l'analyse des données collectées. Les CMLVs sont préalablement ensemencées sur des plaques 96 puits de rigidité différentes (Softwell, Matrigen) durant 24 heures à une densité de 7500 cellules par puit. Des lavages successifs de PBS et d'HBS (HEPES (N-[2-hydroxyethyl] pipérazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) 20 mM, NaCl 140 mM et de l'albumine de sérum bovin (BSA, Sigma re. A-3912) à 5 g/L) permettent d'éliminer le milieu de culture. Le volume final dans chaque puit est de 100 µL avec 20 µL d'HBS et 80 µL de plasma pauvre en plaquette. Un mélange de substrat fluorigène et de $CaCl_2$ est ajouté dans chaque puit par l'appareil. Un calibrant composé d'un complexe d'α_2-macroglobuline/thrombine humaine avec de l'antithrombine bovine 100 nM et de l'héparine à 2 U/mL est ajouté dans deux puits avec du plasma. Ce calibrant permettait de calculer la quantité de thrombine générée (en molalité). Chacune des conditions expérimentales a été réalisée en triplicata.

b. Paramètres des courbes de génération de thrombine

La cinétique de génération de thrombine se compose de 3 phases, l'initiation, la propagation et enfin la terminaison. Les paramètres suivants sont mesurés ou calculés par le logiciel :

- Le temps de latence avant la phase de génération de thrombine (temps de la phase d'initiation en minutes)
- Le pic correspondant à la quantité maximale de thrombine générée (en nM)
- Le temps nécessaire à atteindre la quantité maximale de thrombine (en minutes)
- La vitesse pour éteindre le pic (pente maximale de génération de thrombine en nM/min)
- Le potentiel endogène de thrombine (Endogenous Thrombin Potential, ETP en nM.min) représenté par l'intégration de l'aire sous la courbe. Ce paramètre correspond à la quantité totale de l'activité enzymatique que la thrombine est capable de réaliser.

Le temps de latence, le pic et le temps pour atteindre ce pic sont les 3 paramètres mesurés (**Figure 17**), le potentiel endogène et la vélocité sont calculés par le logiciel d'analyse.

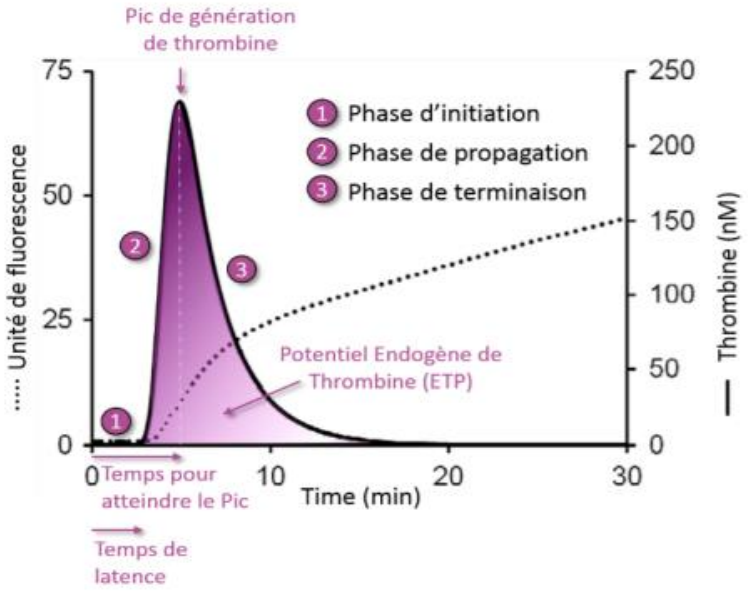


Figure 17 : Schéma des paramètres mesurés et calculés lors de la génération de thrombine.

c. Peptide RGT et génération de thrombine

Le peptide RGT myristoylé (myr-Arg-Gly-Thr, GL Biochem, Shangai, Chine) correspond à la partie carboxy-terminale cytoplasmique de la sous unité β_3. Sa fixation compétitive empêche la fixation de Src à la sous unité et bloque la signalisation de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur. Le peptide est préalablement reconstitué dans du Diméthylsulfoxyde (DMSO) puis dilué dans un tampon HBS avec du calcium à 1 M. Les cellules ont été ensemencées dans les plaques comme décrit et les cellules ont été incubées 30 minutes à 37°C (avec une concentration finale de 2,5 nM) avant le lancement de la génération de thrombine.

12) Imagerie dynamique par transfection

a) Transfection

Le plasmide dont la séquence est présentée en **Annexe 2** permettant la transfection de FAK-GFP (Green fluorescent protein) nous a été fournis par l'équipe de Philippe Rondé (du Laboratoire Signalisation tumorale et cibles thérapeutiques UMR 7021 d'Illkirch Graffenstaden). La transfection à l'aide de lipofectamine 3000™ (15282456, Invitrogen) a été expérimentée suivant des concentrations de lipofectamine, d'Opti-MEM (31985062, ThermoFisher Scientific) et de plasmides différentes, cependant les cellules présentaient des vacuoles importantes, des formes et des tailles démontrant une souffrance cellulaire. La stratégie d'infection par un vecteur viral a été choisie.

Avant que les CMLVs soient ensemencées sur les gels manufacturés au laboratoire selon le protocole décrit précédemment les cellules ont été transfectés par un adénovirus dilué (par une dilution en cascade) à 0.05 µL/mL en milieu de culture cellulaire, la transfection est visible au microscope à 488 nm (filtre FITC, fluorescéine isothiocyanate-5) à fluorescence 24 h après la transfection jusqu'à 48 heure. La concentration de 0.05 µL/mL permet aux cellules d'être viables en diminuant les vacuoles et la toxicité cellulaire.

b) Acquisition d'image sur cellules vivantes

Les lamelles de 18 mm de diamètre ont été transférées sous hotte stérile d'une plaque 6 puits à une chambre de Ludin (Life Imaging Services). Chaque lamelle a été fixée entre une base en acier et un couvercle composé d'un joint d'étanchéité permettant le recouvrement de la lamelle par du milieu de culture (**Figure 18**). La chambre de Ludin avec la lamelle et le milieu de culture a été placée dans une enceinte close contenant le microscope, à 37°C avec 5% de CO_2. Le microscope iMIC (Till Photonics, Munich, Allemagne) multimodal est couplé à une source lumineuse SpectraX (Lumencor, Etats

Unis) un laser Cobolt Dual Calypso 491/532 nm (Solna, Suède) avec un objectif Olympus (Rungis, France) 60×. Les cellules ont été sélectionnées par fluorescence, les images ont été acquises toutes les 3 minutes par *z-stack* (pas de 2 µm) durant 2 heures sur une caméra sCMOS Flash 4 V2+ (Hamamatsu, Japan)

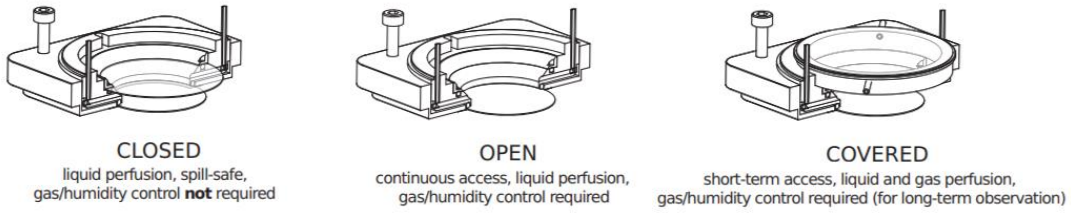


Figure 18 : 3 configurations de la chambre de Ludin, d'après Life Imaging Services - Technical data.

c) Analyse d'images

Les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ Software. La sélection de la meilleure image issue des z-stacks tenant compte de la dérive induite par les mouvements de la caméra a été effectuée par un algorithme automatisé. Après avoir défini un seuil permettant de supprimer le bruit de fond les AFs ont été comptées et mesurées *via* l'outil *« analyze particles »* en définissant une taille minimum de pixel. Le pourcentage de stabilité des AF a été calculé comme le nombre d'AFs sur une image à 0 minute par rapport à l'image à 60 minutes.

13) Statistiques

L'ensemble des résultats est exprimé en moyenne ± SEM (erreur standard à la moyenne), les comparaisons multiples ont été réalisées par des tests en Anova à 1 facteur et de Kruskal-Wallis. Les différences sont jugées significatives lorsque la puissance du test p est inférieure à 0,05. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graphpad Prism 7.0.

V. Résultats :

1) Rigidité cellulaire, adhérences focales et leurs acteurs

a) Rigidité cellulaire en fonction de la rigidité matricielle

Les capacités migratoires et prolifératives des CMLVs soumises à l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sont connues. Ces fonctions peuvent cependant être modulées dans des contextes physiopathologiques en particulier liée à la présence d'une rigidité tissulaire. Nous avons ainsi dans un premier temps cherché à savoir si des variations de rigidité du substrat de la CMLV entrainaient une réponse adaptative et affectait en particulier sa rigidité.

Nous avons mesuré la rigidité des CMLVs humaines cultivées sur des matrices de rigidités différentes.

Le contrôle a été réalisé sur du verre recouvert de fibronectine. Le verre possède un module de Young élevé de l'ordre de plusieurs Gpa (Giga Pascal), son extrême rigidité est utilisée usuellement comme un contrôle positif.

Les matrices utilisées étaient celles fournies par Matrigen™, nous avons dans un premier temps caractérisé leur rigidité intrinsèque par AFM. Les gels de 0,5 et 50 kPa correspondent à des rigidités extrêmes dans le spectre des rigidités de la MEC. En effet une rigidité de 0,5 kPa correspond à la rigidité de la MEC au contact des cellules gliales du cerveau et 50 kPa correspond au module de Young d'une MEC en soutient des cardiomyocytes du myocarde.

Les cellules ont été sélectionnés suivant leur forme et leur attachement à la matrice extracellulaire. Les cellules aillant une forme indiquant une souffrance cellulaire ou un aspect non conventionnel étaient écartées. Le nombre n correspond à 7200 mesures des courbes de force générées par le levier de l'AFM sur chaque cellule. La technique

de « *pick-force* » piloté par le microscope à force atomique permet d'acquérir une cartographie mécanique du module de Young en tous points de la cellule (**Figure 19**).

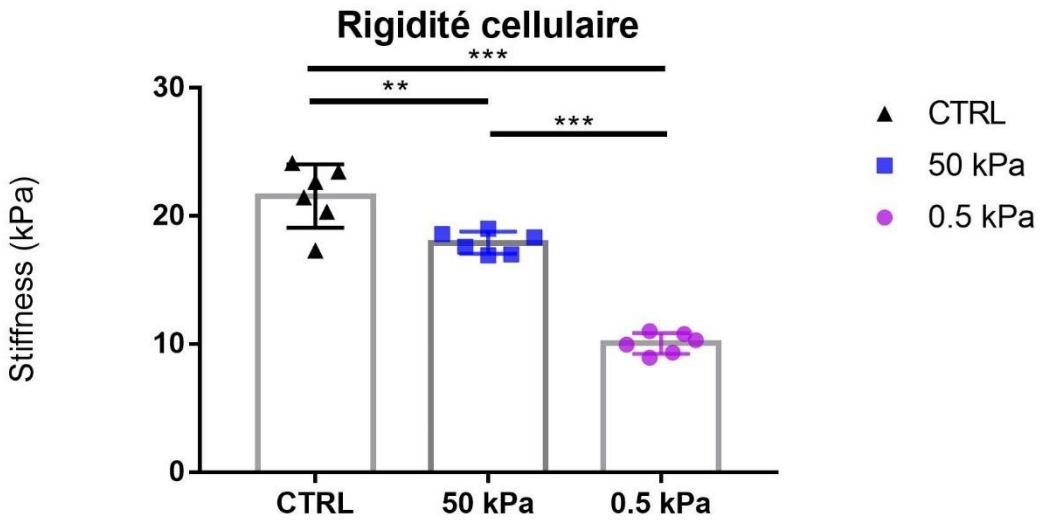


Figure 19 : Rigidité des CMLVs en fonction de gel de rigidité croissante.

*Le contrôle correspondant à du verre recouvert de fibronectine (CTRL = contrôle) d'une rigidité de plusieurs Gpa N = 6 cellules n = 7200 mesures, ** = P<0 .005 *** = p<0,0005%.*

Une augmentation de la rigidité de la matrice entraine une augmentation de la rigidité de la cellule. Lorsque les cellules sont cultivées sur une surface en verre leur rigidité est de 21,5 ± 1,0 kPa. Préalablement nous avons vérifié par AFM que le recouvrement de la fibronectine ne modifiait pas la rigidité du support, en effet celui-ci n'est épais que de quelques nanomètres. Le groupe de CMLVs contrôle est significativement différent du groupe de CMLVs cultivées sur du gel de 0,5 kPa (qui ont une rigidité de 10,1 ± 0,3 kPa) et du groupe sur gel de 50 kPa (qui ont une rigidité de 17,9 kPa ± 0,3 kPa).

b) Quantification des protéines des adhérences focales en fonction de la rigidité de la MEC :

Compte tenu des résultats précédents il nous a semblé important d'observer si cette augmentation de rigidité cellulaire était corrélée à une augmentation de l'expression des protéines présentes dans les AFs.

Nous avons quantifié par immunofluorescence 4 protéines majeures engagées dans les AFs, en fonction de la rigidité matricielle. Nous avons observé une augmentation de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, de la taline, de l'α-actine (ou α-SMA) et de la vinculine lorsque la rigidité matricielle augmentait. Une matrice possédant un module de Young plus important entraine donc une expression protéique plus importante des protéines des AFs (**Figure 20**).

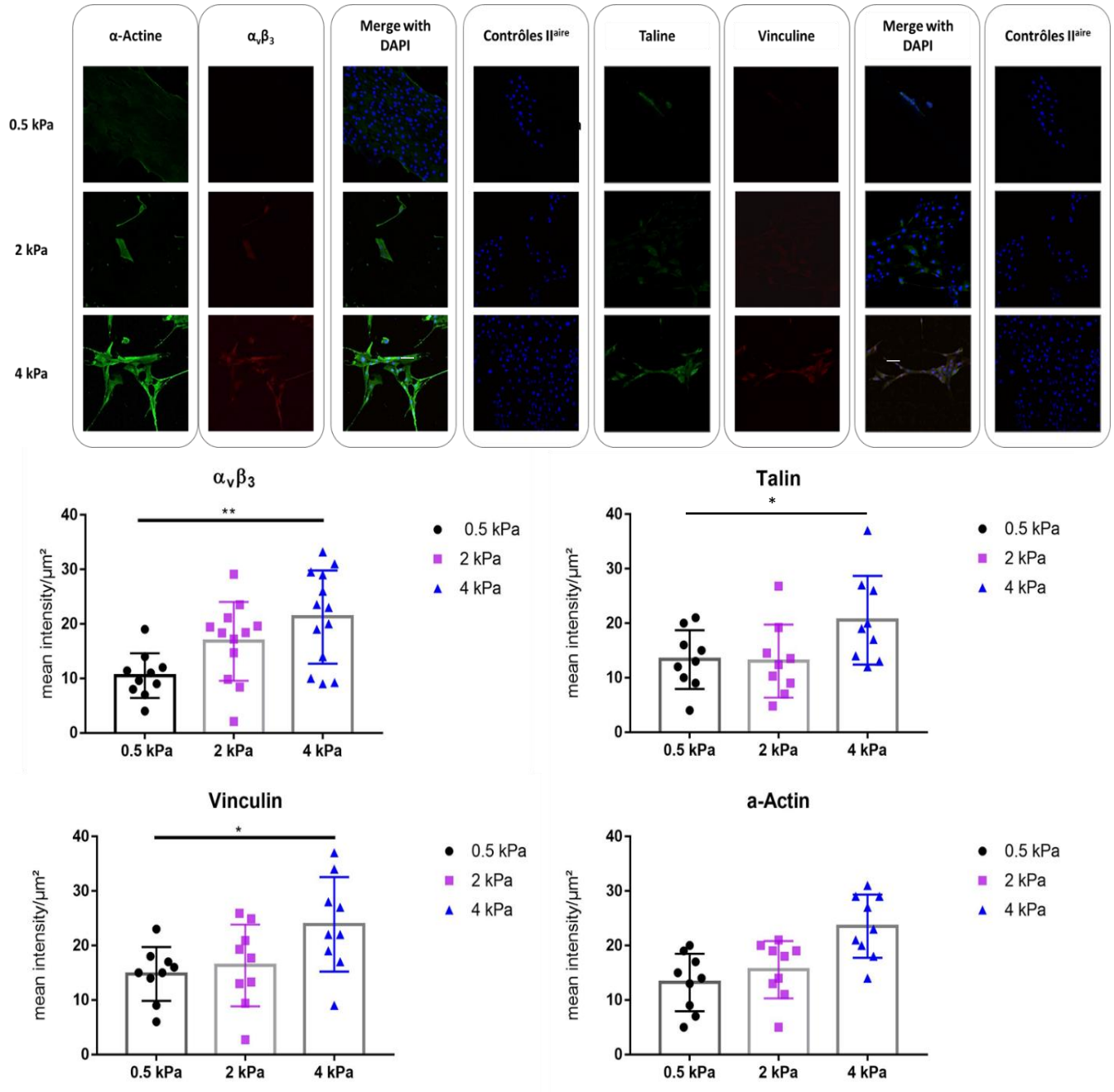


Figure 20 : Images d'immunofluorescence de CMLVs marquées pour l'α-actine, l'intégrine αvβ3, la taline et la vinculine et leurs quantifications.

A : Les images sont présentées avec le marquage seul, le marquage des noyaux cellulaires au DAPI et la superposition des deux images en fonction des rigidités des gels (Echelle = 5 µm pour un grossissement d'objectif X60). B : Quantification par immunofluorescence de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (n=12 p<0,05 vs 0,5 kPa et 4 kPa), de la taline (n = 9, p<0,5 vs 0,5 et 4 kPa), de l'α-actine et de la vinculine (n = 9 p< 0,5 vs 0,5 kPa et 4 kPa) pour des rigidités croissantes de 0,5, 2 et 4 kPa.

Pour les trois groupes 0,5, 2 et 4 kPa les résultats sont présentés en fonction du pourcentage de l'intensité moyenne normalisée par l'aire de la cellule (en µm²). L'intensité moyenne de la fluorescence pour le marquage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est plus importante lorsque la rigidité augmente de 0.5 à 2 et significativement différente entre 0,5 et 4 kPa. Concernant la taline et la vinculine leurs intensités moyennes ne sont pas différentes pour des supports de 0,5 et 2 kPa mais augmentent significativement lorsque les cellules sont cultivées sur des gels de 4 kPa. On observe une augmentation de l'intensité moyenne de l'α-actine (ou α-SMA) en fonction de l'augmentation de la rigidité des gels. Enfin nous avons observé une hausse de l'intensité moyenne pour le marquage de la vinculine, statistiquement différente entre le groupe 0,5 kPa et le groupe 4 kPa.

La phosphorylation de FAK est une étape essentielle à la dynamique des adhérences focales. Nous avons donc mesuré la phosphorylation de FAK lorsque la rigidité matricielle augmentait. Le ratio entre la forme phosphorylée de FAK (P-FAK) et la forme totale nous a permis de mesurer le taux de phosphorylation en fonction de la rigidité de la MEC (**Figure 21**).

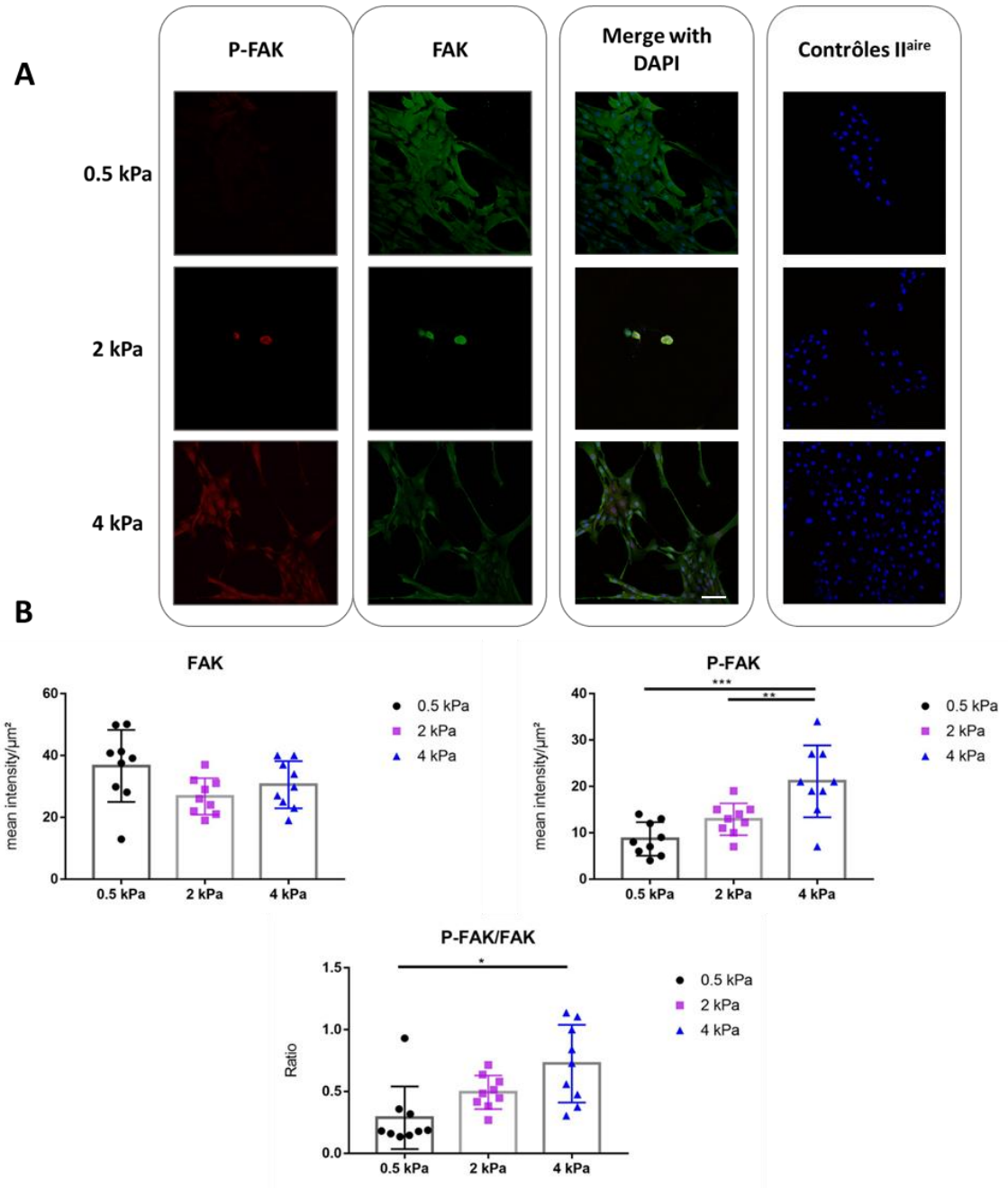


Figure 21 : Images d'immunofluorescence de CMLVs marquées pour FAK totale, FAK phosphorylée, leurs quantifications et leur ratio.

A : Les images sont présentées avec le marquage seul, le marquage des noyaux cellulaires au DAPI et la superposition des deux images en fonction des rigidités des gels (échelle = 5 µm pour un grossissement d'objectif X60). B : Quantification de FAK totale (n = 9) et FAK phosphorylée (P-FAK, n = 9, p< 0,05) ainsi que le rapport des deux en fonction de rigidité de la MEC croissante (n=9, p< 0,5), 0,5 ; 2 et 4 kPa. Mean intensity correspond à l'intensité moyenne de fluorescence par µm².

Nous n'avons pas observé de variation significative de FAK total dans les trois groupes même si FAK total semble être présent en plus grande quantité lorsque la rigidité matricielle est de 0,5 kPa. Des rigidités croissantes de la MEC entrainent une phosphorylation plus importante de FAK dans la cellule. L'intensité moyenne de P-FAK est augmentée pour des rigidités matricielles de 0,5, 2 et 4 kPa avec des différences significatives chaque groupe. La conséquence est que le ratio de la forme phosphorylée sur la forme totale de FAK diffère aussi en fonction des rigidités du milieu. En effet, entre 0,5 et 2 kPa le ratio passe de 0,29 ± 0,08 à 0,49 ± 0,05 et pour une rigidité de 4 kPa le ratio monte à 0,72 ± 0,10. Les différences observées entre les groupes 0,5 kPa et 4 kPa sont significatives.

Les résultats précédents nous renseignant sur l'adaptation cellulaire face à la rigidité matricielle. Nos résultats montrant une augmentation de l'expression protéique des AFs nous ont incité à rechercher si ces AFs subissaient des changements dans leurs tailles et dynamiques lorsque la rigidité variait.

c. Adaptation du protocole de transfection de FAK-GFP aux CMLVs

Le protocole initial rappelé ci-dessous mis au point par l'équipe de Philippe Rondé (CNRS-UMR 7213) permettait la transfection de cellules plus résistantes comme des cellules humaines de mélanome avec un réactif de transfection et un plasmide FAK-GFP.

200 000 cellules étaient déposées par puit d'une plaque 6 puits, un mélange du plasmide FAK-GFP de concentration 2,21 µg/uL et d'Optimen (31985062, Gibco) et un mélange de lipofectamine et d'Optimen comme suit :

4 µg de plasmide par puit.

Solution 1 : FAK-GFP (Concentration de 2,21 µg/µl), 5.43 µl + 375 µl d'Optimen durant 5 minutes à température ambiante.

Solution 2 : Lipofectamine, 5 × 3 = 15,0 µl dans 125 × 3 = 375 µl d'Optimen durant 5 minutes à température ambiante.

Réunir les deux solutions et laisser à température ambiante 20 minutes.

Déposer 250 µl de solution avec plasmide dans chacun des puits.

Cependant ce protocole appliqué aux CMLVs paraissait cytotoxique, avec une importante mortalité cellulaire et des cellules très vacuolisées sans réelle marquage de FAK (**Figure 22**).

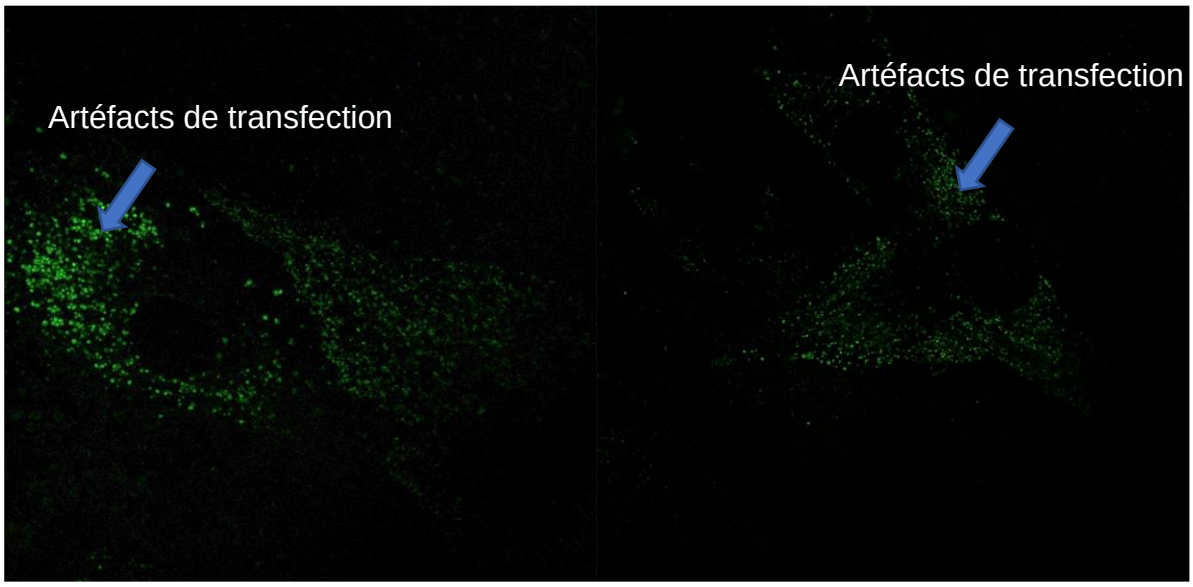


Figure 22 : CMLVs transfectées avec de la lipofectamine.

Les flèches bleues indiquent des artéfacts de transfections dans les cellules avec une absence de marquage de FAK au microscope confocal (X60).

La cytotoxicité des composés utilisés nous a orienté vers l'utilisation d'un adénovirus dont il a fallu mettre au point la quantité nécessaire à une transfection réussie en

minimisant les artéfacts et la toxicité cellulaire. Avec des concentrations d'adénovirus FAK-GFP supérieures à 0,005 µl/L nous observions la présence d'artéfact de transfection et de vacuole (**Figure 23**)

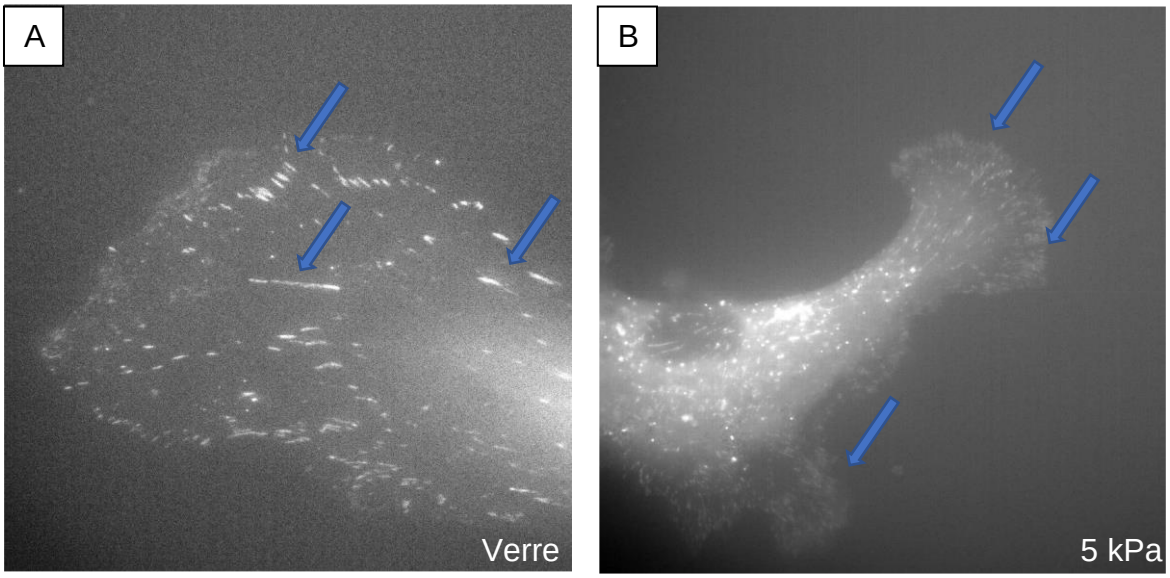


Figure 23 : Transfection de FAK-GFP à l'intérieur des CMLVs.

Sur du verre (A) ou sur un gel de 5 kPa (B). Les flèches bleues représentent FAK-GFP (Microscopie confocale, Objectif X60)

Après l'ajustement du protocole de transfection nous observions des AFs sur deux rigidités différentes, le verre (plusieurs GPa) correspondant à un contrôle positif dans des conditions de rigidité extrême et une gel de 5 kPa correspondant à des conditions physiologiques.

d. Aires des AFs en fonction de la rigidité de la matrice extracellulaire

En mesurant la taille des adhérences focales pour des CMLVs ayant pour support du verre, à 5 et 10 kPa nous avons observé des différences significatives entre les tailles d'AFs (**Figure 24**). Pour les cellules transfectées et ensemencées sur du verre l'aire moyenne des AFs est de 2,54 ±1,1 µm² ce qui est significativement différent des cellules sur les gels de 5 kPa et de 10 kPa (respectivement 1,15±0,63 µm² et 1,31±0,38µm²). Cependant nous n'avons pas observé de différence entre 5 et 10 kPa.

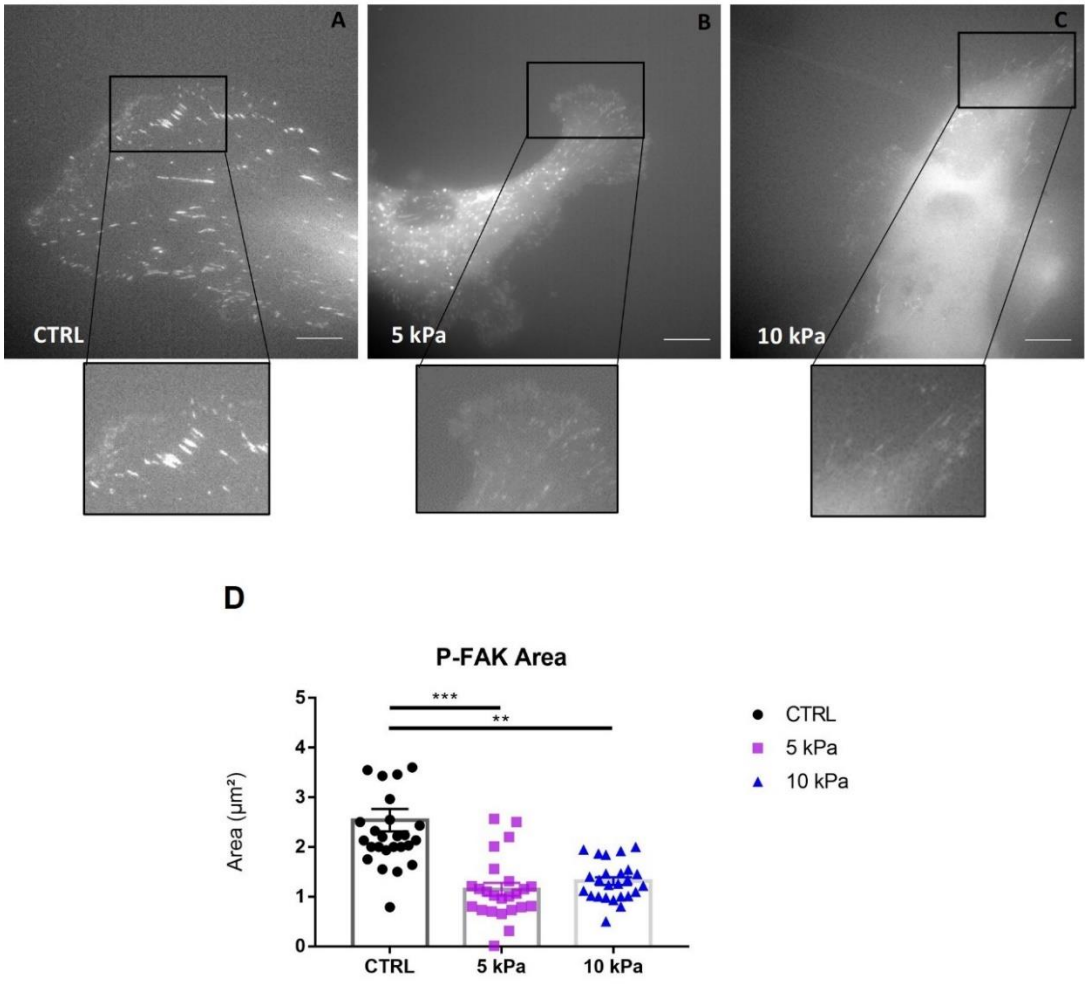


Figure 24 : Aire des adhérences focales en fonction de la rigidité matricielle.

A : Des CMLVs transfectées avec FAK-GFP et ensemencées sur du verre, B : Les CMLVs transfectées ensemencées sur un gel de 5 kPa, C : Les CMLVs transfectées ensemencées sur un gel de 10 kPa. D : l'aire des AFs en fonction du gel (en µm², n = 37 p< 0,05, échelle = 5 µm).

e. Stabilité des adhérences focales en fonction de rigidité matricielle

Une AF étant un processus dynamique nous avons ensuite mesuré la stabilité de celle-ci correspondant à l'assemblage désassemblage des protéines des AFs en fonction des différentes rigidités matricielles (**Figure 25**).

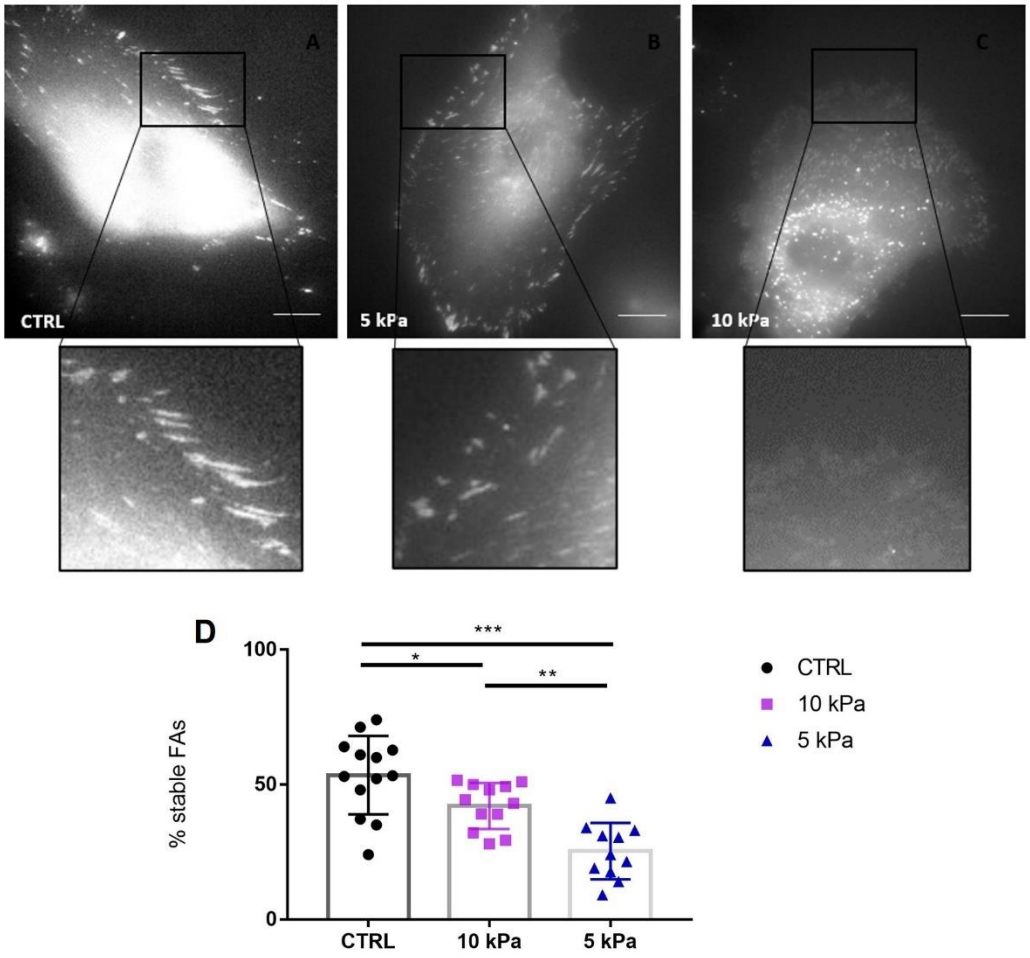


Figure 25 : Images et stabilités des AFs.

Images acquises au microscope confocal (toutes les 3 minutes durant 1 heure, au grossissement d'objectif X60) pour des CMLVs transfectées par un adénovirus marquant FAK. Images en microscopie confocale à T0 de FAK transfecté pour des rigidités décroissantes de la MEC pour le verre (A), 5 kPa (B), 10 kPa (C) entrainent une diminution de la stabilité des adhérences focales (D). Le pourcentage de stabilité des adhérences focales est calculé en dénombrant les adhérences focales à t=60 min comparé à t=0 min. (échelle = 5 µm, 4 cellules analysées).

2) Rôle de la rigidité de la matrice extracellulaire dans la génération de thrombine *via* $\alpha_v\beta_3$

a. Génération de thrombine en fonction de rigidités matricielles variables

Les variations d'expressions protéiques et de dynamique des AFs engagent un nombre important de protéines dont l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la surface des CMLVs. Cette intégrine intervient aussi comme récepteur pour la prothrombine à la surface des CMLVs. Cette intégrine est donc un acteur clé dans les relations entre rigidité et coagulation au sein de la paroi artérielle.

La deuxième partie de nos travaux a été orientée sur l'étude d'un effet fonctionnel possible de la rigidité cellulaire sur la génération de thrombine à la surface des CMLVs. Pour cela les CMLVs ont été cultivées sur des rigidités croissantes et mises en contact avec du plasma normal pour mesurer la génération de thrombine (**Figure 26 et 27**).

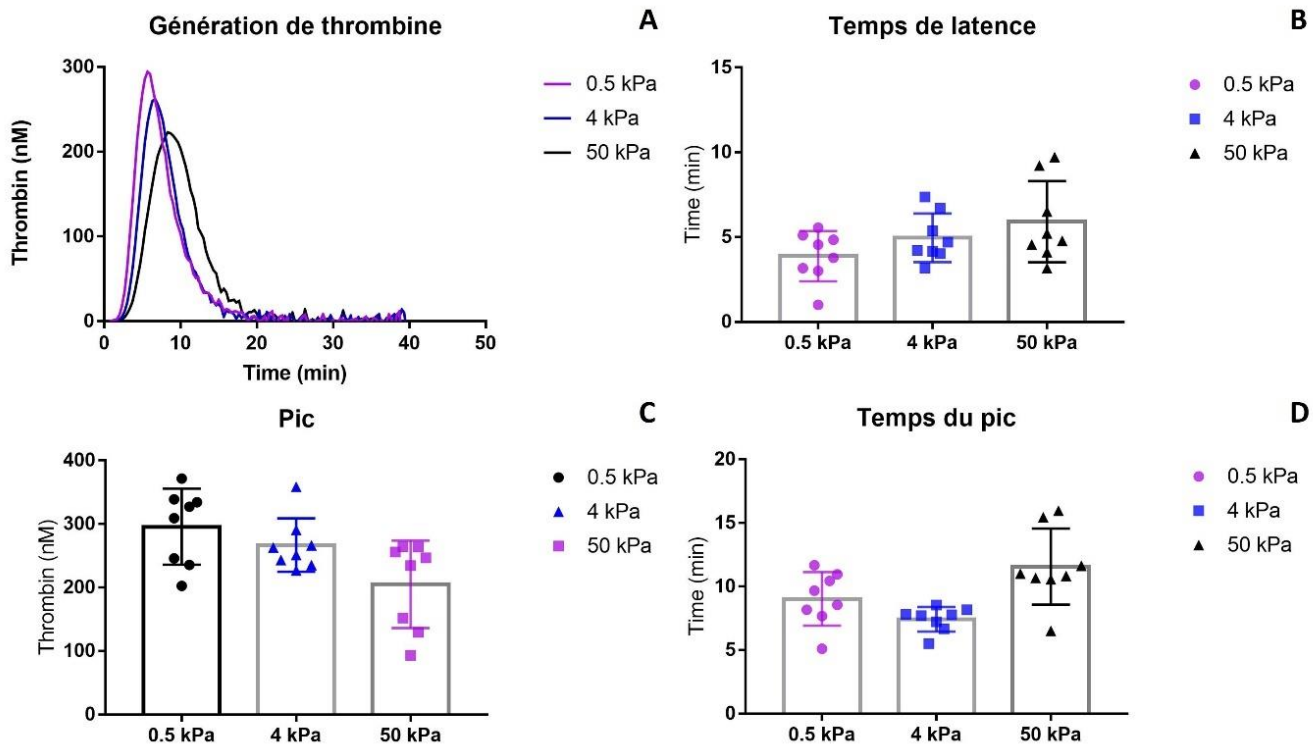


Figure 26 : Génération de thrombine à la surface des CMLVs en fonction de la rigidité matricielle.

A : Courbes typiques de la génération de thrombine pour des rigidités du support différentes. B Temps de latence nécessaire avant la génération explosive de thrombine. C Pic maximum de thrombine atteint. D : Temps nécessaire pour atteindre le pic (n = 9).

Les courbes typiques de génération de thrombine montrent que la génération de thrombine la plus rapide et la plus intense est observée pour la matrice la plus souple. A l'inverse la génération de thrombine la plus lente et la moins intense est observée avec la matrice de 50 kPa. L'analyse des paramètres mesurés montrent que le temps de latence a tendance à augmenter avec l'augmentation de rigidité de la matrice alors que le pic de thrombine a tendance à diminuer. Cette tendance est moins prononcée pour le temps pour atteindre le pic.

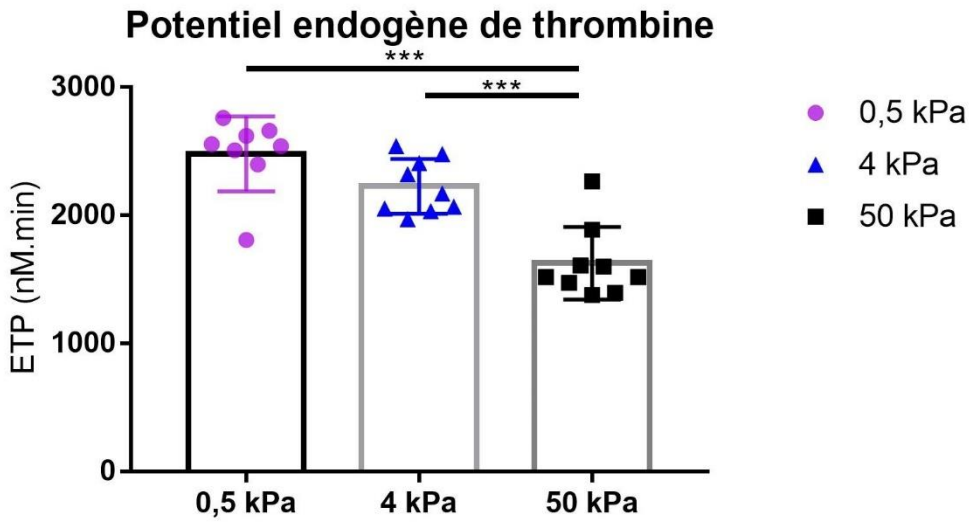


Figure 27 : Potentiel endogène de thrombine à la surface des CMLVs en fonction de la rigidité des gels.

*(n = 9, *** = p < 0,0005).*

Le potentiel endogène de thrombine est modifié en fonction de la rigidité cellulaire des gels sur lesquels sont ensemencés les CMLVs. Lorsque la rigidité est faible, 0,5 kPa, l'ETP est de 2480 ± 103,5 nM.minute cependant lorsque la rigidité matricielle augmente l'ETP diminue entre les différents groupes passant de 2225 ± 71,28 pour le groupe de 4 kPa à 1625 ± 94,29 nM.minute minute. La comparaison des valeurs entre les groupes 0,5 et 50 kPa et entre les groupes 4 et 50 kPa met en évidence des différences significatives. Malgré une tendance à des valeurs moins élevées, les valeurs groupe 4 kPa ne sont pas différentes de celles du groupe 0,5 kPa.

b. Génération de thrombine avec un inhibiteur de β3

Pour étudier le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les variations de génération de thrombine avec la rigidité de la matrice sur laquelle sont cultivées les CMLVs, nous avons inhibé la signalisation de l'intégrine avec le peptide RGT qui se lie à la partie intracellulaire terminale de la sous-unité l'intégrine β_3 et bloque ainsi la liaison avec Src. Les cellules

sont incubées 15 minutes avec le peptide avant le déclenchement de la génération de thrombine.

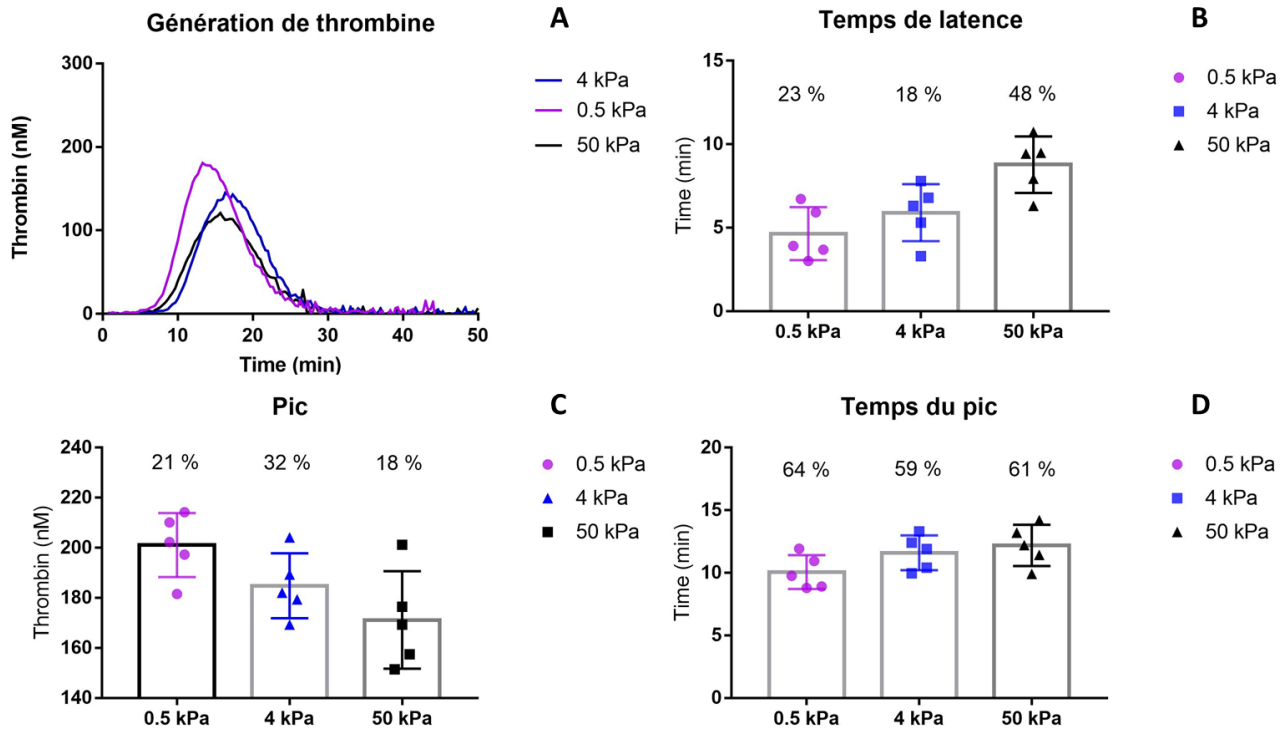


Figure 28 : Génération de thrombine à la surface des CMLVs incubées avec du RGT en fonction de la rigidité matricielle.

A : Courbes typiques de la génération de thrombine pour des rigidités du support différentes. B Temps de latence nécessaire avant la génération explosive de thrombine. (C) Pic maximum de thrombine atteint. D : Temps nécessaire pour atteindre le pic (n = 5), Les pourcentages représentent les variations par rapport aux valeurs sans RGT ***(Figure 26)****.*

Les courbes typiques de génération de thrombine montrent que la génération de thrombine en présence de RGT la plus rapide et la plus intense est observée pour la matrice la plus souple. A l'inverse la génération de thrombine à la surface de CMLVs incubées avec du RGT la plus lente et la moins intense est observée avec la matrice de 50 kPa. L'analyse des paramètres mesurés montrent que le temps de latence a tendance à augmenter avec l'augmentation de rigidité de la matrice alors que le pic de thrombine a tendance à diminuer. Cette tendance est moins prononcée pour le temps

pour atteindre le pic. Le temps de latence est augmenté en présence de RGT, l'augmentation la plus forte (48% par rapport au temps sans RGT) est observé pour le gel de plus rigide, de même le temps pour atteindre le pic est augmenté dans les différents groupes. La variation de la valeur du pic entre les cellules incubées ou non avec du RGT est la moins importante pour la rigidité matricielle la plus forte.

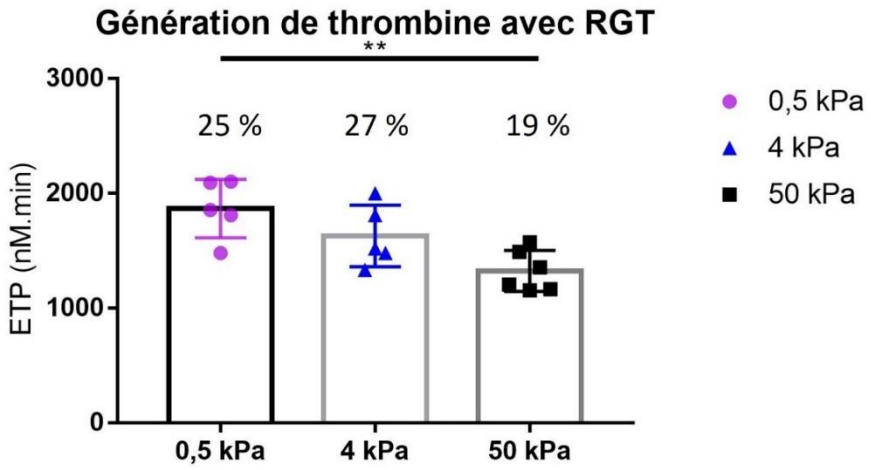


Figure 29 : Génération de thrombine en présence d'un inhibiteur de β_3 .

*(n = 5, ** = p<0,005). Les pourcentages représentent la diminution de l'ETP par rapport aux conditions normales sans inhibiteur (**Figure 27**).*

L'utilisation de RGT à induit une diminution du potentiel endogène de thrombine dans les 3 groupes par rapport aux conditions normales (**Figure 27**). Pour une rigidité matricielle de 0,5 kPa l'ETP était de 1867 ± 113,8 nM.minute, pour le groupe 4 kPa il était de 1627 ± 120,6 nM.minute et enfin pour les CMLVs reposant sur les gels de forte rigidité 1322 ± 72,61 nM.minute. La présence de l'inhibiteur entrainait une diminution de l'ETP pour les 3 groupes 0,5, 4 et 50 kPa respectivement de 25, 27 et 19 % respectivement.

3) Le facteur von Willebrand et son action sur la CMLVs médié par l'intégrine αvβ3.

Les CMLVs jouent un rôle primordial dans le maintien de la structure et la fonction de la paroi artérielle. Cependant au cours d'un processus précoce de réparation de la paroi ces cellules peuvent migrer vers la lumière du vaisseau formant une néointima.

Cette migration des CMLVs peut être entrainée par un ensemble de facteurs comme le VWF qui est présent dans le sous-endothélium.

Le facteur VWF est à la fois impliqué dans l'hémostase primaire et secondaire mais intervient aussi dans la physiopathologie de la prolifération des CMLVs. Toutefois, les récepteurs et voies de signalisations n'ont pas encore été parfaitement identifiées. La liaison entre le VWF et l'intégrine a été établi par une fixation de VWF par son motif RGD sur les plaquettes. Outre la fonction de récepteur à la prothrombine de l'intégrine nous avons mesuré sa potentielle interaction avec le VWF. Dans un premier temps il fallait observer l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans des conditions pathologiques en présence de VWF afin d'observer les récepteurs et voies de signalisation mises en jeu :

- Dans des aortes athérosclérotiques humaines, les CMLVs et le VWF était marqué afin d'observer une colocalisation et une potentielle activité proliférante et migratoire.
- Des CMLVs cultivées *in vitro* de donneurs sains et traitées par des concentrations variables de VWF permettaient d'observer l'action proliférative du VWF.
- L'identification, la colocalisation et l'inhibition de récepteurs du VWF à la surface des CMLVs comme l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ permettait de mettre en évidence les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire
- L'utilisation d'un modèle *in-vivo* de ligature carotidienne de souris

D’après la publication intitulé « *The VWF/LRP4/αVβ3-axis represents a novel pathway regulating proliferation of human vascular smooth muscle cells* » publiée dans *Cardiovascular research* en 2021 :

The VWF/LRP4/$\alpha_v\beta_3$-axis represents a novel pathway regulating proliferation of human vascular smooth muscle cells

Jérémy Lagrange[#1], Morel E. Worou[#1], Jean-Baptiste Michel[2], Alexandre Raoul[1], Mélusine Didelot[1], Vincent Muczynski[3], Paulette Legendre[3], François Plénat[4], Guillaume Gauchotte[5], Marc-Damien Lourenco-Rodrigues[3], Olivier D. Christophe[3], Peter J. Lenting[3], Patrick Lacolley[1], Cécile V. Denis*[3], Véronique Regnault*[1]

[1] INSERM, UMR_S 1116, Vandœuvre-lès-Nancy, France; Université de Lorraine, DCAC, Nancy, France.

[2] INSERM, UMR_S 1148, LVTS, Université de Paris, France

[3] HITh, UMR_S1176, INSERM, Université Paris-Saclay, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France

[4] Université de Lorraine, Nancy, France.

[5] CHRU, Anatomie et cytologie pathologiques, Nancy, France

[#] Jérémy Lagrange and Morel E. Worou participated equally to this work.

* Véronique Regnault and Cécile V. Denis participated equally to this work.

Short title: VWF induces VSMC proliferation

Corresponding author:

Cécile V. Denis, Inserm U1176, 80 rue du Général Leclerc, 94276 Le Kremlin-Bicêtre cedex

cecile.denis@inserm.fr

Category: Vascular Pathophysiology

Abstract count: 286

Word count: 9051

Figures: 8

References: 43

Abstract:

Aims: Von Willebrand factor (VWF) is a plasma glycoprotein involved in primary hemostasis, while also having additional roles beyond hemostasis namely in cancer, inflammation, angiogenesis and potentially in vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation. Here, we addressed how VWF modulates VSMC proliferation and investigated the underlying molecular pathways and the *in vivo* pathophysiological relevance.

Methods and results: VWF induced proliferation of human aortic VSMCs and also promoted VSMC migration. Treatment of cells with a siRNA against α_v integrin or the RGT-peptide blocking $\alpha_v\beta_3$ signaling abolished proliferation. However, VWF did not bind to $\alpha_v\beta_3$ on VSMCs through its RGD-motif. Rather, we identified the VWF A2 domain as the region mediating binding to the cells. We hypothesized the involvement of a member of the LDL-related receptor protein (LRP) family due to their known ability to act as co-receptors. Using the universal LRP-inhibitor receptor-associated protein, we confirmed LRP-mediated VSMC proliferation. siRNA experiments and confocal fluorescence microscopy identified LRP4 as the VWF-counterreceptor on VSMCs. Also co-localization between $\alpha_v\beta_3$ and LRP4 was observed via proximity ligation analysis and immuno-precipitation experiments. The pathophysiological relevance of our data was supported by VWF-deficient mice having significant reduced, if any, hyperplasia in carotid artery ligation and artery femoral denudation models. In wild-type mice, infiltration of VWF in intimal regions enriched in proliferating VSMCs was found. Interestingly, also analysis of human atherosclerotic lesions showed abundant VWF accumulation in VSMC-proliferating rich intimal areas.

Conclusions: VWF mediates VSMC proliferation through a mechanism involving A2 domain binding to the LRP4 receptor and integrin $\alpha_v\beta_3$ signaling. Our findings provide new insights into the mechanisms that drive physiological repair and pathological hyperplasia of the arterial vessel wall. In addition, the VWF/LRP4-axis may represent a novel therapeutic target to modulate VSMC proliferation.

Translational perspective

The mechanisms that drive physiological repair and pathological hyperplasia of the arterial vessel wall are complex and only partially understood. Specifically, the role of subendothelial-matrix proteins remains unclear. Here, we show that the hemostatic protein von Willebrand factor (VWF) accumulates in the vascular wall of atherosclerotic lesions and localizes to areas of vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation. VWF was found to use its A2-domain for binding to the VSMC-receptor LRP4, which in turn triggered outside-in signaling via integrin $\alpha_V\beta_3$, thereby inducing VSMC proliferation. Interfering with A2-domain/LRP4 interactions might offer innovative and additional therapeutical approaches to limit pathological hyperplasia.

1. Introduction

Vascular smooth muscle cells (VSMCs) are crucial to maintain the structure and functions of the arterial wall. Upon vascular injury, however, these cells may start to proliferate and migrate from the media into the intima in an early process of repair called neointima formation or intimal hyperplasia (IH). This process is key in several physiological and pathogenic events, such as atherosclerosis progression and in-stent restenosis[1-3]. The molecular basis of VSMC proliferation is complex and may be provoked by a number of mitogenic agents or growth factors, such as platelet-derived growth factor (PDGF)[4]. A basic requirement for these growth factors to induce VSMC proliferation involves their translocation from circulating blood into the vascular wall. Interestingly, the vascular wall already consists of many matrix proteins, and the mitogenic potential of these matrix proteins has poorly been explored so far.

One protein known to be present constitutively in the subendothelial matrix is von Willebrand factor (VWF). VWF is a multimeric plasma glycoprotein that plays a crucial role in hemostasis, bridging platelets to subendothelial components upon vascular injury, thus contributing to bleeding arrest[5]. Following its biosynthesis by endothelial cells, VWF is directed towards storage organelles, the Weibel-Palade bodies, from where it will be secreted through constitutive or regulated pathways[6]. The constitutive pathway not only releases VWF towards the luminal side but also serves to deposit VWF in the subendothelium, usually into an acellular area[7].

Animal studies from the 1990s suggested that the location and quantity of VWF in the vessel wall can vary in vascular pathologies. Indeed, in a model of cuff-induced neointima formation in the rabbit carotid artery, VWF accumulates in the media after 24h, while at later time-points (7-14 days), VWF deposits were observed in the extracellular space of the neointima between VSMCs[8]. Additional modifications in VWF deposition in the vessel wall, whether in the media or during neointima thickening have been reported in various animal models of atherosclerosis or angioplasty[9-11]. These observations have raised the question of a potential role for VWF in vascular tissue injury responses in general and in modulating VSMC behavior in particular. An attempt to answer this question was undertaken by Qin *et al* who reported decreased IH following carotid artery ligation in a murine strain known to have low VWF levels, the RIIIS/J mice, in comparison to wild-type C57B/6J mice[12]. Additional studies further demonstrated that VWF can interact directly with murine VSMCs, and induces proliferation of these cells[12-15]. The VWF-induced proliferation of murine VSMCs has been proposed to involve a Notch-dependent signaling pathway[13-15].

Apparently, VWF combines its presence in the vascular wall with the potential to modulate VSMC proliferation. However, the molecular basis of VWF-mediated VSMC proliferation remains obscure. We further do not know whether the link between VWF and VSMCs applies to human VSMC patho-physiology as well.

Here, we explored human atherosclerotic tissue at different stages of severity, observing abundant intimal VWF accumulation in aorta, coronary and carotid atherothrombotic lesions. In addition, we demonstrate that human VSMCs are prone to VWF-induced proliferation via a novel and unusual pathway. First, the VWF A2-domain induced proliferation via interactions with low-density lipoprotein receptor-related protein-4 (LRP4), a newly identified receptor for VWF. Second, LRP4 was found to co-localize with integrin $\alpha_V\beta_3$, and VWF binding to LRP4 triggered an outside-in signaling pathway via integrin $\alpha_V\beta_3$.

2. Methods

Additional information on Methods is available in the online Supplementary materials.

2.1 Materials and reagents

A detailed description of resources used in this study (reagents & cells, antibodies, inhibitors) are detailed (name, vendor/source and clone/reference) in the Supplementary materials and methods.

2.2 Animals

8-10 weeks old wild-type (VWF+/+) or VWF-deficient (VWF-/-)[16] male mice on a C57BL/6J background were used for this study. Housing and experiments were conducted in accordance with the French regulations and the experimental guidelines of the European Community (Directive 2010/63/EU). Animals were housed under standard conditions and given free access to standard rodent chow and water. The protocols were approved by the local Animal Ethics Committee of the University of Lorraine, France (#9411-2017032718404787 v4). Anesthesia was induced by isoflurane inhalation at 3.5% in 1L/min oxygen, and then maintained at 1.5% in 1L/min oxygen during the intervention. Mice were euthanized via exsanguination under isoflurane anesthesia (1.5% in 1L/min oxygen).

2.3 Human tissues

Post-mortem human arterial, aortic, carotid and coronary artery walls, including healthy and pathology at different stages of atherosclerotic diseases were collected from the Inserm human CV biobank (BB-0033-00029, U 1148, X. Bichat hospital, Paris), included in the European network BBMRI-ERIC, in accordance with the French regular and ethical rules (BioMedicine Agency convention DC2018-3141) and the principles of the declaration of Helsinki. Approval was obtained from the French Biomedical Agency (ABM, PFS09-007 & PFS17-002) and the Institutional Ethical Review board (SC09-09-66). Tissues were obtained from deceased organ donors for kidney and/or hepatic transplantation, in the absence of therapeutic uses for the aorta and/or the heart. Human arterial tissues were fixed with 4% (w/v) buffered formaldehyde solution prepared by depolymerization of paraformaldehyde and imbedded in paraffin. Serial 5-7 μm thick sections were performed.

2.4 Immunohistochemistry

For VSMC detection in murine tissue sections, representative sections were immunostained with a monoclonal antibody (MoAb) against α Smooth Muscle Actin (α-SMA), a MoAb against VWF or a MoAb against proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Briefly, sections were deparaffinized and rehydrated. Endogenous peroxidases were quenched with 3% H_2O_2. The mouse primary antibody was first combined with a secondary antibody (a goat anti-mouse

antibody conjugated to horse-radish peroxidase (HRP)) in a tube and allowed sufficient time to form an antibody complex. Any non-complexed secondary antibody was bound up with mouse serum. The mixture is then applied to the tissue. After washing, sections were successively incubated with a biotinylated secondary antibody for 30 min at RT, washed, and reacted with HRP-streptavidin. Color development from peroxidase antibodies was carried out using 3,3'-diaminobenzidine as the chromogen.

Immunohistochemistry of human arterial tissues were performed using α-SMA and VWF MoAbs and then revealed using 3,3'-diaminobenzidine staining on serial sections.

2.5 Cell culture

Human aortic VSMCs were obtained as cryopreserved ampules from Lonza (cat# CC-2571), containing ≥500,000 cells/ampule with >95% viability and >95% seeding efficiency. All cells were from single individuals aged between 18 and 57 years, and >10 different lots have been used during the study (ratio male/female about 60:40). Human aortic VSMCs were cultured in Smooth Muscle Cell Growth Medium-2 (SmGM-2) containing 5% fetal bovine serum at 37°C with 5% CO_2. Human VSMCs were used between passages 3 and 6.

2.6 Proliferation assay

Human VSMCs were seeded at a density of $5x10^4$ cells/well in SmGM-2 containing 5% fetal bovine serum into a 24-well plate. The next day, cells were synchronized in serum-free medium for 6h (or 24h or 48h for indicated experiments) and treated with various proteins: recombinant human platelet-derived growth factor (PDGF-BB), VWF (0-4 nM) or recombinant VWF-Fc fragments (100 ng/ml) in serum-free medium. After 24h, cell proliferation was evaluated by cell counting using a Neubauer-improved counting chamber (Marienfeld). Alternate methods to assess cell proliferation such as analysis of cellular DNA content by flow cytometry or incorporation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) were used for some experiments. In indicated groups, cells were pre-incubated with receptor-associated protein (RAP; 1 µM) for 1 min, a cyclic RGDPV peptide (1 mM) or RGT and GRT peptides (250 µM) for 30 min. Some experiments were performed in the presence of antibody LM609 (10 µg/ml). In the control group, VSMCs were cultured without any treatment. For each experiment, triplicate wells were counted.

2.7 Wound-healing and migration assays

Experiments were performed on confluent monolayers of human VSMCs seeded in a 6-well plate. After starving the cells in serum-free medium for 6h, a wound scratch was created with a 200 µl pipette tip. Cells were washed twice with PBS to remove detached cells, and then cultured in a serum-free medium with or without VWF or VWF fragment. The wounded area

was observed and photographed at t=0,16, 24 and 48h after wounding. Using ImageJ Software, VSMC migration and wound repair was evaluated by the number of cells that migrated into the wounded area.

2.8 Western blotting

Cells treated as indicated in individual experiments were harvested, washed twice with PBS and lysed in a cold lysis buffer (Roche Life Sciences, Meylan France) containing proteases and phosphatase inhibitors cocktails (Roche). The lysates were pelleted and the supernatant fractions were collected and examined for protein concentration using a Bradford Protein assay kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Proteins were separated by SDS-PAGE and electro-transferred onto a nitrocellulose membrane. After blocking for 1h in 5% non-fat milk dissolved in Tris buffered saline with 0.1% Tween-20, membranes were incubated with indicated specific primary antibodies overnight at 4°C. Membranes were then washed and incubated with appropriate secondary antibodies for 1h at room temperature (RT). The immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence (Western ECL substrate, Bio-Rad) using a luminescent image analyzer system (LAS-4000 mini, Fujifilm).

2.9 Immunofluorescence staining of VSMCs

A detailed description of this procedure is presented in the Supplementary materials. VSMCs were grown on glass coverslips, and incubated in the presence or absence of VWF. After formaldehyde fixation, cells were incubated with primary antibodies against VWF, $\alpha_v\beta_3$ integrin, Protease Activated Receptor-2 (PAR2) or LRP4. Nuclei were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Negative controls were performed by omitting the primary antibody or the VWF treatment. Images were acquired via fluorescent confocal microscopy, and analyzed by Image J software using the plugin *colocalization finder* to calculate the Pearson's coefficient[17].

For the Duolink®- Proximity Ligation Assay (PLA), double immunostaining of human VSMCs (treated or not with VWF) was performed using primary antibodies to LRP4 and $\alpha_v\beta_3$ integrin, the secondary antibodies being replaced by PLA probes. The remainder of the protocol was conducted according to the manufacturer's recommendations. For confocal microscopy, a Nikon C2 microscope with Ti-FL stage and C-HGFi fluorescent bulb was used. Acquisition was performed with the NiS Elements software.

2.10 siRNA transfection

To evaluate the role of LRP4 or $\alpha_v\beta_3$ in VWF-induced human VSMC proliferation, cells were transfected with siRNA directed against LRP4 or α_v or the negative control using a magnet-assisted transfection reagent according to the manufacturer's instructions. siRNA-sequences

are provided in the Supplementary materials. Briefly, for each well of a 24-well plate, 0.25 μg of siRNA was diluted in serum-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) to an end volume of 50 μl. The diluted siRNA was added to 0.75 μl of MATra-Si Reagent, followed by mixing and incubation at RT for 20 min. The transfection complex siRNA/MATra-Si reagent was added to the cells. The plate was then incubated on a magnetic plate for 15 min at 37°C. The magnetic plate was removed, followed by a 24h resting period in a serum-free medium. Cells were then used for VWF-induced human VSMCs proliferation or migration assays.

2.11 Binding assays

LRP proteins (50 µl, 1 µg/ml) were immobilized on half-well microtiter plates in carbonate buffer pH 9.6 overnight at 4°C. After washing with TBS (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) containing 2.5 mM $CaCl_2$ and 0.1% Tween-20, a post-coat step was applied (30 min at 37°C in the same buffer but with 3% BSA). VWF or VWF fragments diluted in TBS-Ca-Tween/3% BSA were then added to the wells (50 µl) for 2h at 37°C. In one set of experiments, VWF was pre-incubated or not with 1 mg/ml of ristocetin at RT before addition to the wells. After three washes, HRP-coupled antibodies to VWF or to Fc-tag were added (50 µl) for 2h at 37°C. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine was added to reveal bound proteins and the reaction was stopped with H_2SO_4. OD was read at 450 and 570 nm in a multiplate reader (Biotek).

2.12 Statistical analysis

Data are presented as mean±SD, unless specified. Statistical analysis was performed using Graphpad prism 5 software. A two-tailed unpaired Student *t* test was applied for comparisons between two groups. When indicated, multiple t-test was performed. One-way ANOVA followed by Tukey's or Dunnett's multiple comparisons test was performed when comparing multiple groups. $P<0.05$ was considered as statistically significant. For the *in vivo* experiments, an N-1 Chi-square test was performed when comparing the number of mice with or without hyperplasia. When comparing the intima/media ratio or nuclei number, a Mann-Whitney test was applied.

3. Results

3.1 VWF is involved in intimal hyperplasia in vivo

In view of the different mouse strains that were compared for their sensitivity to VWF-dependent hyperplasia formation in previous studies[12], we first set to confirm such an effect in a more appropriate setting using VWF-KO mice and their wild-type littermates. Two distinct models of vascular injury were used: 1) ligation of the common carotid artery and 2) femoral artery denudation. In the carotid artery ligation model, 5 out of 9 VWF+/+ mice had extensive intimal hyperplasia (IH), whereas none of the 8 VWF-/- did (p=0.015; **Supplementary Table S1**). A similar difference in neointima formation was observed in the femoral artery denudation model, with 10 out of 14 VWF+/+ mice developing IH versus 4 out of 13 VWF-/- mice (p=0.038; **Supplementary Table S1 & Fig. S1**). Histological analysis of the ligated and contralateral arteries revealed the presence of neointima selectively in the ligated arteries of VWF+/+ mice (**Fig. 1A**). Importantly, only the neointima of ligated arteries in VWF+/+ mice stained positive for PCNA, a marker for cell proliferation (**Fig. 1B**). Indeed, the intima/media ratio was significantly increased in these mice (p=0.0294), as was the number of nuclei (p=0.0294; **Fig. 1F**). Neointima stained positive for α-SMA, compatible with proliferating cells being VSMCs (**Fig. 1C**). Interestingly, neointima also stained positive for VWF, which was absent in the intima of the contralateral artery, suggesting that VWF is present within the proliferating area (**Fig. D**). This infiltration seemed specific for VWF as no changes were observed for collagen, another sub-endothelial matrix protein (**Fig. 1E**). Thus, these mouse data confirm the link between VWF and VSMC proliferation. However, it does not teach us whether VWF modulates VSMC proliferation in a direct or indirect manner.

3.2 VWF is present in the intima and core of human atherosclerotic lesions

To explore the possibility that VWF could contribute to the pathogenesis of neointima formation in humans, we performed qualitative analyses of rare tissue aortic sections for the presence of VWF in areas enriched in proliferating VSMCs. As expected, VWF is predominantly detected in the most luminal part of healthy human aorta (corresponding to the endothelium), with minor variable subendothelial staining in the α-SMA-positive cell area (**Fig. 2A**). In contrast, clear prominent VWF immunostaining was observed in the intima of human fatty streaks (aorta and coronary artery), largely overlapping with areas of α-SMA-positive cell migration and potential proliferation (**Fig. 2B** & **Supplementary Fig. S2**). Similarly, abundant VWF immunostaining was detected in endothelium and VSMC-rich subendothelium of the cap in human fibrolipidic plaques (**Fig. 2C**). VWF accumulation also predominated in the core of the plaque, an area of high plasma protein insudation (**Fig. 2C**). Another example relates to complex neo-atherosclerotic lesions that are formed following coronary artery stenting. Also in this condition,

VWF accumulates in the VSMC-rich area of the shoulder of a stented segment (**Supplementary Fig. S2**).

Extravascular VWF accumulation was also observed in carotid tissue sections (**Supplementary Fig. S2**). Profuse VWF immunostaining was present in areas of carotid intimal proliferation, involving both endothelial, subendothelial and SMA-positive intima (**Supplementary Fig. S2**). In culprit plaque, VWF appeared in the cap endothelium and in the VSMC-rich cap intimal proliferation area (**Supplementary Fig. S2**). As observed in the fibrolipidic aorta, VWF is also present in the VSMC-poor external part of the lesion, an area corresponding to intraplaque hemorrhage (**Supplementary Fig. S2**). Altogether, we observe an accumulation of VWF in VSMC-rich areas of various pathological arterial tissue sections. It seems conceivable therefore that VWF may be in direct contact with these cells.

3.3 VWF induces human aortic VSMC proliferation and migration

In the remainder of our study, we focused on the potential of VWF to induce proliferation of human VSMCs and its underlying molecular pathway. In a first series of experiments, the mitogenic effect of VWF on VSMCs was compared to that of PDGF-BB. Proliferation in the absence of any mitogenic protein was arbitrarily defined as 1.0. As expected, PDGF-BB induced VSMC proliferation in a dose-dependent manner (**Fig. 3A**). In line with previous studies, the proliferative effect of PDGF-BB followed a bell-shaped curve[18, 19]. A similar dose-dependent and bell-shaped effect was observed for VWF (**Fig. 3A**). Interestingly, similar maximum proliferative index values were obtained for PDGF-BB and VWF (1.8±0.1 for PDGF-BB *vs* 1.8±0.3 for VWF at the peak, $p<0.0005$ *vs* untreated cells). Similar proliferative index values for VWF were obtained when applying other means to quantify cell proliferation: cell cycle analysis by flow cytometry or incorporation of BrdU (**Fig. 3B**). In an alternative approach, we analyzed the effect of VWF on VSMC recolonization in a wound healing scratch assay, which measures both migration and proliferation. Again, VWF was found to stimulate VSMC recolonization of the wound area as indicated by the significantly higher number of cells present after 16, 24 and 48h (**Supplementary Fig. S3**). These data are compatible with VWF having the potential to simulate human VSMC proliferation, akin to PDGF-BB.

3.4 Signaling pathways associated with VWF-induced VSMC-proliferation

We next explored the cellular responses of VSMCs used at passages 3-6, following exposure to VWF. First, quantitative PCR of nine specific VSMC markers was performed at 24h and 48h after exposure to VWF. However, no change in RNA expression for each of these markers was detected compared to cells without VWF exposure (**Fig. 3C**). In accordance with these data, no changes in expression of α-SMA, Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SM-MHC), vimentin, myocardin, and smoothelin upon VWF treatment were observed (**Supplementary**

Fig. S4), indicating the maintenance of a differentiated state of VSMCs, allowing the proliferative status of the cells.

To analyze which signaling pathways were activated by VWF, we quantified phosphorylation of Akt, ERK1/2, p38-Mitogen-activated protein kinases (p38-MAPK), Src and STAT3. No VWF-dependent activation of STAT3 could be detected (**Supplementary Fig. S5**). In contrast, VWF significantly induced Akt phosphorylation at the Thr308 site and ERK1/2 phosphorylation at the Thr202/Tyr204 site with a maximum effect at 15 min (**Fig. 3D-E**). To further elucidate the VWF-dependent signaling pathway upstream of regulators of Akt and ERK1/2, we examined the level of phosphorylation of p38-MAPK and Src, a major intracellular mediator of integrin-dependent functions. Induction of both p38-MAPK phosphorylation at the Thr179/Tyr181 site and Src phosphorylation at the Tyr418 site were increased within 5 to 15 min and the phosphorylation returned to basal levels after 30 min (**Fig. 3F-G**).

3.5 Identification of $\alpha_v\beta_3$ involvement in VWF-induced VSMC proliferation

The $\alpha_v\beta_3$ integrin has previously been reported as a receptor for VWF on VSMCs[15], and we therefore investigated whether VWF co-localized with this integrin at the cellular surface *via* confocal microscopy. VSMCs were incubated in the absence or presence of VWF and co-stained for α_V and VWF (**Fig. 4A**) or, as negative control, PAR2 and VWF (**Fig. 4B**). Confocal images revealed selective co-staining for VSMCs incubated with VWF and co-stained for α_V and VWF, but not in other conditions (**Fig. 4A-B**). Observations were quantified via pixel-analysis of multiple z-stacks, revealing a median Pearson's correlation coefficient of 0.71 for α_V/VWF versus 0.11 for PAR2/VWF (**Fig. 4A-B**). These data confirm that VWF co-localizes with $\alpha_V\beta_3$.

To establish if VWF-induced VSMC proliferation involves $\alpha_v\beta_3$, we used a siRNA-strategy. A specifically designed α_v-targeting siRNA blocked α_v RNA expression by 78% and protein expression by 41%, whereas both remained unchanged in the presence of control siRNA (**Supplementary Fig. S6**). Adding the α_v siRNA and control siRNA to VSMCs induced a 15-20% reduction in cell proliferation in the absence of VWF ($p=0.012$ and $p=0.046$, respectively when comparing to "no VWF no siRNA" condition; **Fig. 4C**), indicating that the siRNA procedure in itself has a minor but significant effect on VSMC proliferation. However, a similar 1.6-fold increase in VSMC proliferation was observed for both control conditions (no siRNA and control siRNA) in the presence of VWF compared to the absence of VWF, showing that this procedure does not interfere with the mitogenic activity of VWF. In contrast, no VWF-induced proliferation was found in the presence of the α_v siRNA (**Fig. 4C**). Apparently, the presence of $\alpha_V\beta_3$ is indispensable for VWF-induced VSMC proliferation.

3.6 The VWF-$\alpha_v\beta_3$ integrin axis in VSMC proliferation

Since VWF comprises an RGD-motif in its C-terminal region, we anticipated that this motif would mediate direct binding of VWF to $\alpha_v\beta_3$. This hypothesis was challenged by analyzing VWF-mediated VSMC proliferation in the absence or presence of a cRGDPV-peptide or the anti-$\alpha_v\beta_3$ integrin antibody LM609, both of which would annihilate the binding of the VWF RGD motif to $\alpha_v\beta_3$ and subsequent VSMC proliferation. In the absence of VWF, we observed that the cRGDPV-peptide alone inhibited basal cell proliferation by 60% (p=0.002 compared to control without any additions), whereas no effect was observed when antibody LM609 was tested in the absence of VWF (**Fig. 4D**). Despite the inhibitory effect of the cRGDPV-peptide on basal VSMC proliferation, a similar VWF-dependent increase in VSMC proliferation was observed in all three conditions: 1.5-fold, 1.6-fold and 1.7-fold for control, the cRGDPV-peptide and antibody LM609, respectively.

We next explored the option whether the observed VWF-dependent effect involves $\alpha_v\beta_3$-mediated signaling. This was tested using a myristoylated RGT-peptide (myr-RGT), which selectively inhibits β_3 outside-in signaling[21]. As control, its myristoylated GRT-control peptide (myr-GRT) was applied[21]. Neither peptide had any influence on basal VSMC proliferation, nor did the myr-GRT-control peptide affect VWF-induced proliferation (**Fig. 4E**). In contrast, the myr-RGT-peptide proved an efficient inhibitor of VWF-enhanced VSMC proliferation (proliferative index 2.1±0.2 without peptide *vs* 0.9±0.2 with peptide, p<0.0001; **Fig. 4E**). We then hypothesized that should the VWF mitogenic effect involves signaling via $\alpha_v\beta_3$, then the down-regulation of $\alpha_v\beta_3$ expression would result in an absence of phosphorylation of downstream kinases. Human VSMCs were therefore treated with α_v siRNA and its effect on Src phosphorylation was evaluated. Whereas VWF induced Src phosphorylation in VSMCs treated with control siRNA, this was completely abolished in cells treated with α_v siRNA (**Supplementary Fig. S7**). Thus, VWF induces an $\alpha_v\beta_3$-dependent signaling pathway that results in phosphorylation of Src-kinase. In contrast, this process proceeds independently of a direct interaction between VWF and the RGD-responsive site in $\alpha_v\beta_3$.

3.7 Identification of a member of the LRP family as crucial determinant for VWF-induced VSMC proliferation

Since $\alpha_v\beta_3$ is seemingly not the primary VWF receptor in our experiments, it is conceivable that a second receptor able to crosstalk with $\alpha_v\beta_3$ is implicated. LRP family members are known co-receptors in different cell types, including VSMCs. Indeed, a cooperation between LRP1 and $\alpha_v\beta_3$ in response to tissue-type plasminogen activator has been reported[22]. We therefore tested whether an LRP receptor was involved, and GST-RAP was used as general inhibitor of the LRP-receptor family. GST-RAP alone had no effect on basal VSMC proliferation (**Fig. 5A**).

However, its presence completely abolished VWF-induced cell proliferation (proliferation index with VWF alone: 2.2±0.2 *vs* 0.7±0.2 with VWF+GST-RAP, p<0.0001; **Fig. 5A**). We also measured proliferation using a combination of both GST-RAP and myr-RGT. Blocking simultaneously $\alpha_v\beta_3$ and LRP had no additional effect and VWF-induced VSMC proliferation was reduced to basal proliferation (**Fig. 5A**), suggesting that both receptors operate in concert. We considered the possibility that the LRP-receptor involved in this VWF-dependent process would be LRP1, previously recognized as receptor for VWF on macrophages, and also known to be expressed on VSMCs[23, 24]. However, for this interaction, VWF requires to adopt an active, platelet-binding conformation, which can be mimicked by pre-incubating VWF with ristocetin[23]. Unexpectedly, pre-treatment of VWF with ristocetin did not further increase the proliferative index at any of the VWF concentrations tested (**Fig. 5B**), suggesting that another LRP family member rather than LRP1 is involved in VWF-dependent VSMC proliferation.

3.8 VWF A2-domain mediates VSMC proliferation

To narrow our search for an LRP family member as potential receptor for VWF on VSMCs, we decided to investigate the molecular determinants on the VWF subunit, necessary to induce VSMC proliferation. To do so, we used purified recombinant VWF domains. The VWF mature subunit with its domain structure is represented on **Fig. 5C**. Among isolated VWF fragments, only the VWF-A2 domain promoted VSMC proliferation. No significant difference with full-length VWF were observed in terms of proliferative index (2.1±0.2 for VWF, 1.7±0.5 for A2-Fc, *p*=0.47; **Fig. 5D**). All other VWF fragments as well as a control Fc-fused unrelated protein (Siglec5-Fc) proved inefficient in promoting cell proliferation. A dimeric D4-CK fragment containing the VWF RGD-motif (within the C4 domain) also did not show any proliferative effect, compatible with the finding that the VWF-mediated effect is independent of its RGD-motif (**Fig. 5D**). In the wound healing scratch assay, VWF-A2 fragment induced VSMC migration, similar to full-length VWF (**Fig. 5E & Supplementary Fig. S8**). Similar to full-length VWF, A2-Fc induced proliferation was completely abolished in the presence of the LRP-inhibitor GST-RAP or the presence of myr-RGT (**Fig. 5F**). In addition, A2-Fc induced similar signaling as full-length VWF, as illustrated by the phosphorylation of Erk1/2 (**Fig. 5G**). Apparently, the A2-Fc protein mimics full-length VWF not only in inducing VSMC proliferation and migration, but also in doing so via an LRP-triggered outside-in signaling pathway involving $\alpha_v\beta_3$.

3.9 VWF binds to LRP4 on VSMCs to induce cell proliferation

Having identified an LRP receptor as counter-receptor for the VWF A2-domain on VSMCs, we next attempted to pinpoint which LRP member was involved. First, we measured VWF binding, in the absence of ristocetin, to different LRP receptors selected on the basis of mRNA

identification in VSMCs (www.proteinatlas.org). In these conditions, no binding of VWF to LRP1, LRP5 or LRP8 was detected. However, VWF displayed strong binding to LRP4 in the absence of ristocetin (**Fig. 6A**). Furthermore, when testing VWF-Fc fragments, we observed a specific interaction between VWF-A2 domain and LRP4 (**Fig. 6B**), thus suggesting that LRP4 could represent a candidate receptor for VWF on VSMCs. Since LRP4 is particularly known for its expression on neurons and skeletal muscle cells rather than VSMCs, we first verified LRP4 expression on VSMCs. To this end, immunofluorescence studies were performed and a strong signal for LRP4 on these cells could be detected (**Fig. 6C**). Moreover, when cells were incubated in the presence of VWF, a clear co-staining between VWF and LRP4 was detected (**Fig. 6D**), suggesting that VWF is able to interact with LRP4 at the cellular surface. Using siRNA against LRP4, we next demonstrated the direct involvement of this receptor in VWF-mediated VSMC proliferation. siRNA directed against LRP4 led to a >90% decrease in mRNA expression and a 40% decrease in protein expression (**Supplementary Fig. S9**). In the proliferation assay, complete inhibition of VWF-induced VSMC proliferation was observed in the presence of the LRP4 siRNA with no significant effect of the control siRNA (proliferative index of 1.7±0.1 with control siRNA *vs* 1.0±0.1 with LRP4 siRNA, $p<0.0001$; **Fig. 6E**). Thus, LRP4 seems to be an essential element in VWF-induced VSMC proliferation.

3.10 LRP4 and $\alpha_v\beta_3$ cooperate to mediate VWF-induced VSMC proliferation

Given the observation that LRP4 and $\alpha_v\beta_3$ seem to mediate VWF-dependent VSMC proliferation in a concerted action (**Fig. 5A**), we explored the option that both receptors would be in close proximity at the cellular surface. To this end, Duolink®-PLA analysis was performed, which detects proteins being located within a range of 40 nm. Whereas negative conditions (single primary with both secondary antibodies) did not reveal any signal, we observed a positive signal in the test conditions, demonstrating that both receptors were within 40 nm of distance, strongly suggesting the existence of an interaction (**Fig. 7A-C**). Indeed, the LRP4/$\alpha_V\beta_3$ complex could be precipitated using anti-α_V antibodies (**Fig. 7D**). Interestingly, while Duolink-PLA analysis suggested reduced interactions between LRP4 and $\alpha_V\beta_3$ in the presence of VWF (**Supplementary Fig. S10**), this was not observed in the immunoprecipitation experiments (**Fig. 7D**). We anticipate that reduced complex formation in the former assay is due to reduced antibody accessibility of the receptors in the presence of VWF.

We also checked whether siRNA against LRP4 abrogated the $\alpha_v\beta_3$-dependent activation of Src phosphorylation by VWF. The LRP4 siRNA completely abolished VWF-induced Src activation compared with the control siRNA (**Fig. 7E-F**). Suppression of Akt, ERK1/2 and p-38 MAPK phosphorylation was also evidenced in the presence of the LRP4 siRNA (**Fig. 7E-F**).

Taken together, we have identified VWF as a mitogenic factor that efficiently induces VSMC proliferation via a previously unrecognized pathway involving the heterologous receptor complex LRP4/ $\alpha_v\beta_3$, which in turn activates a Src-mediated signaling cascade.

4. Discussion

Besides its well-known function in primary hemostasis, VWF is increasingly recognized as a pleiotropic protein involved in processes related to angiogenesis, cancer and inflammation[5]. In the vascular wall, observations that VWF location and quantity may vary in vascular diseases indicate a potential intervention of VWF in tissue remodeling following injury[8-11]. In particular, a role for VWF in modulating murine VSMC proliferating properties has been suggested by Qin et al[12]. In this study, we have now characterized this ability of VWF to induce human VSMC proliferation by identifying the pathways involved. We observed a dose-dependent proliferating effect of VWF on VSMCs, consistent with the previous findings. In addition to inducing cell proliferation, VWF also proved able to mediate cell migration in a wound healing scratch assay, further demonstrating its ability to influence tissue remodeling. VWF-induced proliferation and migration of VSMCs had no effect on their differentiation, in agreement with the current concept that dedifferentiation is not a prerequisite for VSMC proliferation[25, 26]. Finally, involvement of the ERK1/2-MAPK cascade and Akt signaling pathway completed and supported the picture of a proliferating status of the VSMCs in presence of VWF.

Having established this proliferating effect of VWF, our next step consisted in identifying the cellular receptor(s) involved. Based on our knowledge of the receptor repertoire of VSMCs, we first considered $\alpha_v\beta_3$ integrin as a potential candidate. Indeed this integrin is strongly expressed by VSMCs[27], is a known receptor for VWF[28] and is involved in VSMC proliferation and migration[29]. Our initial experiments showing co-localization of $\alpha_v\beta_3$ and VWF at the surface of VSMCs supported this hypothesis. Further confirmation of $\alpha_v\beta_3$ involvement arose from the complete inhibition of the VWF-proliferative effect upon treatment of the cells with siRNA against α_v. Importantly, on VSMCs the α_v subunit is only associated to β_3 and β_3 is only associated to α_v[27]. Blocking $\alpha_v\beta_3$ signaling using the myr-RGT-peptide[21, 30] also completely annihilated VWF-induced cell proliferation. However, the use of inhibitors of $\alpha_v\beta_3$ engagement[31] such as a cyclic RGD peptide or the LM609 antibody did not block VWF-mediated cell proliferation. Altogether, our results emphasize the critical importance of $\alpha_v\beta_3$-dependent signaling in mediating VWF-induced cell proliferation, a process that seems to occur independently of VWF binding to this integrin.

Since members of the LRP family are known to act as co-receptors in a variety of cellular settings, including VSMCs[22], we hypothesized for such a mechanism and indeed, using the LRP-inhibitor GST-RAP, we exposed the importance of an LRP receptor in VWF-induced VSMC proliferation. Among LRP family members, VWF is known to bind LRP1 but this binding involves its A1 domain and requires VWF to be in an active conformation[6, 23]. Our present observations showing a lack of effect of ristocetin, a VWF activator, added to the identification of the A2 domain as the necessary VWF determinant, thus pointed to an LRP member other than LRP1. Our data identified LRP4 as a new receptor for VWF. Indeed, using direct binding

experiments we showed that LRP4 is the only LRP member potentially present on VSMCs that is able to bind VWF without ristocetin. In addition, we showed that the only VWF region able to substitute for full-length VWF in mediating VSMC proliferation and migration, *i.e.* the A2 domain is also able to bind to LRP4. Using immunofluorescence, we confirmed expression of LRP4 by VSMCs and showed colocalization between LRP4 and VWF. And finally, direct evidence of LRP4 involvement came from the use of siRNA against LRP4, which completely blocked VWF-induced proliferation.

Three important and original pieces of information can be highlighted from these experiments. The first one is the involvement of the VWF-A2 domain. Besides its critical role in harboring binding and cleavage sites for ADAMTS13, the enzyme responsible for regulating VWF multimeric size[32], the A2 domain has not been reported to play a major role in mediating VWF interaction with its numerous partners. This is in contrast to its neighboring domains, which contains binding sites for many VWF ligands such as glycoprotein Ib, heparin, sulfatides, collagen VI for the A1 domain [33, 34] and collagens for the A3 domain[35]. However very recently, a study reported an interaction between the VWF A2 domain and extracellular vimentin[36], suggesting that the importance of this domain has not yet been fully investigated. The second original finding relates to LRP4. This member of the LRP family has been first identified in 1998 and is unique among other LRP receptors since it is the only type II transmembrane receptor, with its N-terminal region located within the cytoplasmic side of the plasma membrane[37]. A complete deficiency of LRP4 is incompatible with life in mice[38]. LRP4 has been reported to be involved in multiple functions: on skeletal muscle cells, LRP4 is crucial for the formation of neuromuscular junction[39] while on non-muscle cells, LRP4 plays a role in presynaptic differentiation or in bone-mass homeostasis[40]. Although the main functions of the LRP receptors appear to be related to cargo transport or internalization of macromolecules, LRP4 mostly serves as a signal transducer or modulator. A number of ligands for LRP4 have already been identified and for each of its functions, an original and complex signaling mechanism has been described[39]. Our results appear to be following a similar trend. Indeed, LRP4 appears to be the receptor for VWF at the cell surface and as such, it could potentially signal directly through Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) to activate ERK1/2, Akt and p38-MAPK. However, in our conditions, an LRP4-mediated outside-in signaling through $\alpha_v\beta_3$ is necessary to induce VSMC proliferation, suggesting cooperation between both receptors, the third important point in our study. Indeed, we were able to show using immunoprecipitation experiments and the Duolink-PLA that LRP4 and $\alpha_v\beta_3$ are co-localizing at the surface of VSMCs. Furthermore, the use of siRNA against one or the other of these receptors completely abrogates the proliferating effect of VWF, highlighting the physiological relevance of this cooperation. It is not unusual for LRP receptors to associate with co-receptors depending on the cellular environment, allowing them to extend their ligand profile, to modulate their cellular

activities and to enable signal transduction[41]. This capacity makes LRP family members very versatile receptors and multifunctional cell-surface proteins. For example, cooperation between LRP1 and $\alpha_v\beta_3$ has been shown to mediate vasocontraction of VSMCs by tissue-type plasminogen activator[22]. Still on VSMCs, LRP1 appears to control PDGF receptor-dependent signaling pathways, controlling cell proliferation and preventing atherosclerosis[24].

Relevant to our findings is of course its physiological context. Our mouse model based on a full deficiency of VWF displayed a strong reduction in neointima formation in two different experimental approaches for intimal hyperplasia, consistent with observations using a mouse with a partial deficiency of VWF[12]. In addition, infiltration of VWF in regions enriched in proliferating VSMCs was detected in wild-type mice. It should be noted that both mouse models are limited in that they do not distinguish between a direct and indirect role of VWF. VWF may affect VSMC proliferation indirectly via several mechanisms. For instance, endothelial cells lack VWF-specific storage organelles (Weibel-Palade bodies) in VWF-/- mice[16], which could negatively impact the release of necessary growth factors or other proteins essential in the process to induce VSMC proliferation. However, Weibel-Palade bodies are normally present in the endothelial cells of the RIIIS/J-mice, which express low levels of VWF[12]. It is unlikely therefore that the lack of neointima formation in the VWF-/- mice is due to the absence of Weibel-Palade bodies. Alternatively, VWF may be necessary for the recruitment of platelets at the site of injury, which can release growth factors contributing to cell proliferation. However, characterization of the model by Roque *et al* revealed an early-stage (1h) accumulation of platelets at the site of injury without the need for VWF[42], arguing for a similar platelet involvement between VWF+/+ and VWF-/- mice. Finally, VWF has recently been reported to contribute to wound healing, acting as a molecular bus to deliver growth factors to wound sites[43]. It is possible that this mechanism contributes to the *in vivo* VWF-mediated VSMC proliferation, existing in parallel to the LRP4-$\alpha_v\beta_3$ mechanism that we describe here.

In view of our findings and the potential mechanism by which VWF contributes to VSMC proliferation, it seems relevant to distinguish between subendothelial VWF and VWF derived from the circulation. The data observed using human atherosclerotic pathology fit well with the hypothesis that VWF is present in the wall proportional to the pathology intensity, mainly in endothelium and intima but also in the core of the lesion. These data suggest that deposition of VWF originates from endothelial cells surrounding the lesion. However, other areas in the atherosclerotic lesion, predominantly in the core of the plaque, are prone to hemorrhages and plasma protein insudation[20]. It is likely that in these plasma-borne atheroma injuries, plasma-derived VWF participates in the arterial cellular responses.

In conclusion, we have observed the combined presence of VWF and VSMCs in the neointima of various pathological arteries, but not healthy vessels. In addition, we found that VWF is an effective mitogenic agent towards VSMCs, and further analysis revealed a novel, previously

unrecognized molecular pathway underlying this mitogenic action. VWF can induce VSMC proliferation, involving cooperation between two receptors, one important for ligand binding (LRP4) and the second for signal transduction ($\alpha_v\beta_3$). Our findings provide new insights into the mechanisms that drive physiological repair and pathological hyperplasia of the arterial vessel wall. The identification of VWF and LRP4 may therefore be of potential interest in prevention and treatment of arterial wall remodeling, and open avenues for novel therapeutical strategies.

6. Acknowledgements

We wish to thank Dr. Huguette Louis and Mrs Kenza Benkirane for expert technical assistance. We are indebted to Dr. Muriel Laffargue for her willingness to share her team's expertise in performing femoral wire injury in mice. We thank the Flow cytometry Core Facility and the Imaging Core Facility (PTIBC) of UMS2008/US40 IBSLor (Université de Lorraine-CNRS-INSERM) for cell cycle analysis and confocal microscopy respectively.

7. Sources of funding

This work was supported by the Investments for the Future program under grant agreement No ANR-15-RHU-0004; the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-BSV1-0026); the Région Grand Est; and the "Fonds européen de développement regional".

8. Conflict of interest

None declared.

9. Author contributions

JL, MEW, MD, VM, AR, PL, FP, GG, MDLR, VR performed experiments and analyzed data.
JBM provided human tissue sections and analyzed histology sections.
ODV, PJL, PL, CVD, VR analyzed data, designed and supervised the study.
PJL, PL, CVD, VR wrote the manuscript.
All authors confirmed the final version of the manuscript.

10. Data availability

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

11. References

1. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med* 2002;**8**:1249-1256.
2. Schober A. Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;**28**:1950-1959.
3. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 2012;**95**:194-204.
4. Millette E, Rauch BH, Kenagy RD, Daum G, Clowes AW. Platelet-derived growth factor-BB transactivates the fibroblast growth factor receptor to induce proliferation in human smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med* 2006;**16**:25-28.
5. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost* 2012;**10**:2428-2437.
6. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* 2015;**125**:2019-2028.
7. Sporn LA, Marder VJ, Wagner DD. Differing polarity of the constitutive and regulated secretory pathways for von Willebrand factor in endothelial cells. *J Cell Biol* 1989;**108**:1283-1289.
8. Kockx MM, De Meyer GR, Andries LJ, Bult H, Jacob WA, Herman AG. The endothelium during cuff-induced neointima formation in the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb* 1993;**13**:1874-1884.
9. Bosmans JM, Kockx MM, Vrints CJ, Bult H, De Meyer GR, Herman AG. Fibrin(ogen) and von Willebrand factor deposition are associated with intimal thickening after balloon angioplasty of the rabbit carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:634-645.
10. De Meyer GR, Hoylaerts MF, Kockx MM, Yamamoto H, Herman AG, Bult H. Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;**19**:2524-2534.
11. Giddings JC, Banning AP, Ralis H, Lewis MJ. Redistribution of von Willebrand factor in porcine carotid arteries after balloon angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;**17**:1872-1878.
12. Qin F, Impeduglia T, Schaffer P, Dardik H. Overexpression of von Willebrand factor is an independent risk factor for pathogenesis of intimal hyperplasia: preliminary studies. *J Vasc Surg* 2003;**37**:433-439.
13. Meng H, Zhang X, Lee SJ, Wang MM. Von Willebrand factor inhibits mature smooth muscle gene expression through impairment of Notch signaling. *PLoS One* 2013;**8**:e75808.
14. Zhang X, Meng H, Blaivas M, Rushing EJ, Moore BE, Schwartz J, Lopes MB, Worrall BB, Wang MM. Von Willebrand Factor permeates small vessels in CADASIL and inhibits smooth muscle gene expression. *Transl Stroke Res* 2012;**3**:138-145.
15. Scheppke L, Murphy EA, Zarpellon A, Hofmann JJ, Merkulova A, Shields DJ, Weis SM, Byzova TV, Ruggeri ZM, Iruela-Arispe ML, Cheresh DA. Notch promotes vascular maturation by inducing integrin-mediated smooth muscle cell adhesion to the endothelial basement membrane. *Blood* 2012;**119**:2149-2158.
16. Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullman-Cullere M, Hynes RO, Wagner DD. A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;**95**:9524-9529.
17. French AP, Mills S, Swarup R, Bennett MJ, Pridmore TP. Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nat Protoc* 2008;**3**:619-628.
18. Facchiano A, De Marchis F, Turchetti E, Facchiano F, Guglielmi M, Denaro A, Palumbo R, Scoccianti M, Capogrossi MC. The chemotactic and mitogenic effects of platelet-derived growth factor-BB on rat aorta smooth muscle cells are inhibited by basic fibroblast growth factor. *J Cell Sci* 2000;**113 (Pt 16)**:2855-2863.
19. Li H, Papadopoulos V, Vidic B, Dym M, Culty M. Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology* 1997;**138**:1289-1298.

20. Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J* 2011;**32**:1977-1985, 1985a, 1985b, 1985c.
21. Su X, Mi J, Yan J, Flevaris P, Lu Y, Liu H, Ruan Z, Wang X, Kieffer N, Chen S, Du X, Xi X. RGT, a synthetic peptide corresponding to the integrin beta 3 cytoplasmic C-terminal sequence, selectively inhibits outside-in signaling in human platelets by disrupting the interaction of integrin alpha IIb beta 3 with Src kinase. *Blood* 2008;**112**:592-602.
22. Akkawi S, Nassar T, Tarshis M, Cines DB, Higazi AA. LRP and alphavbeta3 mediate tPA activation of smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**291**:H1351-1359.
23. Rastegarlari G, Pegon JN, Casari C, Odouard S, Navarrete AM, Saint-Lu N, van Vlijmen BJ, Legendre P, Christophe OD, Denis CV, Lenting PJ. Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood* 2012;**119**:2126-2134.
24. Boucher P, Gotthardt M, Li WP, Anderson RG, Herz J. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* 2003;**300**:329-332.
25. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004;**84**:767-801.
26. Michel JB. Phylogenic determinants of cardiovascular frailty, focus on hemodynamics and arterial smooth muscle cells. *Physiol Rev* 2020;**in press, doi: 10.1152/physrev.00022.2019**.
27. Lacolley P, Regnault V, Segers P, Laurent S. Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol Rev* 2017;**97**:1555-1617.
28. Denis C, Williams JA, Lu X, Meyer D, Baruch D. Solid-phase von Willebrand factor contains a conformationally active RGD motif that mediates endothelial cell adhesion through the alpha v beta 3 receptor. *Blood* 1993;**82**:3622-3630.
29. Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF. Role of integrin alpha(v)beta3 in vascular biology. *Thromb Haemost* 1998;**80**:726-734.
30. Xi X, Bodnar RJ, Li Z, Lam SC, Du X. Critical roles for the COOH-terminal NITY and RGT sequences of the integrin beta3 cytoplasmic domain in inside-out and outside-in signaling. *J Cell Biol* 2003;**162**:329-339.
31. Mao X, Said R, Louis H, Max JP, Bourhim M, Challande P, Wahl D, Li Z, Regnault V, Lacolley P. Cyclic stretch-induced thrombin generation by rat vascular smooth muscle cells is mediated by the integrin alphavbeta3 pathway. *Cardiovasc Res* 2012;**96**:513-523.
32. Crawley JT, de Groot R, Xiang Y, Luken BM, Lane DA. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2011;**118**:3212-3221.
33. Christophe O, Obert B, Meyer D, Girma JP. The binding domain of von Willebrand factor to sulfatides is distinct from those interacting with glycoprotein Ib, heparin, and collagen and resides between amino acid residues Leu 512 and Lys 673. *Blood* 1991;**78**:2310-2317.
34. Sixma JJ, Schiphorst ME, Verweij CL, Pannekoek H. Effect of deletion of the A1 domain of von Willebrand factor on its binding to heparin, collagen and platelets in the presence of ristocetin. *Eur J Biochem* 1991;**196**:369-375.
35. Kalafatis M, Takahashi Y, Girma JP, Meyer D. Localization of a collagen-interactive domain of human von Willebrand factor between amino acid residues Gly 911 and Glu 1,365. *Blood* 1987;**70**:1577-1583.
36. Fasipe TA, Hong SH, Da Q, Valladolid C, Lahey MT, Richards LM, Dunn AK, Cruz MA, Marrelli SP. Extracellular Vimentin/VWF (von Willebrand Factor) Interaction Contributes to VWF String Formation and Stroke Pathology. *Stroke* 2018;**49**:2536-2540.
37. Tomita Y, Kim DH, Magoori K, Fujino T, Yamamoto TT. A novel low-density lipoprotein receptor-related protein with type II membrane protein-like structure is abundant in heart. *J Biochem* 1998;**124**:784-789.
38. Weatherbee SD, Anderson KV, Niswander LA. LDL-receptor-related protein 4 is crucial for formation of the neuromuscular junction. *Development* 2006;**133**:4993-5000.
39. Shen C, Xiong WC, Mei L. LRP4 in neuromuscular junction and bone development and diseases. *Bone* 2015;**80**:101-108.

40. Xiong L, Jung JU, Wu H, Xia WF, Pan JX, Shen C, Mei L, Xiong WC. Lrp4 in osteoblasts suppresses bone formation and promotes osteoclastogenesis and bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;**112**:3487-3492.
41. Nykjaer A, Willnow TE. The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol* 2002;**12**:273-280.
42. Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Zhang WX, Taubman MB, Reis ED. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:335-342.
43. Ishihara J, Ishihara A, Starke RD, Peghaire CR, Smith KE, McKinnon TAJ, Tabata Y, Sasaki K, White MJV, Fukunaga K, Laffan MA, Lutolf MP, Randi AM, Hubbell JA. The heparin binding domain of von Willebrand factor binds to growth factors and promotes angiogenesis in wound healing. *Blood* 2019;**133**:2559-2569.

12. Figure legends

Figure 1: Immunostaining of murine arterial tissue sections after carotid ligation.

A-E. Arterial tissue sections obtained 4 weeks post-injury from VWF+/+ and VWF-/- mice were stained using HES (A) or Sirius Red (E) or with antibodies against PCNA (B), α-SMA (C) or VWF (D). M: media; I: intima. Scale bars, 50 μm. **F.** Intima/media ratio and nuclei count in injured carotid arteries (n=9 for VWF+/+ and n=8 for VWF-/-). Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test.

Figure 2: Immunostaining of VWF and α-SMA in different stages of aortic atherosclerosis in human.

A. Detection of VWF in endothelium of healthy human aorta and in the subendothelial layer positive for α-SMA staining. **B**. Fatty streaks showing presence of VWF in the α-SMA-positive neointima. **C**. Subendothelium VWF staining in VSMC-rich fibrocellular cap and VWF accumulation in the acellular lipid core of fibrolipidic plaques. Full morphology of the section (Nanozoomer) were associated with X4 magnification (red boxes) and X20 magnification (black boxes). M, media; I, intima. Scale bars = 2 mm (Nanozoomer), 1 mm (X4 magnification) and 0.2 mm (X20 magnification).

Figure 3: VWF-induced proliferation cultured human VSMCs.

A. Human aortic VSMCs were incubated with VWF or PDGF-BB (0-4 nM) for 24h, and cell proliferation was evaluated. Presented is the proliferative index relative to proliferation with medium alone, which is arbitrarily defined as 1.0. Data represent the mean±SEM of 3 (for PDGF) or 4 experiments (for VWF), each performed in triplicate. **B.** Measure of VWF-induced VSMC proliferation using 3 different methods: incorporation of BrdU (n=7), cell counting (n=4) or analysis of cellular DNA (n=3). Data represent mean±SD. **C.** VSMCs were incubated in the absence or presence of VWF (1 nM) for 24h (grey bars) or 48h (dotted bars). RNA was isolated and quantitative PCR was performed for 9 different markers. Relative changes in RNA expression compared to cells incubated in the absence of VWF are presented. Data are expressed as mean±SD, n=indicated for each condition. **D-G**. Phosphorylation of Akt, ERK1/2, p38-MAPK and Src was assessed after exposing cells to 1 nM VWF for 5 to 60 min. Cell lysates were prepared and phosphorylation of Akt (Thr^{308}), ERK1/2 (Thr^{202}/Tyr^{204}), p38-MAPK (Thr^{179}/Tyr^{181}) or Src (Tyr^{418}) was determined using colorimetric cell-based elisa kits. Data represent mean±SD (n=4), and results are expressed as fold increase relative to unstimulated control. Statistical analysis was performed using one-way Anova with Dunnett's multiple comparison.

Figure 4: Involvement of $\alpha_v\beta_3$ in VWF-mediated VSMC proliferation

A-B: Confocal immunostaining of VWF (red) and $\alpha_v\beta_3$ (panel A; green) or PAR2 (panel B; green) in VSMCs incubated for 24h at 37°C in the absence or presence of VWF (1 nM). Nuclei were counterstained using DAPI. Images were acquired using stacks (1 µm) in sequential for the three channels (488, 555 & 633 nm). Bars represent 25 µm, objective 40x. The Pearson's correlation coefficient was obtained by Image J software using the plugin *colocalization finder*. Data are expressed as mean±SD. N=33 cells for α_V without VWF; n=54 for α_V with VWF; n=64 for PAR2 without VWF and n=42 for PAR with VWF. Statistical analysis involved a Mann-Whitney test. **C**. Proliferative index of human VSMCs transfected with control siRNA or siRNA against α_v and incubated with 1 nM VWF for 24h. **D-E**. Proliferative index of human VSMCs treated with VWF (1 nM) for 24h in the presence the LM609 antibody (10 µg/ml) or after pre-treatment of the cells with a cyclic RGDPV peptide (1 mM; panel D) or synthetic myristoylated RGT/GRT peptides (250 µM; panel E). Experiments were reproduced three times in triplicate (C-E) and statistical analysis was performed using one-way Anova with Tukey's multiple comparison.

Figure 5: Identification of the VWF molecular determinant involved in mediating VSMC proliferation. A. Proliferative index of human VSMCs pretreated with GST-RAP (1 µM) or a mixture of GST-RAP and synthetic myristoylated RGT/GRT peptides (250 µM) prior addition of 1 nM VWF for 24h. Data represent mean±SD; n=6 for No VWF, VWF and GST-RAP; n=3 for VWF+GST-RAP, VWF+RGT-myr+GST-RAP and VWF+GRT-myr+GST-RAP (with each experiment performed in triplicate). **B.** Proliferative response of human VSMCs following incubation with VWF or VWF/ristocetin (0-4 nM). Data represent mean±SEM of 3 independent experiments. **C.** Schematic representation of the domain structure of VWF. **D.** Proliferative index of human VSMCs in response to VWF (1 nM), PDGF (0.2 nM) or various VWF-fragments (100 ng/ml) (mean±SD; n is indicated for each condition). **E.** A wound healing scratch assay was performed on human VSMCs in the absence or presence of VWF-A2/Fc (100 ng/ml). Reappearance of cells in the wounded area was monitored at t=0,16, 24 and 48h and quantified using ImageJ Software. Data represent mean±SD (n=3). **F.** Proliferative index of human VSMCs pretreated with GST-RAP (1 µM) or a mixture of GST-RAP and synthetic myristoylated RGT/GRT peptides (250 µM) prior addition of 100 ng/ml VWF-A2/Fc for 24h. **G.** Phosphorylation of ERK1/2 was assessed after exposing cells to 1 nM VWF for 5 to 60 min. Cell lysates were prepared and phosphorylation of ERK1/2 (Thr^{202}/Tyr^{204}) was determined using colorimetric cell-based elisa. Data represent mean±SD (n=4), and results are expressed as fold increase relative to unstimulated control. Statistical analysis was performed using one-way Anova with Tukey's (panels A, D, F) or Dunnett's (panel G) multiple comparison or using multiple t-test (panel E).

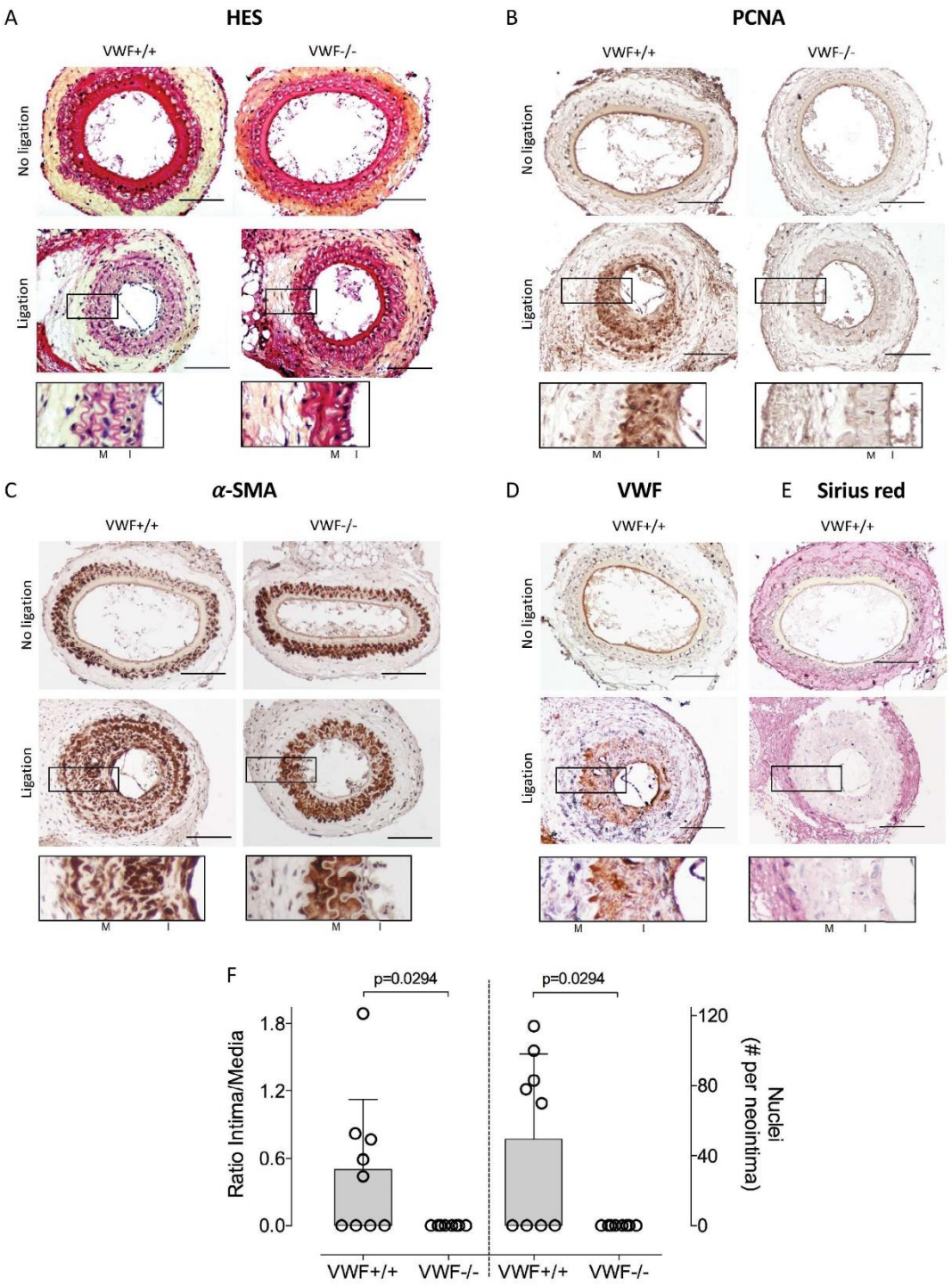
Figure 6: Involvement of LRP4 in VWF-mediated VSMC proliferation

A. Immobilized LRP variants (1 µg/ml) were incubated with VWF (0-7.5 µg/ml) in the absence of VWF activator. Bound-VWF was probed by a peroxidase-coupled polyclonal anti-VWF antibody. Data represent mean±SD (n=3). Closed circles: LRP4; open circles: LRP1; open squares LRP5; closed squares LRP8. **B.** Immobilized LRP4 (1 µg/ml) was incubated with VWF-A2/Fc (closed triangles) or VWF-A3/Fc (open triangles; 0-15 µg/ml). Bound-VWF fragments were probed using peroxidase-coupled polyclonal anti-Fc antibodies. Data represent mean±SD (n=3). **C.** Fluorescent immunostaining of LRP4 on VSCMCs. Nuclei were counterstained using DAPI. Representative images were acquired using confocal microscopy. Bars represent 25 µm for objective 40x or 10 µm for objective 100x. **D.** VSMCs incubated in the presence or absence of VWF were stained using anti-LRP4 (green) and anti-VWF (red) antibodies. Nuclei were counterstained using DAPI. Shown are representative merged images acquired using confocal microscopy. Bars represent 25 µm. **E.** Proliferative index of human VSMCs transfected with control siRNA or siRNA against LRP4 and incubated with 1 nM VWF for 24h. Experiment was reproduced three times in triplicate and statistical analysis was performed using one-way Anova with Tukey's multiple comparison.

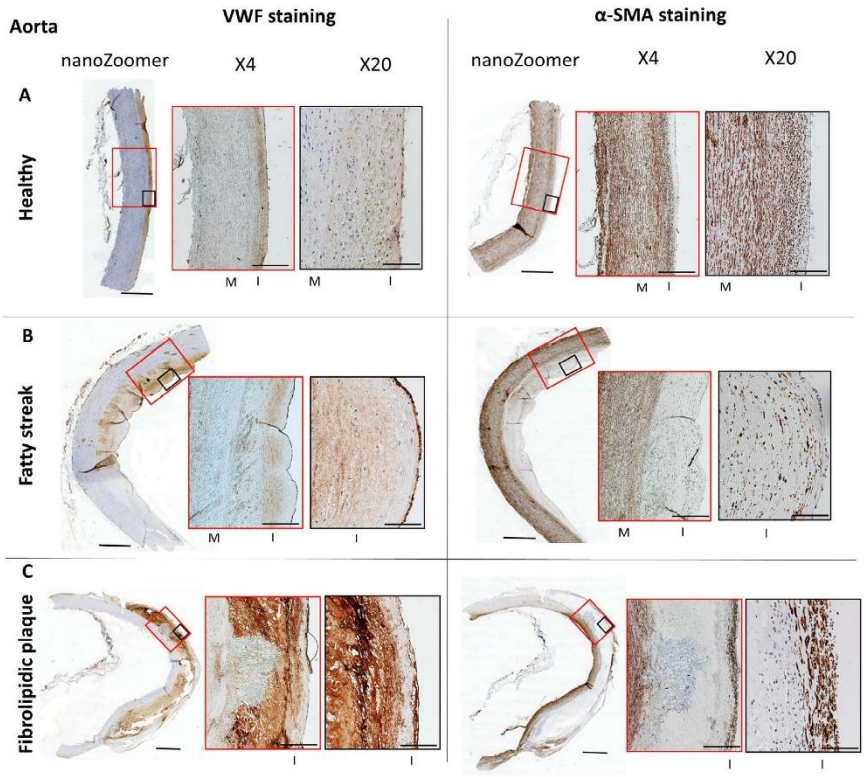
Figure 7: Association between $\alpha_v\beta_3$ and LRP4 on VSMCs and effect on MAPK signaling pathways

A-C. Duolink-proximity ligation assay (PLA) analysis of LRP4 and $\alpha_v\beta_3$ expression and colocalization on VSMCs. Panels A-B represents control conditions in the presence of only one primary antibody (A: anti-α_V, B: anti-LRP4) and both secondary antibodies with fluorescent probes. Panel C represents test conditions (both primary and secondary antibodies with fluorescent probes). Red spots appear only when $\alpha_v\beta_3$ and LRP4 are within a distance of ≤40 nm. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars: 10µm, Objective 63x. **D.** VSMCs incubated in the presence or absence of VWF were lysed, and immunoprecipitated using anti α_V-antibodies or control antibodies. Western blots of lysates were first stained using anti α_V-antibodies and subsequently with anti-LRP4 antibodies. **E-F.** Phosphorylation of Akt, ERK1/2, p38-MAPK and Src was assessed after exposing cells transfected with control or siRNA against LRP4 to 1 nM VWF for 10 min. Cell lysates were prepared and phosphorylation of Akt (Thr^{308}), ERK1/2 (Thr^{202}/Tyr^{204}), p38-MAPK (Thr^{179}/Tyr^{181}) or Src (Tyr^{418}) was determined by Western blotting. Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence and quantified using a luminescent image analyzer system. Data represent mean±SD (n=3) and results are expressed as fold increase relative to unstimulated control. Statistical analysis was performed using t-test.

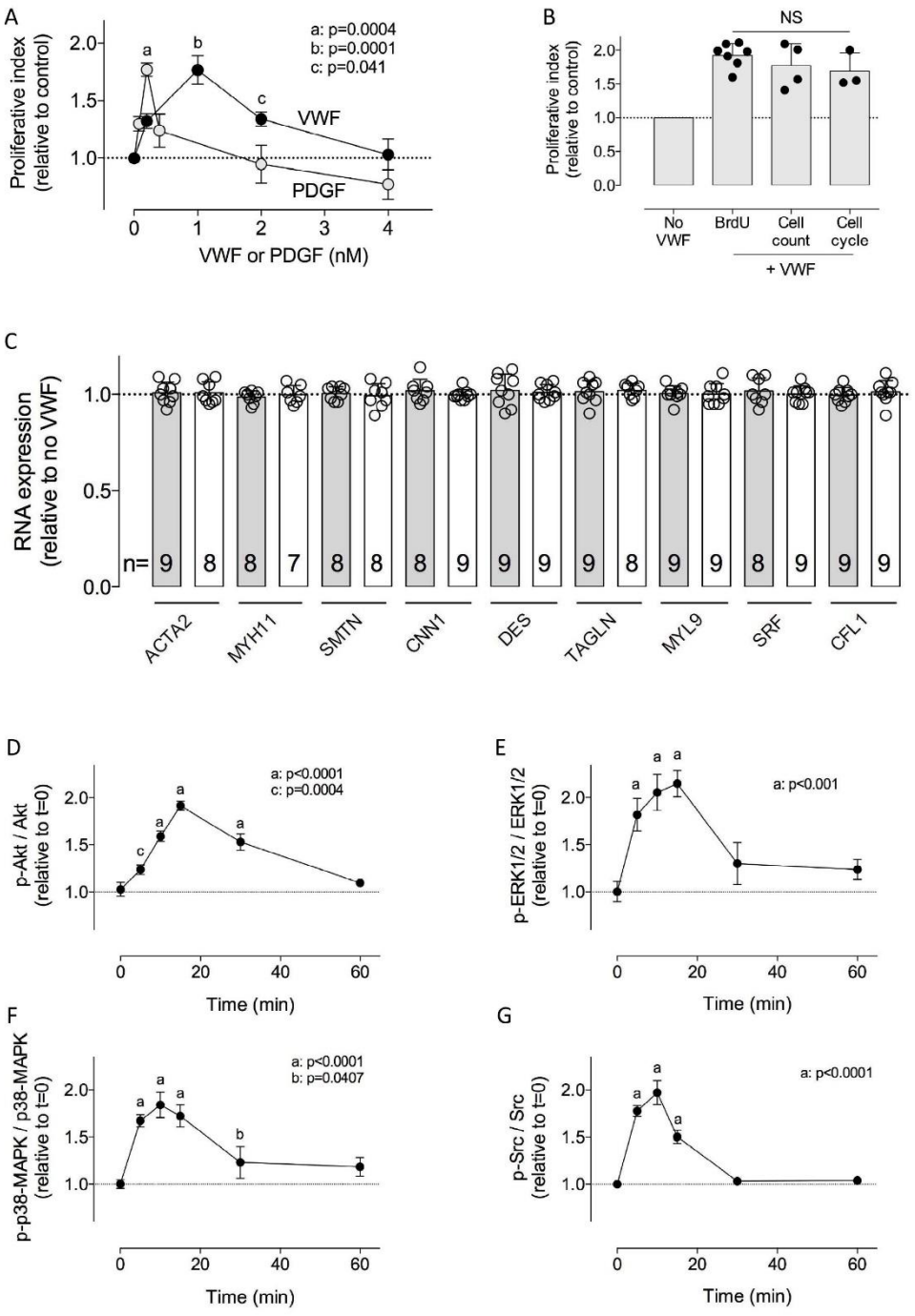
Lagrange, Worou et al
Fig. 1



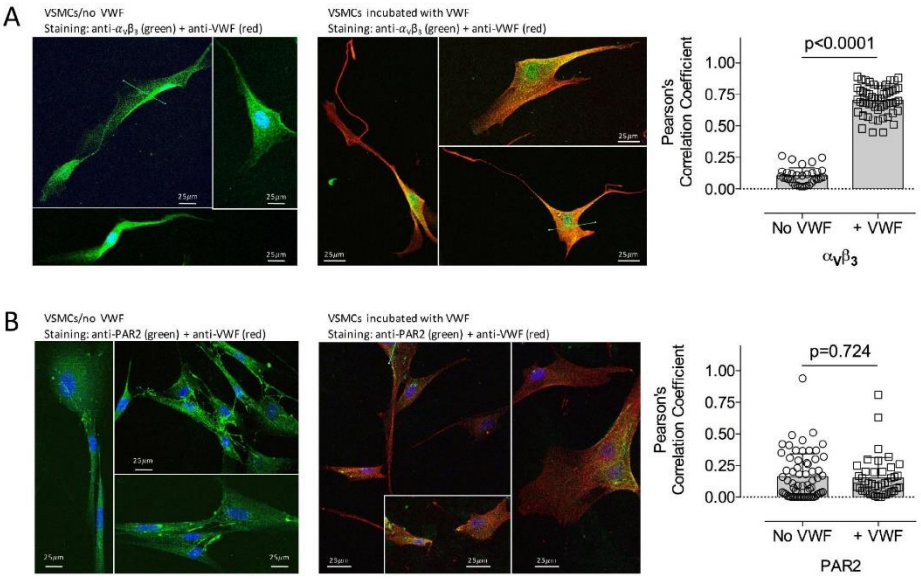
Lagrange, Worou et al
Fig. 2

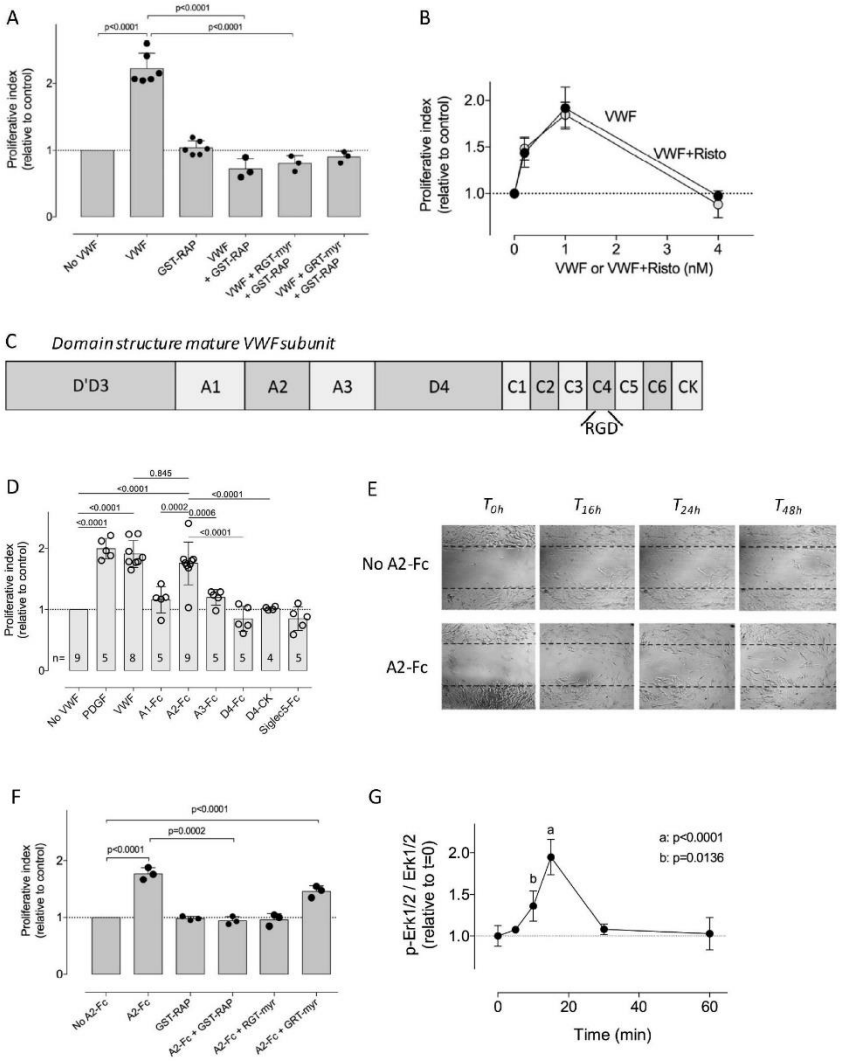


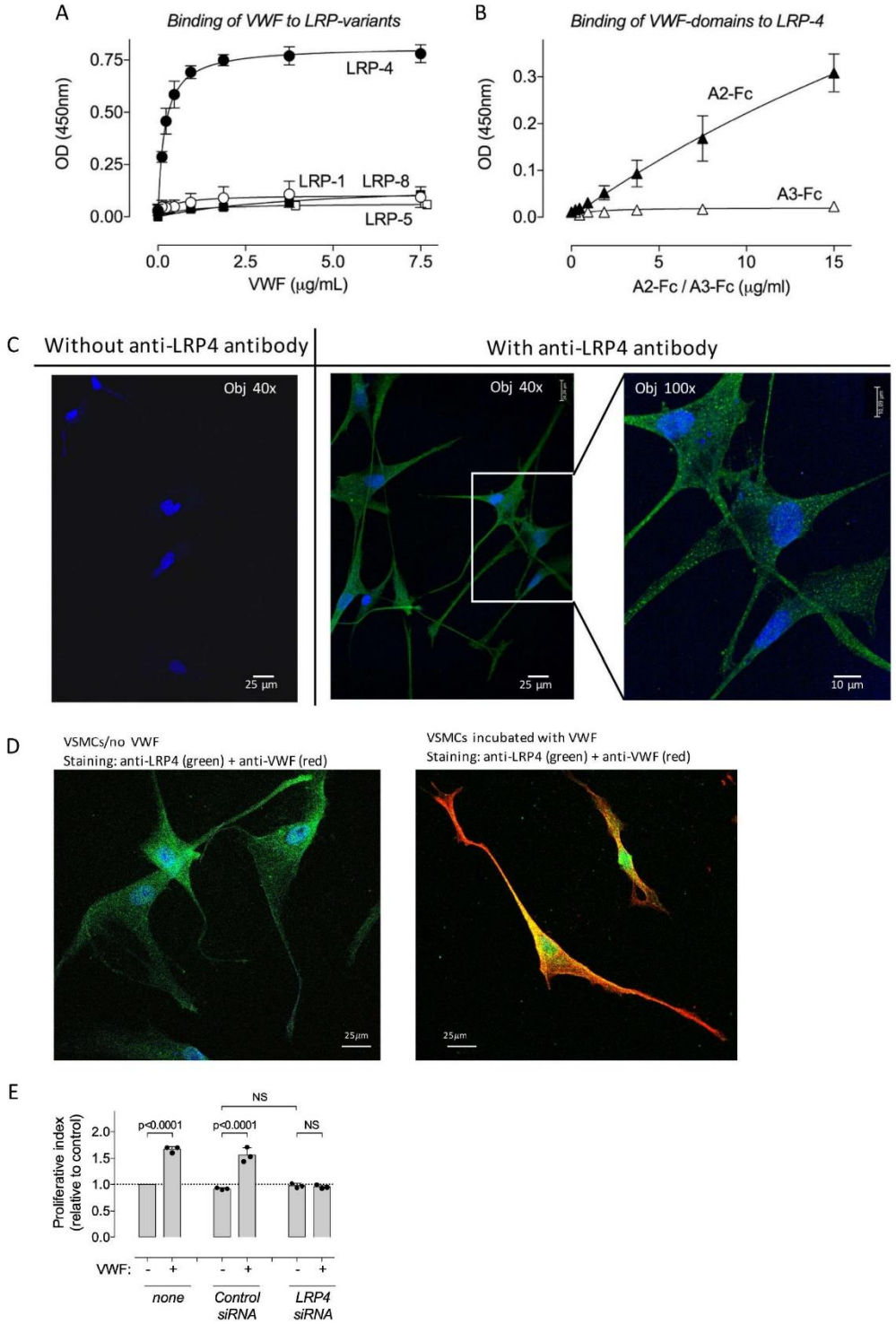
Lagrange, Worou et al
Fig. 3

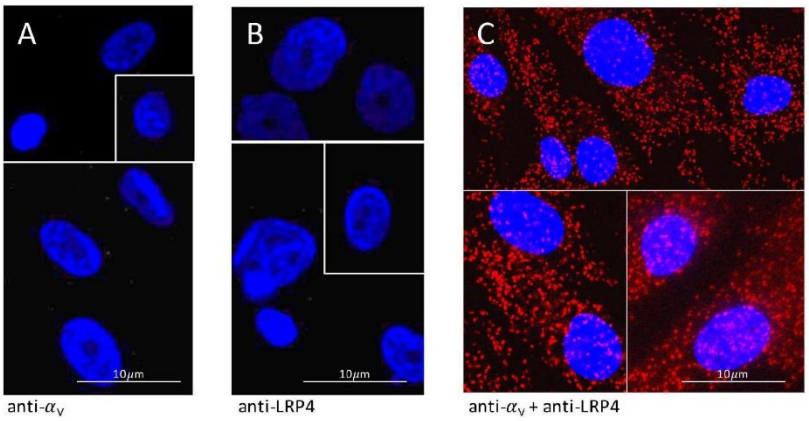


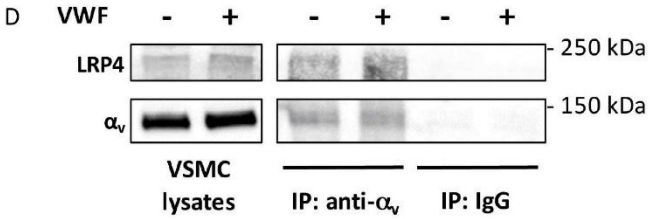
Lagrange, Worou et al
Fig. 4

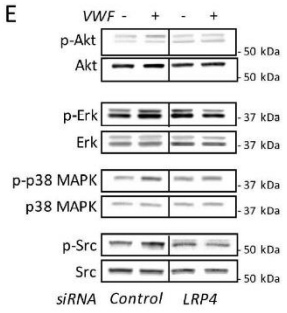


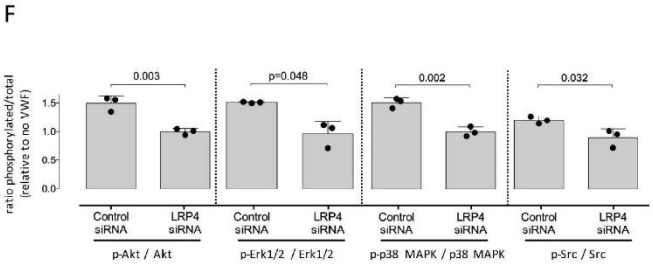

A
Proliferative index (relative to control)
p<0.0001
p<0.0001
p<0.0001
No VWF
VWF
GST-RAP
VWF + GST-RAP
VWF + RGT-myr + GST-RAP
VWF + GRT-myr + GST-RAP
B
Proliferative index (relative to control)
VWF
VWF+Risto
VWF or VWF+Risto (nM)
C
Domain structure mature VWF subunit
D'D3
A1
A2
A3
D4
C1
C2
C3
C4
C5
C6
CK
RGD
D
Proliferative index (relative to control)
n= 9 5 8 5 9 5 5 4 5
No VWF
PDGF
VWF
A1-Fc
A2-Fc
A3-Fc
D4-Fc
D4-CK
Siglec5-Fc
E
T_{0h}
T_{16h}
T_{24h}
T_{48h}
No A2-Fc
A2-Fc
F
Proliferative index (relative to control)
p<0.0001
p=0.0002
p<0.0001
No A2-Fc
A2-Fc
GST-RAP
A2-Fc + GST-RAP
A2-Fc + RGT-myr
A2-Fc + GRT-myr
G
p-Erk1/2 / Erk1/2 (relative to t=0)
a: p<0.0001
b: p=0.0136
Time (min)


A
Binding of VWF to LRP-variants
OD (450nm)
0.75
0.50
0.25
0.00
LRP-4
LRP-1
LRP-8
LRP-5
0.0
2.5
5.0
7.5
VWF (µg/mL)
B
Binding of VWF-domains to LRP-4
OD (450nm)
0.3
0.2
0.1
0.0
A2-Fc
A3-Fc
0
5
10
15
A2-Fc / A3-Fc (µg/ml)
C
Without anti-LRP4 antibody
With anti-LRP4 antibody
Obj 40x
25 µm
Obj 40x
25 µm
Obj 100x
10 µm
D
VSMCs/no VWF
Staining: anti-LRP4 (green) + anti-VWF (red)
25µm
VSMCs incubated with VWF
Staining: anti-LRP4 (green) + anti-VWF (red)
25µm
E
Proliferative index
(relative to control)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
p<0.0001
p<0.0001
NS
NS
VWF: - + - + - +
none
Control siRNA
LRP4 siRNA


A
B
C
10µm
10µm
10µm
anti-α_V
anti-LRP4
anti-α_V + anti-LRP4


D
VWF - + - + - +
LRP4
α_v
250 kDa
150 kDa
VSMC lysates
IP: anti-α_v
IP: IgG


E
VWF - + - +
p-Akt
Akt
p-Erk
Erk
p-p38 MAPK
p38 MAPK
p-Src
Src
50 kDa
37 kDa
siRNA Control LRP4


F
ratio phosphorylated/total (relative to no VWf)
0.003
p=0.048
0.002
0.032
Control siRNA
LRP4 siRNA
p-Akt / Akt
p-Erk1/2 / Erk1/2
p-p38 MAPK / p38 MAPK
p-Src / Src

Supplementary materials

Jérémy Lagrange[#1], Morel E. Worou[#1], Jean-Baptiste Michel[2], Alexandre Raoul[1], Mélusine Didelot[1], Vincent Muczynski[3], Paulette Legendre[3], François Plénat[4], Guillaume Gauchotte[5], Marc-Damien Lourenco-Rodrigues[3], Olivier D. Christophe[3], Peter J. Lenting[3], Patrick Lacolley[1], Cécile V. Denis*[3], Véronique Regnault*[1]

[1] INSERM, UMR_S 1116, Vandœuvre-lès-Nancy, France; Université de Lorraine, DCAC, Nancy, France.

[2] INSERM, UMR_S 1148, LVTS, Université de Paris, France

[3] HITh, UMR_S1176, INSERM, Université Paris-Saclay, 94276, Le Kremlin-Bicêtre, France

[4] Université de Lorraine, Nancy, France.

[5] CHRU, Anatomie et cytologie pathologiques, Nancy, France

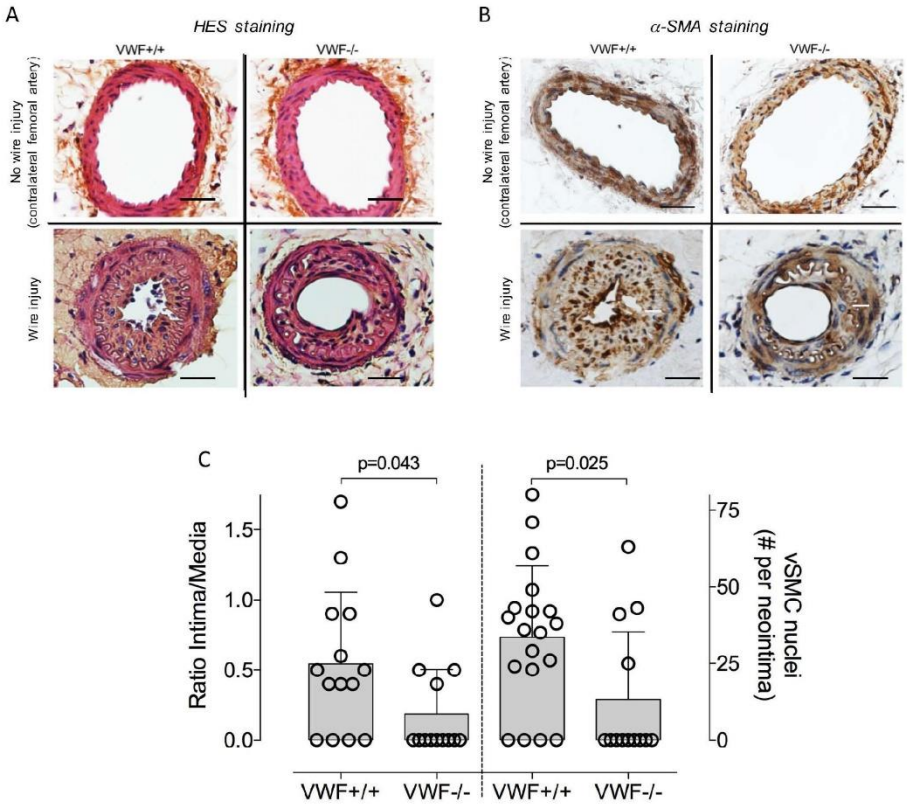
1. Supplementary Tables and Figures

Supplementary Table 1

Carotid artery ligation model			
Mouse strain	Mice with hyperplasia (n)	Mice without hyperplasia (n)	
VWF+/+	5	4	*p*=0.015
VWF-/-	0	8	
Femoral artery denudation model			
Mouse strain	Mice with hyperplasia (n)	Mice without hyperplasia (n)	
VWF+/+	10	4	*p*=0.038
VWF-/-	4	9	

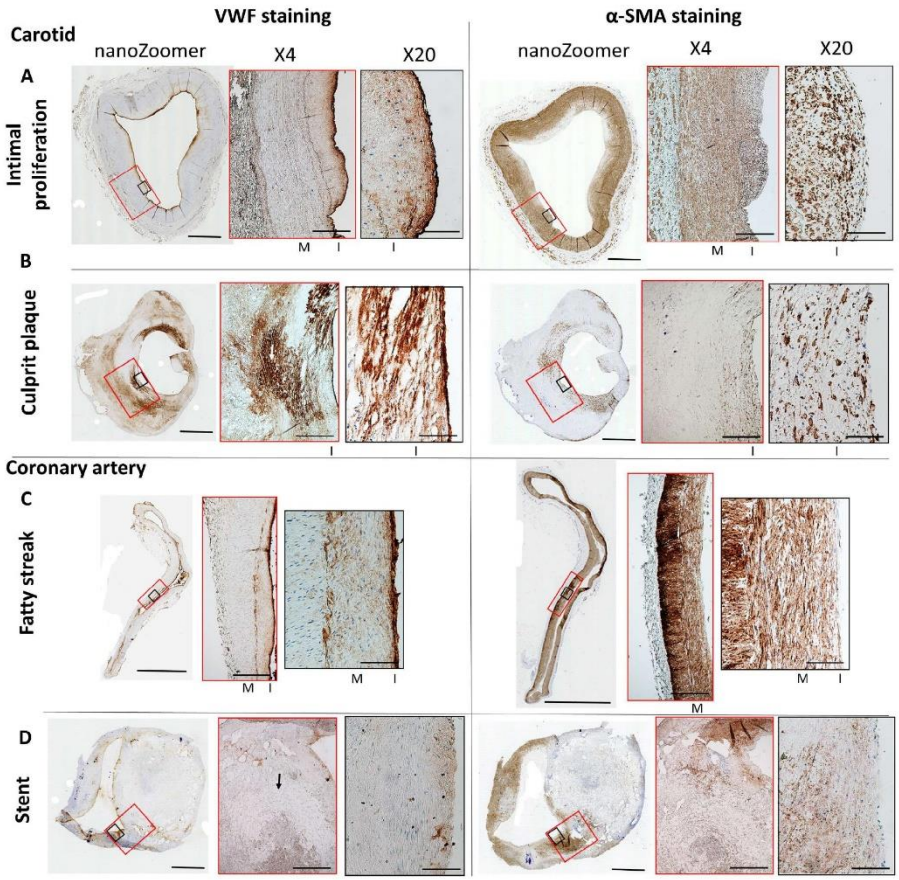
p-values were calculated using the N-1 Chi-square test.

Supplementary figure S1



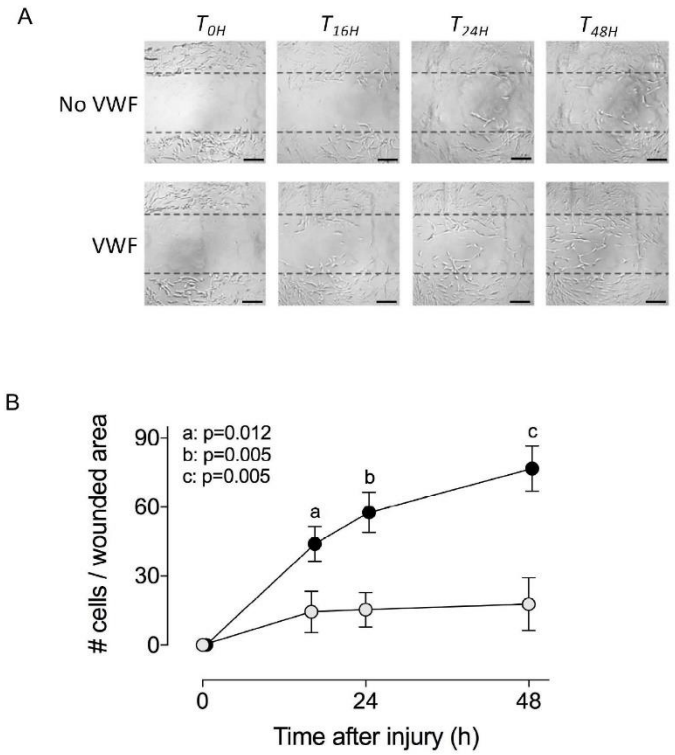
A-B. HES (panel A) and α-SMA (panel B) staining showing intimal hyperplasia in the femoral artery 4 weeks post injury in VWF+/+ and VWF-/- animals. Scale black bars, 50 µm. **C**. Intima/media ratio and nuclei count in injured femoral arteries (n=14 and 13 for VWF+/+ and VWF-/- mice respectively). Statistical analysis was performed using a Mann-Whitney test.

Supplementary figure S2



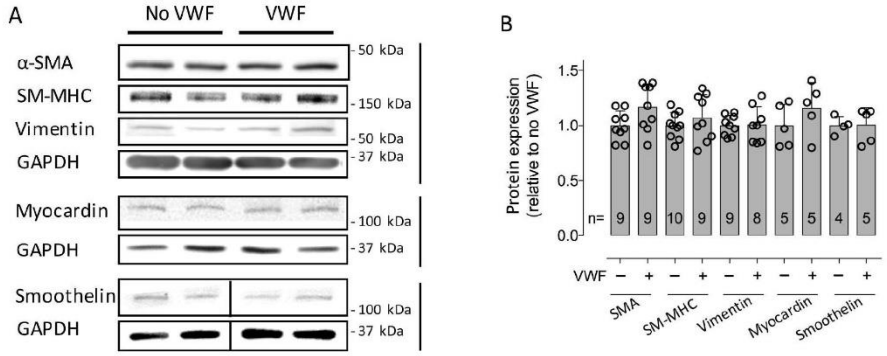
Immunostaining of VWF and α-SMA in different atherosclerotic stages of carotid and coronary arteries. **A.** Detection of VWF in endothelium and intimal proliferation (α-SMA-rich area) in primitive carotid artery. **B.** Culprit plaque (surgical endarteriectomy) showing VWF accumulation in the fibrocellular cap and in external intraplaque hemorrhagic areas (white arrow). **C.** VWF deposits in the α-SMA-positive neointima of coronary fatty streaks. **D.** Neo-atherosclerosis in area of coronary artery stenting showing VWF accumulation in the subendothelial α-SMA-rich area of the shoulder of the stented plaque (black arrow). Full morphology of the section (nanoZoomer) were associated with X4 magnification (red boxes) and X20 magnification (black boxes). M, media; I, intima. Scale bars: nanoZoomer: 2 mm; X4: 1 mm; X20: 0.2 mm.

Supplementary figure S3



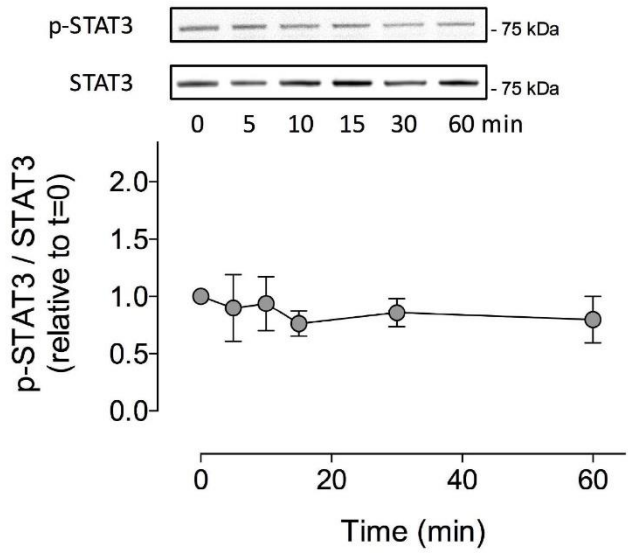
A wound healing scratch assay was performed on human VSMCs in the absence or presence of VWF (1 nM). Reappearance of cells in the wounded area was monitored at t=0,16, 24 and 48h (A) and quantified using ImageJ Software (B). Data represent mean±SD with n=3. Scale bars = 0.1 mm. Statistical analysis was performed using multiple t-test.

Supplementary figure S4



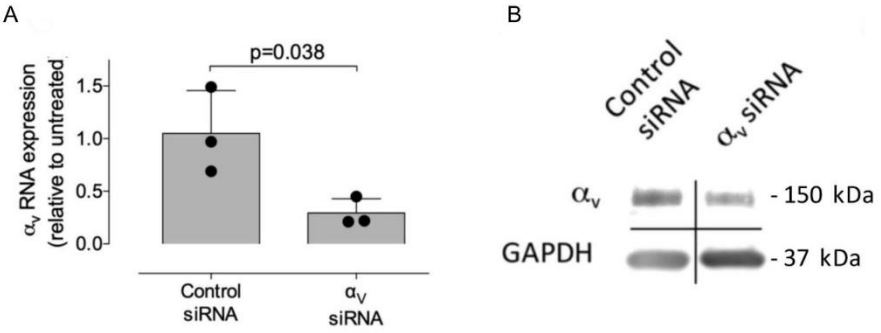
Expression of VSMC differentiation markers was analyzed following incubation with VWF (1 nM) for 24h via Western blotting of cell lysates using antibodies against α-SMA, vimentin, SM-MHC, myocardin or smoothelin. Data represent mean±SD, and n is indicated for each condition. Shown is the relative change in expression. Vertical bars next to panel A indicate bands analyzed on the same gels.

Supplementary figure S5



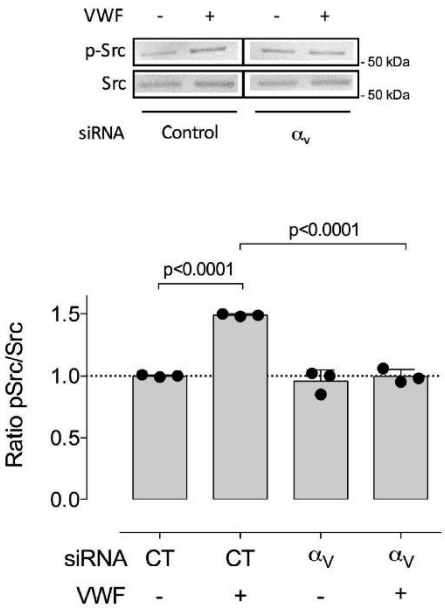
Phosphorylation of STAT3 was assessed after exposing cells to 1 nM VWF for 5 to 60 min. Cell lysates were prepared and phosphorylation of STAT3 (Tyr^{705}) was determined by Western blotting using primary rabbit antibodies (1/1000). Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence and quantified using a luminescent image analyzer system. Experiment was reproduced three times and results are expressed as fold increase relative to unstimulated control. Graph represents mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed using one-way Anova with Dunnett's multiple comparison. No significant difference was measured at any time point.

Supplementary figure S6



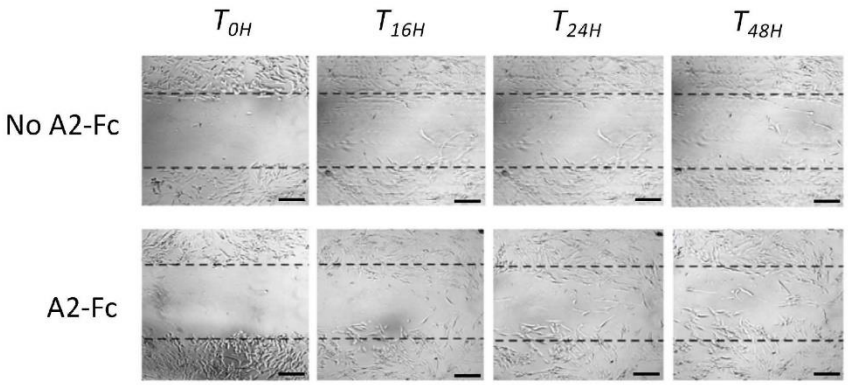
α_v residual RNA (A) or protein (B) expression in VSMCs following transfection with control or siRNA to α_v. Data represent mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed using unpaired t-test.

Supplementary figure S7



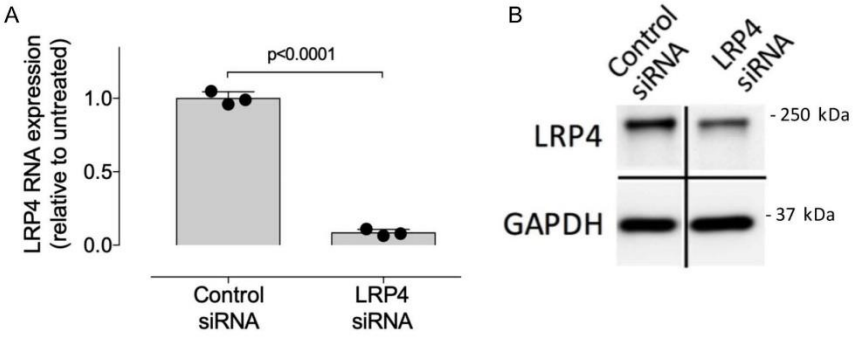
Phosphorylation of Src was assessed after exposing cells transfected with control siRNA or siRNA against α_v to 1 nM VWF for 15 min. Cell lysates were prepared and phosphorylation of Src (Tyr^{416}) was determined by Western blotting using primary rabbit antibodies (1/1000). Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence and quantified using a luminescent image analyzer system. Experiment was reproduced three times and results are expressed as fold increase relative to unstimulated control. Data represent mean±SD (n=3). Statistical analysis was performed using one-way Anova with Tukey's multiple comparison.

Supplementary figure S8



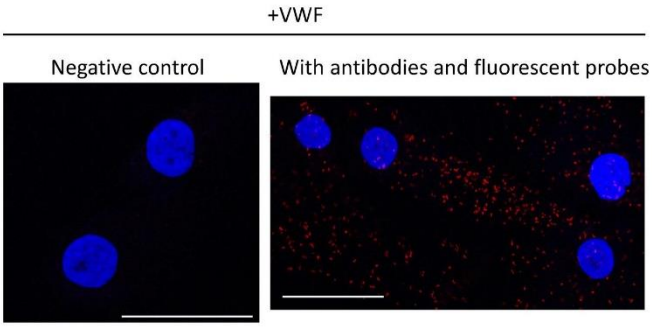
A wound healing scratch assay was performed on human VSMCs in the absence or presence of VWF-A2/Fc (100 ng/ml). Reappearance of cells in the wounded area was monitored at t=0,16, 24 and 48h and quantified using ImageJ Software. Scale bars= 0.1 mm.

Supplementary figure S9



LRP4 residual RNA (A) or protein (B) expression in VSMCs following transfection with control or siRNA to LRP4. Statistical analysis was performed using unpaired t-test. Data represent mean±SD (n=3).

Supplementary figure S10



Duolink®-PLA analysis of LRP4 and $\alpha_v\beta_3$ expression and colocalization on VSMCs treated with VWF (1 nM). Left panel (negative control) represents conditions in the absence of fluorescent probes. Right panel represent test conditions with primary and secondary antibodies and fluorescent probes. Red spots appear only when LRP4 and $\alpha_v\beta_3$ are within a distance ≤40nm. Nuclei were counterstained with DAPI. Scale bars: 5 µM, Objective 63x.

2. Supplementary material and methods

2.1 Major Resources Tables

2.1.1 Reagents and cells

Name	Vendor or Source
Human aortic Vascular Smooth Muscle Cells	Lonza (Levallois-Perret, France)
Smooth Muscle Cell Growth Medium-2	Lonza (Levallois-Perret, France)
Recombinant human Platelet-derived growth factor	Bio-Techne (Lille, France)
Placenta-derived LRP1	BioMac (Leipzig, Germany)
Recombinant human LRP4	Bio-Techne
Recombinant human LRP8	Bio-Techne
Recombinant human LRP5	Novus Biologicals (Lille, France)
MATra-Si Reagent (Magnet Assisted Transfection)	Thermo Fisher Scientific (Illkirch-Graffenstaden, France)
BrdU Cell Proliferation Assay Kit	Cell Signalling Technologies (Saint Quentin en Yvelines, France)
Cell-based ELISA for detecting phospho-ERK1/2 ($pThr^{202}$/$pThr^{204}$) in cultured cell lines (RAB0350)	Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)
Src (p-Tyr418) colorimetric cell-based ELISA kit (EKC1967)	Boster Bio/ Clinisciences (Nanterre, France)
Akt (p-Thr308) colorimetric cell-based ELISA kit (EKC2635)	Boster Bio/ Clinisciences (Nanterre, France)
P38-Mapk (p-Thr179/p-Tyr181) colorimetric cell-based ELISA kit (EKC2199)	Boster Bio/ Clinisciences (Nanterre, France)
Dynabeads Protein G-immunoprecipitation kit	Invitrogen

2.1.2 Antibodies

Name	Vendor or Source	Clone or reference
Immunostaining- primary antibodies		
Mouse monoclonal antibody against PCNA	Abcam (Paris, France)	ab29
Rabbit polyclonal antibodies against VWF	Dako	A0082
Pool of monoclonal antibodies to human von Willebrand factor	Home-made	
Mouse monoclonal antibody against PAR-2	Santa Cruz Biotechnology	Sc-13504
Mouse monoclonal antibody against human LRP4	Bio-Techne	MAB5948
Rabbit polyclonal antibodies to human $\alpha_v\beta_3$ integrin	Bioss Antibodies, Clinisciences	bs-1310F
Mouse monoclonal antibody against human $\alpha_v\beta_3$ integrin	Merck (Fontenay-sous-Bois, France),	MAB1976/Clone LM609
Rabbit monoclonal antibody against α_V	Abcam (Paris, France)	Ab179475
Normal rabbit IgG	Sigma-Aldrich	I8140
Secondary antibodies		
Secondary horseradish peroxidase (HRP)-linked antibodies	GE Healthcare Life Sciences (Velizy-Villacoublay, France)/Abcam	

Secondary fluorescent antibodies	GE Healthcare Life Sciences	
Secondary biotinylated antibodies	Agilent Technologies	
Anti Fc-HRP	Sanquin (Amsterdam, The Netherlands)	A5228
Mouse monoclonal antibody against human vimentin	Agilent Technologies (Les Ulis, France)	M0725
Duolink®-Proximity Ligation Assay (Duolink®-PLA) In Situ kit	Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France)	
Differentiation-related antibodies		
Rabbit polyclonal antibodies to Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SM-MHC)	Abcam (Paris, France)	ab125884
Rabbit polyclonal antibodies to Myocardin	Abcam (Paris, France)	ab107301
Rabbit polyclonal antibodies to Smoothelin	Abcam (Paris, France)	ab219652
Mouse monoclonal antibody to human α-SMA	Leica Biosystems (Newcastle, UK)	NCL-L-MSA/Clone alpha SM-1
Goat polyclonal antibodies to vimentin	Santa Cruz Biotechnology	Sc-25778
Rabbit polyclonal antibodies to GAPDH	Clinisciences (Nanterre, France)	sc-25778
Signaling-related antibodies		
Rabbit monoclonal antibody to p-ERK1/2	Cell Signaling Technologies,	D13.14.4E
Rabbit monoclonal antibody to total ERK1/2	Cell Signaling Technologies	137F5
Rabbit monoclonal antibody to p-p38-MAPK	Cell Signaling Technologies	3D7
Rabbit polyclonal antibodies to p38-MAPK	Cell Signaling Technologies	9212
Rabbit polyclonal antibodies to p-Akt	Cell Signaling Technologies	9275
Rabbit polyclonal antibodies to total Akt	Cell Signaling Technologies	9272
Rabbit polyclonal antibodies to Src	Cell Signaling Technologies	21085
Rabbit polyclonal antibodies to p-Src	Cell Signaling Technologies	2101
Rabbit polyclonal antibodies to pSTAT3	Cell Signaling Technologies	9145
Mouse monoclonal antibody against STAT3	Cell Signaling Technologies	124H6

2.1.3 Inhibitors

Name	Vendor or Source	Target
LRPAP1 (RAP or receptor associated protein)	Abcam	Pan-LRP inhibitor
Synthetic myristoylated RGT peptide	GL Biochem (Shanghai, China)	Inhibitor of outside-in signaling mediated by β3 integrin subunit

Synthetic myristoylated control GRT peptide	GL Biochem	Control peptide
Short interfering RNA (siRNA) against human LRP4	GeneCust (Ellange, Luxembourg)	Inhibitor of LRP4 expression
Short interfering RNA (siRNA) against human α_v	GeneCust	Inhibitor of α_v expression
Cyclic RGDPV peptide	Bachem (Bubendorf, Switzerland)	Inhibitor of $\alpha_v\beta_3$ ligand binding

2.1.4 Sequences

Name	Sequence
Short interfering RNAs (siRNA) against human LRP4 (5'-3')	5'-GCA AAG UAC UGA UCA ACA A 5'-GCU ACU GGC AUG AGU GAA A 5'-UGG AAG GAC UCA UGG AUA U
siRNAs against human α_v (5'-3')	5'-GCC AGC CAA UUG AAU UUG ATT 5'-GGC UGU CGG AGA UUU CAA UTT 5'-CCC AGU UGU AUC UCA CAA ATT
Control siRNA (5'-3')	5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT
Forward primer ACTA2	5'-ACTGCCTTGGTGTGTGACAATGG
Reverse primer ACTA2	5'-TGGTGCCAGATCTTTTCCATG
Forward primer MYH11	5'-GGAGGATGAGATCCTGGTCA
Reverse primer MYH11	5'-TTAGCCGCACTTCCAGTTCT
Forward primer SMTN	5'-GGCAGTGTCACTCACGTCAC
Reverse primer SMTN	5'-CTGATCCAGCATCTTGTCCA
Forward primer CNN1	5'-ACATTTTTGAGGCCAACGAC
Reverse primer CNN1	5'-CTCCCACGTTCACCTTGTTT
Forward primer DES	5-CTGAGCAAAGGGGTTCTGAG
Reverse primer DES	5'-TGGCAGAGGGTCTCTGTCTT
Forward primer TAGLN	5'-AAGAATGATGGGCACTACCG
Reverse primer TAGLN	5'-ATGACATGCTTTCCCTCCTG
Forward primer MYL9	5'-ATGTTTGGGGAGAAGCTGAA
Reverse primer MYL9	5'-CCGGTACATCTCGTCCACTT
Forward primer SRF	5'-ATCTGGGACAGTGCAGATCC
Reverse primer SRF	5'-GCGGATCATTCACTCTTGGT
Forward primer CFL1	5'-GCAAGAAGGAGGATCTGGTG
Reverse primer CFL1	5'-GCTTGATCCCTGTCAGCTTC
Forward primer GAPDH	5'-CAGCCTCAAGATCATCAGCA
Reverse primer GAPDH	5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
Forward primer RPS29	5'-AAGATGGGTCACCAGCAGCTGTACTG
Reverse primer RPS29	5'-AGACACGACAAGAGCGAGAA

2.1 Proteins

Plasma-derived VWF was purified from concentrates (Wilfactin, LFB-Biomédicaments, Les Ullis, France) via size separation-chromatography[1]. VWF A1-Fc, A2-Fc, A3-Fc and D4-Fc include VWF residues 1261-1478, 1480-1672, 1681-1878 and 1947-2301, respectively. Proteins were expressed in BHK-cells using the pFuse-plasmid containing a C-terminal sequence of human IgG1 and were dimeric. Fc-tagged

proteins were purified to homogeneity using protein A-sepharose as instructed by the manufacturer (VWF International, Fontenay-sous-Bois, France). Fragment VWF/A1-CK (containing residues 1260-2813 with a N-terminal His-tag) was expressed and purified as described[1].

2.2 Mouse model of femoral artery wire injury

IH was investigated in VWF+/+ and VWF-/- mice using an established neointima formation model of femoral artery wire injury[2]. Briefly, anesthesia was induced by isoflurane inhalation at 3.5% in 1L/min oxygen, and then maintained at 1.5% in 1L/min oxygen during the intervention. After a skin incision, the left femoral artery was isolated under surgical microscope. An arteriotomy was made distal to the epigastric branch, and a 0.35-mm diameter angioplasty guide wire (Abbott Vascular, France) was inserted and pushed three times within the vessel until the aortic bifurcation and removed. The arteriotomy site was then ligated with an 8-0 nylon suture and the incision closed. The right non-operated contralateral femoral artery was used as control. At 4 weeks post-surgery, mice were euthanized via exsanguination under isoflurane anesthesia (1.5% in 1L/min oxygen) in order to collect femoral arteries. Neointimal formation was evaluated by histological analysis.

2.3 Mouse model of carotid artery ligation

Carotid ligation model was performed in VWF+/+ and VWF-/- mice. Anesthesia was induced by isoflurane inhalation. The neck was epilated and disinfected. An incision was made longitudinally in the neck. The left common carotid artery was exposed by blunt dissection. The vessel was ligated with a 6.0 silk suture. At 4 weeks post-surgery, mice were euthanized via exsanguination under isoflurane anesthesia (1.5% in 1L/min oxygen) in order to collect the left common artery as well as the right common carotid as control.

2.4 Tissue processing and histological analysis

At the time of euthanasia, femoral arteries or carotids were exposed and fixed *in situ* with Bouin's fluid for 30 min. The vessels were then harvested and immersed in the same fixative for 24h. Fixed specimens were embedded in paraffin following regular procedures. Five µm thick sections were stained with Hematoxylin-Eosin-Saffron (HES) for morphometric analysis.

2.5 Morphometric analysis and intimal hyperplasia quantification

The HES-stained sections images were examined for the extent of neointimal formation. The luminal, intimal and medial areas of each section were calculated by encircling the lumen edge, internal and external elastic lamina, respectively, using a Nikon's NIS Elements Basic Research microscope imaging software. The intima-to-media (I/M) ratio was calculated as described[3]. Nuclei from the neointima were counted in mice displaying neointimal hyperplasia after femoral artery injury or common carotid ligation.

2.6 Flow cytometry

Cell cycle progression was determined by propidium iodide (PI, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) staining using flow cytometry. Cells were fixed with 70% cold ethanol at 4°C overnight. Then, cells were rehydrated and washed twice with ice-cold PBS, and incubated with 10 mg/ml RNase (Sigma) at 37°C. Cell cycle was monitored by using PI staining of nuclei (50 µg/ml). Stained samples were analyzed on a flow cytometer (Gallios-Kalusa software Beckman Coulter). A minimum of 10,000 events were collected. Doublets and aneuploid cells were excluded.

2.7 Immunofluorescence staining of VSMCs

VSMCs were grown on glass coverslips and fixed with 4% (w/v) buffered formaldehyde solution prepared by depolymerization of paraformaldehyde. After blocking of non-specific binding sites with PBS-tween-20, 5% BSA for 30 min, primary antibodies directed against VWF, $\alpha_v\beta_3$ integrin or LRP4 were incubated 2h at RT in PBS/BSA (1%) and secondary antibodies were incubated 1h at RT. Nuclei were counterstained with 1 µg/mL of 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and coverslips were mounted with Prolong Gold antifade reagent (Life Technologies) and stored at -20°C. Negative controls were performed by omitting the primary antibody or the VWF treatment.

For confocal microscopy, images were acquired using a scanning laser confocal Leica TCS SP5 X with a 40x water objective lens. Images were acquired using stacks (1 µm steps) in sequential for the three channels (488, 555 & 633 nm). Images were analyzed by Image J software using the plugin *colocalization finder* which calculated the Pearson's coefficient based on mean pixel intensity. Cells were marked as regions of interest (ROIs) in the images. Using the ROI scatterplot of the plugin we subtracted the

background and measured the Pearson's coefficient. Values in the range [-1, 1], are obtained using this test with 0 indicating that there is no discernable correlation and -1 and +1 meaning strong negative or positive correlations[4].

For the Duolink®- Proximity Ligation Assay (PLA) to detect close proximity between different proteins, double immunostaining of human VSMCs (treated or not with VWF) was performed using primary antibodies to LRP4 and $\alpha_v\beta_3$ integrin, the secondary antibodies being replaced by PLA probes. The remainder of the protocol was conducted according to the manufacturer's recommendations using the 550 nm wavelength detection kit. Hybridization between the two PLA probes leading to the fluorescent signal only occurs when the distance between the two detected antigens is less than 40 nm. For confocal microscopy, a Nikon C2 microscope with Ti-FL stage and C-HGFi fluorescent bulb was used. Acquisition was performed with the NiS Elements software.

2.8 Immuno-precipitation experiments

Equal amounts of VSMC-lysate (100 μg protein) were incubated with the rmonoclonal rabbit anti-α_V integrin antibody (Abcam, ab179475) or with normal rabbit IgG (Sigma-Aldrich, I8140). Protein/antibody complexes were then immunoprecipiated using the Dynabeads Protein G-immunoprecipitation kit (Invitrogen).

2.9 Quantitative PCR of cell-differentiation markers

Total RNA was extracted from VSMCs using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Les Ulis, France). First strand cDNA was synthesized according to the manufacturer's instructions (Fermentas; Thermo-Fisher Scientific). Quantitative real-time PCR analysis was then performed using SYBR green PCR technology (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Sequence of the primers have been listed in Supplementary table 2.1.4.

3. Supplementary references

1. Lenting PJ, Westein E, Terraube V, Ribba AS, Huizinga EG, Meyer D, de Groot PG, Denis CV. An experimental model to study the in vivo survival of von Willebrand factor. Basic aspects and application to the R1205H mutation. *J Biol Chem* 2004;**279**:12102-12109.
2. Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Zhang WX, Taubman MB, Reis ED. Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;**20**:335-342.

3. Smirnova NF, Gayral S, Pedros C, Loirand G, Vaillant N, Malet N, Kassem S, Calise D, Goudouneche D, Wymann MP, Hirsch E, Gadeau AP, Martinez LO, Saoudi A, Laffargue M. Targeting PI3Kgamma activity decreases vascular trauma-induced intimal hyperplasia through modulation of the Th1 response. *J Exp Med* 2014;**211**:1779-1792.
4. French AP, Mills S, Swarup R, Bennett MJ, Pridmore TP. Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nat Protoc* 2008;**3**:619-628.

Dans cette étude la colocalisation entre les CMLVs et le VWF a été observée dans la néointima mais pas dans la média des artères pathologiques supposant que l'interaction aurait uniquement lieu à l'endroit des CMLVs en prolifération.

Le traitement des CMLVs *in vitro* par des concentrations de VWF a augmenté d'un facteur 2 la prolifération cellulaire. Le marquage de VWF et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a permis d'observer une colocalisation à la surface des cellules par microscopie confocale. De même, en présence du peptide inhibiteur dirigé contre la séquence RGD, les CMLVs voyaient leur potentiel prolifératif divisé par 2. L'interaction de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le récepteur LRP4 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 4, par son domaine A2) fixe le VWF et permet l'activation des voies de signalisation d'Akt, de p38-MAPK, ERK et de Src responsable de la prolifération des CMLVs (**Figure 30**).

Le modèle in-vivo de ligature de la carotide de souris montre des résultats similaires à ceux observés pour les aortes humaines, en effet on observe un co-marquage des CMLVs et du VWF dans la néointima.

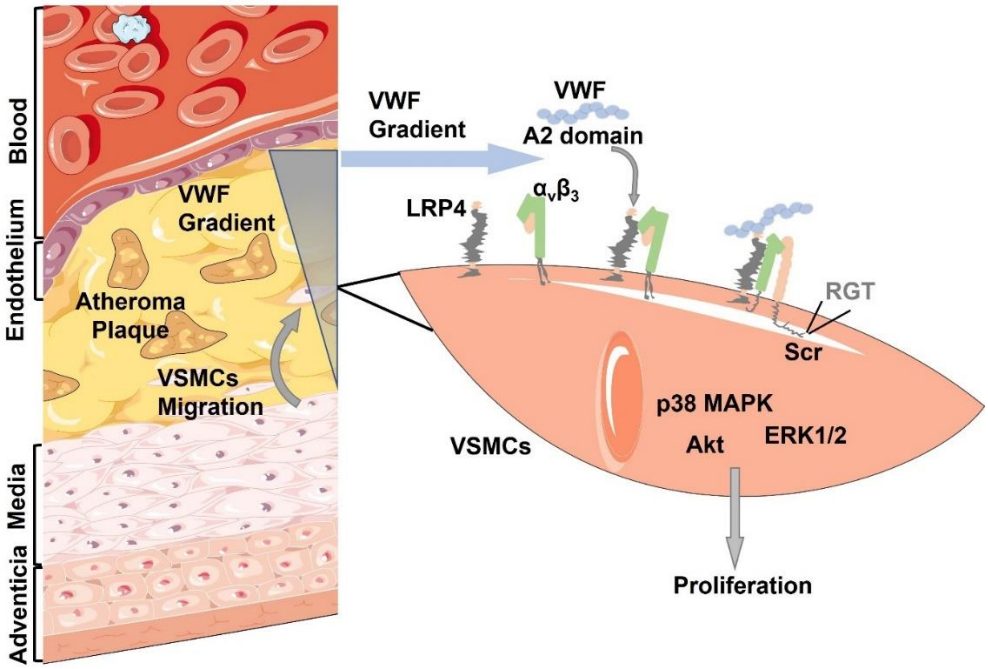


Figure 30 : Le VWF dans la physiopathologie artérielle par les CMLVs et les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

La migration des CMLVs pour former la néointima se fait dans un gradient croissant de VWF. Ces effets cellulaires sont en partie médiés par la fixation du VWF au récepteur LRP4 active l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ permettant la transduction de signaux et l'activation de voies de signalisation induisant la migration et la prolifération cellulaire.

4) Paramètres mécaniques et cellulaire dans un modèle *in-vivo* de souris invalidée pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

La modulation phénotypique des CMLVs joue un rôle important dans le vieillissement de la paroi artérielle. En réponse à des modifications de leur environnement les CMLVs passent d'un phénotype mature à des phénotypes prolifératifs, ostéoblastiques ou sécrétoires. Ces modifications interviennent dans différentes pathologies de la paroi artérielle. Le collagène et l'élastine sont deux protéines de la MEC. Une modification de proportion de ces protéines avec une production importante de collagène et une diminution de l'élastine augmente la rigidité de la paroi. Une hypertension peut induire l'activation du TGF-β conduisant à une production excessive de collagène. Le TGF-β et l'Ang II régulent en partie les structures vasculaires et cardiaques dans des

conditions physiologiques. Le TGF-β induit une régulation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à la surface des CMLVs, cette intégrine joue un rôle important dans la migration, la prolifération et induit des changements structurels du cytosquelette. L'invalidation conditionnelle de la sous unité α_v chez la souris permet de mesurer les modifications phénotypiques des CMLVs, de rigidité cellulaire et de rigidité artérielle dans le modèle d'hypertension artérielle en réponse à l'Ang II.

La mesure de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et du diamètre artériel chez les souris contrôles ou invalidées pour la sous unité α_v dans les CMLVs = α_v^{SMKO}) ainsi que la mesure de la contrainte circonférentielle (WS) de la paroi et du module élastique (Einc) permet la caractérisation des propriétés mécaniques intrinsèques de la paroi en fonction des paramètres hémodynamiques.

L'AFM sur des CMLVs de souris permet de mesurer de module de Young pour les cellules α_v^{SMKO} ou non et traitées ou non par l'Ang II.

D'après l'article « *Smooth muscle integrin αv contributes to the regulation of cell stiffness* » en cours de publication à ce jour :

Smooth muscle integrin α_v contributes to the regulation of cell stiffness

Alexandre Raoul,[1] Ekaterina Belozertseva,[1] Lei Tian,[2] Xiao Liu,[3] Caterina Maria Tone,[3] Jocelyne Blanc,[2] Dario Coletti,[2] Daniel Henrion,[4] Véronique Regnault,[1] Patrick Lacolley,[1] Emmanuelle Lacaze,[3] Pascal Challande,[5] Zhenlin Li[2]

[1]Université de Lorraine, INSERM, DCAC, F-54000 Nancy, France
[2]Sorbonne Université, CNRS, INSERM, IBPS, Biological Adaptation and Ageing, Paris, France.
[3]Sorbonne Université, CNRS, Institut des Nano-Sciences de Paris (INSP), 75005 Paris, France
[4]University of Angers, INSERM U1083, CNRS UMR 6015, MITOVASC, SFR ICAT, 49000 Angers, France.
[5]Sorbonne Université, CNRS, Institut Jean Le Rond d'Alembert, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

Background. Integrin α_v functions as a receptor for adhesion proteins and is expressed at high density in vascular smooth muscle cells (VSMC) whose phenotypic modulation plays a crucial role in arterial ageing. Our aim was to define the arterial phenotype in mice conditionally inactivated for the integrin α_v subunit in VSMC (α_v^{SMKO}) and its role in angiotensin II (Ang II)-induced arterial and VSMC stiffness.

Methods. We used a SMC specific knock-out α_v mouse model induced in adult mice by injection of tamoxifen. Transgenic mice (α_v^{SMKO}) and their control littermates (Ctrl) were treated with Ang II (1.5 mg/kg/day) for 4 weeks. Arterial distensibility and *in vitro* vascular reactivity were determined in the carotid artery. Atomic force microscopy (AFM) images of cells grown on a glass substrate have been performed in peak force mode with a multimode AFM. Young elastic modulus was determined by fitting the force curves with a Sneddon model.

Results. There is no difference in arterial pressure at baseline between control and α_v^{SMKO} mice. The pressure effect of Ang II was similar in both group of mice. The carotid distensibility/pressure and elastic modulus/wall stress curves were similar control and α_v^{SMKO} mice, indicating no change in arterial stiffness. Chronic treatment with Ang II resulted in increased carotid stiffness in both groups of mice without changes in vascular reactivity and myogenic tone. Electronic microscopy analysis of carotids revealed no significant difference between both groups of mice at baseline. Fewer vesicles containing fiber-like materials were present in VSMCs and fibroblast size was smaller in the adventitia from Ang II-treated α_v^{SMKO} mice compared to Ang II-treated Ctrl mice. Elastic modulus of cultured VSMCs was higher after Ang II treatment in cells from both groups of mice. At baseline and after treatment, elastic modulus was higher in cells from α_v^{SMKO} mice than in cells from Ctrl mice.

Conclusion. Our study demonstrates that inactivation of α_v-containing integrins on VSMCs increases cell stiffness. The general mechanism involves a cross-talk between extracellular matrix, α_v integrins and cytoskeletal complex. The lack of distensibility changes suggests additional changes at the level of α_v-mediated dynamics of focal adhesion.

INTRODUCTION

Integrins are non-covalently associated heterodimeric cell-surface adhesion receptors that mediate vital bidirectional signals during morphogenesis, tissue remodeling and repair. Integrin α_v participates in many important cellular processes, including cell adhesion, migration, survival, and growth factor signaling. It is well established that α_v integrins are widely expressed in many tissues throughout development and mediate the uptake of apoptotic cells, a process central to immune regulation and inflammation resolution.[1] The integrin α_v subunit is highly expressed in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and implicated in the control of cell adhesion, migration, differentiation/de-differentiation, contractility, proliferation and apoptosis.[2] Conditional inactivation of the α_v-subunit in VSMCs in mice showed that integrin α_v is important for heart- and large vessels remodeling during development.[3]

In response to changes in their environment, VSMCs switch from their quiescent contractile “mature” phenotype to a “embryonic” migratory, proliferative, synthetic, endocytic, phagocytic or osteoblastic ones.[4] This phenotypic modulation of VSMCs plays a pivotal role in atherothrombotic diseases[5] and in arterial stiffening associated with aging.[6] Arterial stiffness, measured by Pulse Wave Velocity (PWV), is an independent predictive indicator for total and cardiovascular mortality, especially in subjects with hypertension, heart failure and other age-associated diseases.[4]

Arterial stiffening and compliance of the vascular wall are dependent on the relative contribution of its 2 most prominent scaffolding proteins: collagen and elastin. The relative content of these molecules is normally held stable by a slow, but dynamic, process of production and degradation. Dysregulation of this balance, mostly because of inflammation, leads to overproduction of abnormal collagen and a decrease of normal elastin, which contributes to vascular stiffness.[4] Increased luminal pressure, or hypertension, also stimulates activation of latent transforming growth factor beta (TGF-β) leading to excessive collagen production.[2] TGF-β1 and angiotensin II (Ang II) have been shown to be critical for cardiac remodeling and tissue repair. Ang II induces fibronectin, laminin, and TGF-β1 mRNA via its Ang II type 1 receptor (AT1) in cardiac fibroblasts; TGF-β1 has been shown to regulate integrins in different cell lines, including smooth muscle and endothelial cells.

The influence of the α_v subunit on the formation of focal adhesion contacts is still unclear. In order to identify its effects on arterial phenotype, vascular function and arterial stiffness development, we created a mouse model of conditional inactivation of the integrin α_v subunit (α_v^{SMKO}) in VSMCs. Our objective was to compare the role of integrin α_v in adult mice in normal conditions and in the presence of vascular hypertension and oxidative stress created by chronic administration of Ang II.

MATERIAL AND METHODS

Animals

SM22-CreER^{T2}(ki) transgenic mice have been described previously.[7] *Itgav*$^{flox/flox}$ mice were obtained from A. Lacy-Hulbert[1] and were maintained on a C57BL/6 background. *Itgav*$^{flox/flox}$ mice were crossed with SM22-CreER^{T2}(ki) mice to generate SM22-CreER^{T2}(ki)/*Itgav*$^{flox/flox}$ double transgenic mice. All mice were genotyped by PCR as described previously.[1, 7] *Itgav*$^{flox/flox}$/ SM22-CreER^{T2}(ki)/+ mice were injected intraperitoneally with 1 mg of tamoxifen in 100 µL of peanut oil for 3 days to generate α_v^{SMKO} mice. *Itgav*$^{flox/flox}$ littermates injected for 3 days with tamoxifen were used as controls. All experiments were performed 4-6 weeks after tamoxifen injection. Mice used for experiments were aged 9-11 months and were housed in a temperature- and humidity-controlled facility with a 12h light/day cycle and given free access to standard rodent chow and water. All animal work was conducted in accordance with French regulations and experimental guidelines of the European Community and the protocols were approved by the local Animal Ethics Committee of the University of Lorraine, France.

In vivo arterial mechanical parameters

Systolic arterial pressure (SAP) and heart rate (HR) were measured in conscious animals using a tail-cuff sphygmomanometer (Hatteras Instruments, Inc., NC, USA). With an ultrasonic echotracking device (NIUS-01, Asulab SA, Neuchâtel, Switzerland), we recorded arterial diameter (Dia, left carotid artery) and arterial pressure (right carotid artery) simultaneously in isoflurane-anesthetized mice as described previously. The relation between arterial pressure (AP) and lumen cross-sectional area (LCSA) was fitted by an arctangent function. LCSA distensibility (Dist), a derivative of this function, was used to assess global elastic behavior of the artery. Circumferential wall stress (WS) and incremental elastic modulus (Einc), which characterizes the intrinsic mechanical properties of the wall material, were calculated with the above-mentioned parameters and the media cross sectional area (MCSA).

Pharmacological profile of the isolated mesenteric arteries

Other segments of mesenteric arteries were mounted in a wire-myograph (Danish MyoTechnology, Denmark) as previously described.[8] Cumulative concentration-

response curves to phenylephrine (Phe, 10^{-9} to 10^{-5} mol/L), acetylcholine (Ach, 10^{-9} to 10^{-5} mol/L) and sodium nitroprusside (SNP, 10^{-9} to 10^{-5} mol/L) were performed. Prior to each Cumulative concentration-response curves to Ach or SNP, the arteries were precontracted with phenylephrine (1 µmol/L), corresponding to approximately 50% of the maximal contractility.

Myogenic tone in pressurized mesenteric arteries in vitro

Arterial segments, with internal diameters of approximately 200 µm, were cannulated at both ends on glass micro-cannulas and mounted in a video-monitored perfusion system (Living System, LSI, Burlington, VT, USA).[9] Individual artery segments were bathed in a 5 ml organ bath containing PSS (pH: 7.4, pO2: 160 mmHg, and pCO2: 37 mmHg). Pressure was controlled by a servo-perfusion system. Diameter changes and pressure were measured continuously in response to pressure step increase from 10 to 125 mmHg. At the end of each experiment passive diameter was determined on arteries bathed in Calcium-free PSS containing ethylenbis-(oxyethylenenitrolo) tetra-acetic acid non-specific phosphodiesterases inhibitor papaverin (100 µmol/L) to ensure complete arterial relaxation. Myogenic tone was expressed as % of passive diameter (active diameter / passive diameter x 100)

Histological Procedures

Histological studies were performed on carotid arteries (CA) fixed with 10% buffered formalin under pressure in vivo. For morphological analysis, all arterial samples were embedded in paraffin and 5 µm sections were stained with Sirius red for collagen and Weigert's resorcin-fuchsin for elastic fibres. The density was calculated by drawing boxes of equal size on each cross-section of carotid artery. The intensity of staining was averaged over 5 to 7 boxes/sample for Weigert's resorcin-fuchsin staining and 10 boxes/sample for Sirius red staining, for each mouse artery fixed under pressure. Composition of the arterial wall and the MCSA were determined by computer-directed image analysis.

Electron microscopy

The carotid artery was fixed in a Carson solution of pH 7.2 (3.5% formaldehyde, 110 mM Na_2HPO_4). All samples were processed as described previously[6, 10] and embedded in Epon. Ultrathin sections were observed with a Zeiss omega TEM

microscope.

Cell culture

Aortic VSMCs were isolated from the descending thoracic aorta of *Itgav*$^{flox/flox}$ mice. VSMCs were grown in low-glucose (1 g/L) DMEM/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum. VSMCs were seeded at a density of 4×10^5 cells/well into 6-well plates and allowed to grow for 24 h to reach about 80% confluence. For α_v knock down, VSMCs were transfected with 0.5 µL/well of Cre-expressing adenovirus (10^{10} PFU/mL). An adenovirus expressing the green fluorescent protein (GFP) was used as a control. Cells were incubated for 48 h with adenovirus in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, and the medium was replaced with 0.5% FBS supplemented DMEM. VSMCs were then treated with saline or 200 nM Ang II for 48 h.

Atomic force microscopy

AFM measurements are performed on cells which have grown on a glass substrate immersed in medium to lead to dense monolayers of congruent cells. A multimode 9 AFM (Bruker, Palaiseau) has been used in peak force mode to acquire AFM topographic cell images. The tips used were silicon Bruker Scanasyst-air tips, on a nitride cantilever of resonance frequency of 70 kHz. If the image quality is sufficient, indicating a correct attachment of the cell on the substrate, a virtual grid is superimposed on the image. Its pitch was between 0.5 µm and 1.5 µm.

Force curves recorded according to the grid were taken at a speed of 1.5 Hz. They were corresponding to an overall vertical course of the sample below the tip of 300 nm but with never a sample deformation under the tip larger (nanoindentation) than 50 nm. Thanks to the initial cantilever/tip calibration of the AFM, the force curves are displayed in Force (nN) as a function of the sample deformation. This latter one is defined as (Z_{samp} - Z_{tip}). Z_{samp} is the vertical sample position (the zero is chosen as the onset of the non-zero force values, after subtraction of the baseline). Z_{tip} is the vertical deformation of the cantilever corresponding to the Z movement of the tip (the zero corresponds to flat cantilevers far from the sample). The force value between the tip and the sample was known after calibration of the cantilever stiffness by measurement of the free resonance far from the sample.

The force curve was fitted by a Sneddon model corresponding to the theoretical analysis of the indentation of a conical element into a sample. The tip is characterized

by its angle that was 10° for scanasyst-air tips. Assessing that Poisson coefficient estimated at a value 0.5, the fit allowed to extract the equivalent elastic modulus of the cell.

Statistical Analysis

All values are expressed as means ± SEM. Two-way ANOVA was used to compare the four experimental groups of mice. Differences were considered significant at values of $p<0.05$.

RESULTS

In vivo arterial mechanical parameters

Under basal conditions, SAP was not different between α_v^{SMKO} and Ctrl mice (Table 1) both in conscious and anaesthetized animals. Diastolic AP (DAP) and mean AP (MAP) were lower in anaesthetized α_v^{SMKO} compared with Ctrl mice. There was no difference in pulse pressure (PP) and heart rate (HR). Ang II produced a significant increase in PAS and HR in α_v^{SMKO} and Ctrl mice. DAP and MAP were also increased in Ang II-treated α_v^{SMKO} mice compared with untreated α_v^{SMKO} mice.

Carotid artery luminal diameter, incremental elastic modulus (Einc) and wall stress (WS) at MAP were similar at baseline between Ang II produced an increase in Ang II-treated Ctrl mice (Table 1). Distensibility (Dist) was lower and Einc was higher in Ang II-treated α_v^{SMKO} and Ctrl mice without changes in mean WS. Dist was increased in α_v^{SMKO} mice.

Dist/arterial pressure curves shown in Fig. 1A and Einc/circumferential WS curves are shown in Fig. 2B. Dist-pressure and Einc/WS curves did not differ between the two groups of mice at baseline. The Dist-arterial pressure curves were significantly shifted downwards in response to Ang II in both groups. The Einc-WS curves of Ang II-treated α_v^{SMKO} and Ctrl mice were significantly shifted upwards. Dist-arterial pressure and Einc-WS curves did not differ between the two groups after Ang II.

Vascular reactivity analysis

Phenylephrine induced a concentration-dependent contraction of the mesenteric arteries (Fig 2A). Ang II did not significantly increase arterial contractility to phenylephrine, despite a tendency. Phenylephrine-mediated contraction was not significantly different between Ctrl and α_v^{SMKO} mice, treated or not with Ang II.

Acetylcholine (Fig 2B) and sodium nitroprusside (SNP, Fig 2C) induced a concentration-dependent relaxation of the mesenteric arteries. Acetylcholine- and SNP-mediated relaxation was not significantly different between WT and α_v^{SMKO} mice, treated or not with Ang II.

Stepwise increases in pressure induced myogenic tone in mesenteric arteries (Fig 2D). Myogenic tone was not significantly affected by the absence of α_v in mice treated or not with Ang II. Similarly, passive arterial diameter was not affected by the absence of α_v in mice treated or not with Ang II (Fig 2E).

Histological and morphological changes

Ang II produced a significant increase in MCSA in α_v^{SMKO} and Ctrl mice (Table 1). Elastin density was smaller in α_v^{SMKO} compared with Ctrl mice at baseline. Collagen density did not differ between the two groups of mice at baseline. Ang II produced a decrease in elastin in Ctrl mice. Collagen was increased in Ang II-treated α_v^{SMKO} and Ctrl mice. Collagen was significantly lower in Ang II-treated α_v^{SMKO} compared with Ang II-treated Ctrl mice.

Electronic microscopy analysis of carotids revealed no evident difference at the level of collagen content, fibroblast size and smooth muscle morphology between both groups of mice at baseline. However, more collagen fibers were observed between elastin layer and SMCs in the media of Ang II-treated Ctrl and α_v^{SMKO} carotids compared to non-treated carotids. More collagen was present in Ang II-treated control carotids than of Ang II-treated α_v^{SMKO} carotids as showed in histological analysis. In addition, more vesicles containing fiber-like materials (blue stars) were observed in the SMCs of Ang II-treated Ctrl carotids compared to Ang II-treated α_v^{SMKO} carotids. in VSMCs. There is no significant difference in finger-like structures of VSMCs between both genotypes. In adventitia, collagen content was higher and fibroblast size was larger in the Ang II-treated Ctrl mice than the Ang II-treated α_v^{SMKO} mice.

Measurement of VSMC stiffness

A typical topographic image is given of Fig. 4A. Values of elastic modulus are displayed on Fig 4B. At baseline, the elastic modulus was significantly in VSMCs transfected with the Cre-expressing adenovirus mediating knockdown (KD) of α_v integrin subunit compared with VSMCs treated with the empty vector (EV) (0.32±0.03 MPa vs 0.14±0.02 MPa). While Ang II infusion did not induce significant change in EV cells (0.13±0.01 MPa vs 0.14±0.02 MPa), it significantly increased the elastic modulus in KD cells (0.95±0.07 MPa vs 0.32±0.03 MPa).

DISCUSSION

This study demonstrates that α_v^{SMKO} mice exhibited increased cell stiffness and a decreased in collagen content in the media in response to Ang II. The main functional consequence is a similar increase in carotid stiffness in Ang II-treated Ctrl and α_v^{SMKO} mice without changes in vascular reactivity and myogenic tone.

We used the SM22-CreER^{T2}(ki) strain to inactivate loxP-flanked α_v gene with up to 50 % efficiency. In this model, tamoxifen-induced recombination has been reported to be specific to smooth muscle cells.[7] Indeed, the level of CreER^{T2} mRNA is too low in myofibroblasts to observe efficient recombination. By deleting α_v, one might expect depletion of all α_v-containing integrin sub-units. However, among the five β-subunit partners of α_v (β_1, β_3, β_5, β_6 and β_8), only β3 associated with α_v in the media *in vivo*.[4] Finally, administration of Ang II is a well-established model of arterial stiffening by stimulating profibrotic and proinflammatory gene expression.[11] We have previously reported that Ang II induced a marked upregulation of α_v subunit gene.[12]

Our different previous works indicate that arterial stiffness has multi-factorial dependence on parameters such as intermediate filament proteins, intercellular and focal adhesion markers and membrane receptors (integrins) and highly depends on VSMC internal cytoskeleton organization and their interactions with ECM.[10, 12, 13] Stiffening of the aorta and other central arteries is considered to be an important risk factor for increased cardiovascular morbidity and mortality. Arterial mechanical properties are dependent on arterial pressure, the amount and density of extracellular matrix (ECM) proteins and the spatial organization of cell-matrix interactions.[6] Our results highlight decreased collagen content in the media of carotid arteries of α_v^{SMKO} mice compared with Ctrl mice in response to chronic administration of Ang II. This effect appears independent of hemodynamic changes since arterial pressure and circumferential wall stress are similar in both strains treated with Ang II.

In the last decade, Qiu et al reported that increased aortic stiffness in aging is attributable not only to changes in ECM but also increased intrinsic stiffness of VSMCs.[14] VSMC stiffness depends on altered cytoskeletal polymerization/depolymerization and increased adhesive properties. Specific inactivation of α_v in VSMCs provides an opportunity to examine the contribution of VSMC differentiation to arterial stiffness *in vivo*. Single-cell micromechanical measurements by AFM provide information on cell topography and cell stiffness (local apparent Young's elastic modulus).[15] Like several authors who measured cellular

stiffness of VSMCs in rodents with an AFM,[14, 16, 17] we used a nanoindentation protocol to measure the elastic modulus of VSMCs, as representative of the cellular stiffness. Cellular stiffness is a response to changes in α_v-dependent mechanotransduction. At baseline, we found that the elastic modulus was higher in α_v^{SMKO} cells. This slight increase in VSMC stiffness can be explained by lower elastin density in α_v^{SMKO} cells, which fosters a higher dependency towards collagen network.

After Ang II infusion, there was a significant increase of cellular elastic modulus only in α_v^{SMKO} cells (3-fold increase). Thus, the increase in arterial stiffness after Ang II infusion observed in Ctrl mice cannot be explained by changes of elasticity at the cell level but rather by changes in ECM: increase in collagen density and decrease in elastin.[18] The mechanism involves mainly disarray of both collagen and elastin without increased arterial contractility. Conversely, α_v^{SMKO} mice did not exhibit such changes in ECM, only a modest increase in collagen. In this strain, the increase of cellular stiffness after Ang II may explain, at least partially, the increase of arterial wall rigidity without changes in vascular tone. The causal contribution of cell stiffness to vascular stiffness via focal adhesion dynamics at the membrane of VSMCs remains to be investigated.

Electronic microscopy analysis has shown similar finger-like projections from the VSMCs to the elastic lamellae in Ctrl and α_v^{SMKO} mice at the baseline and after Ang II treatment. This result contrasts with the phenotype observed in the carotids of mice invalided for desmin[13] or vimentin,[10], two intermediate filament proteins, that shown reduced finger-like projections of VSMCs. This phenotype could be explained by the presence of other members of the integrin family such as integrin α_5. It has been reported that neither α_5 nor α_v mutants displayed any obvious vascular defects during embryonic development. However, mice that lack α_5 and α_v integrins on their VSMCs showed a vascular defect with abnormal focal adhesion formation and integrin signaling such as decreased phosphorylation of FAK.[2] In our study, electronic microscopy analysis confirmed the results obtained by histological analysis, namely, similar level in collagen in both genotypes at baseline and lower level in Ang II-treated α_v^{SMKO} mice compared to Ang II-treated Ctrl mice. This indicates that activation of TGF-β signaling, responsible for collagen synthesis, is less important in Ang II-treated α_v^{SMKO} mice. A higher number of intracellular vesicles containing collagen microfibrils (fiber-like materials) were observed in the Ang II-treated Ctrl VSMCs. These vesicles could transport fiber-like materials to the extracellular space. It has been demonstrated that

the vesicles containing collagen microfibrils could be formed in the cell when there is an overproduction of collagen fibers.[19] Interestingly, the (myo)fibroblasts in the adventitia of Ang II-treated Ctrl mice have the large size compared to the Ang II-treated α_v^{SMKO} mice. This suggests that TGF-β synthetized by VSMCs diffuses from the media to the adventitia, resulting in the activation of fibroblasts and higher synthesis of collagens in the adventitia of Ang II-treated Ctrl mice. The increased synthesis of collagens in the media and adventitia of carotids of the Ang II-treated Ctrl mice can influence the vascular stiffness. The lower ECM stiffness reflected by the reduced number of collagen fibers in α_v^{SMKO} mice is compensated by a higher cellular stiffness.

Taken together our date indicate that the dynamic activation of α_v-containing integrins on VSMCs contribute to both vascular stiffness (assessed by Einc-WS curves) and the stiff VSMC syndrome (assessed by AFM). Understanding the mechanism of cellular stiffness is important to elucidate whether this process occurs in hypertension and aging-associated vascular damage.

REFERENCES

1. Lacy-Hulbert A, Smith AM, Tissire H, Barry M, Crowley D, Bronson RT, Roes JT, Savill JS and Hynes RO. Ulcerative colitis and autoimmunity induced by loss of myeloid alphav integrins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:15823-8.

2. Turner CJ, Badu-Nkansah K, Crowley D, van der Flier A and Hynes RO. alpha5 and alphav integrins cooperate to regulate vascular smooth muscle and neural crest functions in vivo. Development. 2015;142:797-808.

3. van der Flier A, Badu-Nkansah K, Whittaker CA, Crowley D, Bronson RT, Lacy-Hulbert A and Hynes RO. Endothelial alpha5 and alphav integrins cooperate in remodeling of the vasculature during development. Development. 2010;137:2439-49.

4. Lacolley P, Regnault V, Segers P and Laurent S. Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. Physiol Rev. 2017;97:1555-1617.

5. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z and Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. Cardiovasc Res. 2012;95:194-204.

6. Galmiche G, Labat C, Mericskay M, Aissa KA, Blanc J, Retailleau K, Bourhim M, Coletti D, Loufrani L, Gao-Li J, Feil R, Challande P, Henrion D, Decaux JF, Regnault V, Lacolley P and Li Z. Inactivation of serum response factor contributes to decrease vascular muscular tone and arterial stiffness in mice. Circ Res. 2013;112:1035-45.

7. Kuhbandner S, Brummer S, Metzger D, Chambon P, Hofmann F and Feil R. Temporally controlled somatic mutagenesis in smooth muscle. Genesis. 2000;28:15-22.

8. Loufrani L, Matrougui K, Li Z, Levy BI, Lacolley P, Paulin D and Henrion D. Selective microvascular dysfunction in mice lacking the gene encoding for desmin. FASEB J. 2002;16:117-9.

9. Iglarz M, Levy BI and Henrion D. Chronic endothelin-1-induced changes in vascular reactivity in rat resistance arteries and aorta. Eur J Pharmacol. 1998;359:69-75.

10. Langlois B, Belozertseva E, Parlakian A, Bourhim M, Gao-Li J, Blanc J, Tian L, Coletti D, Labat C, Ramdame-Cherif Z, Challande P, Regnault V, Lacolley P and Li Z. Vimentin knockout results in increased expression of sub-endothelial basement membrane components and carotid stiffness in mice. Sci Rep. 2017;7:11628.

11. Lu S, Strand KA, Mutryn MF, Tucker RM, Jolly AJ, Furgeson SB, Moulton KS, Nemenoff RA and Weiser-Evans MCM. PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) Protects Against Ang II (Angiotensin II)-Induced Pathological Vascular Fibrosis and Remodeling-Brief Report. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2020;40:394-403.

12. Louis H, Kakou A, Regnault V, Labat C, Bressenot A, Gao-Li J, Gardner H, Thornton SN, Challande P, Li Z and Lacolley P. Role of alpha1beta1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;293:H2597-604.

13. Lacolley P, Challande P, Boumaza S, Cohuet G, Laurent S, Boutouyrie P, Grimaud JA, Paulin D, Lamaziere JM and Li Z. Mechanical properties and structure of carotid arteries in mice lacking desmin. Cardiovasc Res. 2001;51:178-87.

14. Qiu H, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Gansner M, Depre C, Resuello RR, Natividad FF, Hunter WC, Genin GM, Elson EL, Vatner DE, Meininger GA and Vatner SF. Short communication: vascular smooth muscle cell stiffness as a mechanism for increased aortic stiffness with aging. Circ Res. 2010;107:615-9.

15. Zulliger MA, Fridez P, Hayashi K and Stergiopulos N. A strain energy function for arteries accounting for wall composition and structure. J Biomech. 2004;37:989-1000.

16. Meininger GA. The central importance of the cytoskeleton for increased cell stiffness in cardiovascular disease. Focus on "Diabetes increases stiffness of live cardiomyocytes measured by atomic force microscopy nanoindentation". Am J Physiol Cell Physiol. 2014;307:C908-9.

17. Sehgel NL, Zhu Y, Sun Z, Trzeciakowski JP, Hong Z, Hunter WC, Vatner DE, Meininger GA and Vatner SF. Increased vascular smooth muscle cell stiffness: a novel mechanism for aortic stiffness in hypertension. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013;305:H1281-7.

18. Zhang J, Zhao X, Vatner DE, McNulty T, Bishop S, Sun Z, Shen YT, Chen L, Meininger GA and Vatner SF. Extracellular Matrix Disarray as a Mechanism for Greater Abdominal Versus Thoracic Aortic Stiffness With Aging in Primates. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2016;36:700-6.

19. Ina K, Kitamura H, Tatsukawa S, Miyazaki T, Abe H and Fujikura Y. Intracellular formation of collagen microfibrils in granulation tissue. Exp Mol Pathol. 2005;79:244-8.

Table 1. Blood pressure, mechanical properties and composition of the carotid artery

	Ctrl	α_v^{SMKO}	Ctrl Ang II	α_v^{SMKO} Ang II
Conscious mice				
Number	8	12	8	8
SAP (mmHg)	109±2	101±2	130±5*	126±5*
Anesthetized mice				
Number	18	12	8	8
SAP (mmHg)	102±2	93±2	118±5*	112±5*
DAP (mmHg)	70±2	59±2§	77±4	80±3*
MAP (mmHg)	81±2	71±2§	91±4	90±3*
PP (mmHg)	32±3	34±2	42±2*	33±3
HR (beats/min)	393±14	410±9	498±12*	486±17*
Parameters at MAP				
MDia (µm)	512±13	519±19	619±35*	576±19
MDist (10^{-3} $mmHg^{-1}$)	10.3±0.6	13.3±0.7§	4.3±0.4*	4.4±0.4*
MEinc (kPa)	490±49	363±38	1007±161*	1011±149*
MWS (kPa)	231±17	200±18	227±38	223±21
Histology of the CA				
MCSA (mm^2 10^{-3})	20±1	21±1	35±3*	29±2*
Elastin density (%)	50±1	44±1§	37±2*	41±1
Collagen density (%)	25±1	26±1	36±1*	30±1*#

Values are means±SEM; Ctrl, control mice; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial pressure; PP, pulse pressure; MDia, mean diameter; MDist, mean distensibility; MEinc, mean incremental elastic modulus; MWS, mean wall stress. *P<0.05 versus control of the same strain. §P<0.05 versus Ctrl. #P<0.05 versus treated Ctrl

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Mechanical properties of the carotid artery in Ang II-treated Ctrl and α_v^{SMKO} mice. Distensibility-arterial pressure curves (A) and incremental elastic modulus (Einc)-wall stress curves (B) in non-treated Ctrl (n = 18), non-treated α_v^{SMKO} (n = 12), Ang II-treated Ctrl (n = 8) and Ang II-treated α_v^{SMKO} (n = 8) mice.

Figure 2. Vascular responses in the mesenteric artery from Ctrl and α_v^{SMKO} mice. (A) Contraction induced by different concentrations of phenylephrine (PE) in intact rings from non-treated Ctrl (n = 11), non-treated α_v^{SMKO} (n = 11), Ang II-treated Ctrl (n = 9) and Ang II-treated α_v^{SMKO} (n = 7) mice. (B) Endothelium-dependent relaxation in response to different concentrations of acetylcholine (ACh. (C) Endothelium-independent relaxation induced by different concentrations of the NO donor, sodium nitroprusside (SNP), in PE-precontracted rings. (D) Myogenic tone calculated as a percentage of contraction normalized to passive diameter (E).

Figure 3. Electronic microscopy analysis of the control and α_v^{SMKO} carotids at baseline and after Ang II treatment. Four representative images from the media are presented in the upper panels and six from adventitia in the lower panels. Blue stars indicate the vesicles containing fiber-like material in the smooth muscle cells. Abbreviation: COL, collagen; EL, elastin layer; EN, endothelial cells; FB, fibroblast; N, nuclei; SMC, smooth muscle cell.

Figure 4. AFM imaging and force measurement. (A) Representative contact-mode image of VSMCs from Ctrl mice. (B) Elastic modulus values from non-treated Ctrl (n = 122), non-treated α_v^{SMKO} (n = 120), Ang II-treated Ctrl (n = 64) and Ang II-treated α_v^{SMKO} (n = 99) mouse VSMCs.

Figure 1

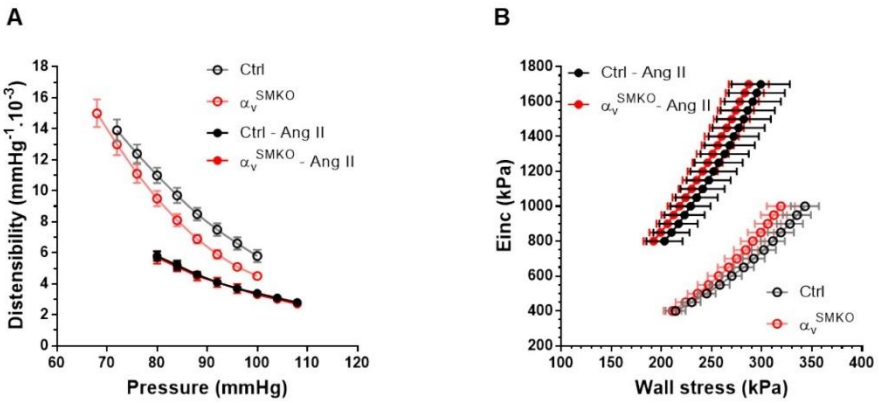

A
Distensibility (mmHg^{-1}.10^{-3})
Pressure (mmHg)
Ctrl
α_v^{SMKO}
Ctrl - Ang II
α_v^{SMKO} - Ang II
B
Einc (kPa)
Wall stress (kPa)
Ctrl - Ang II
α_v^{SMKO} - Ang II
Ctrl
α_v^{SMKO}

Figure 2

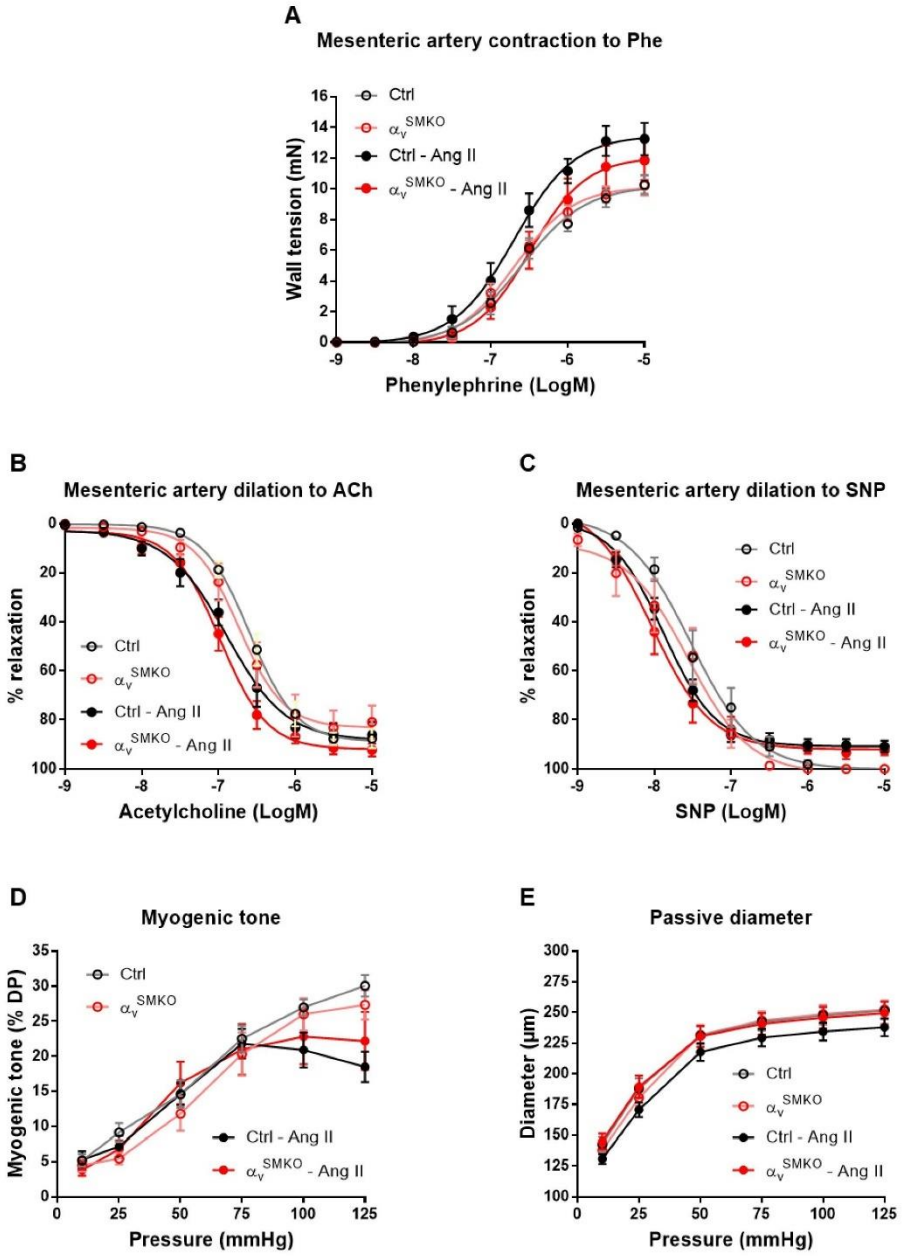

A
Mesenteric artery contraction to Phe
Wall tension (mN)
Phenylephrine (LogM)
Ctrl
αv SMKO
Ctrl - Ang II
αv SMKO - Ang II
B
Mesenteric artery dilation to ACh
% relaxation
Acetylcholine (LogM)
C
Mesenteric artery dilation to SNP
% relaxation
SNP (LogM)
D
Myogenic tone
Myogenic tone (% DP)
Pressure (mmHg)
E
Passive diameter
Diameter (µm)
Pressure (mmHg)

Figure 3

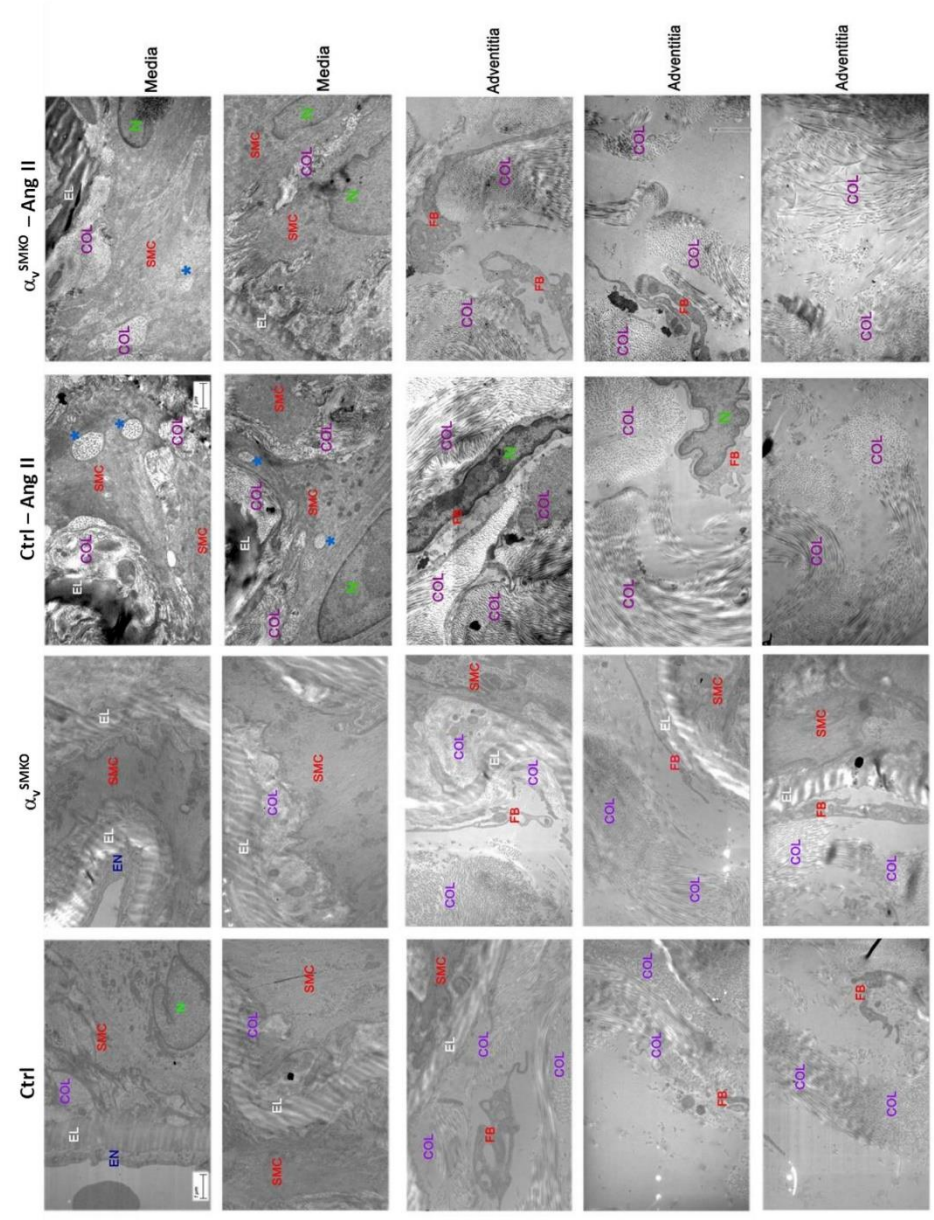
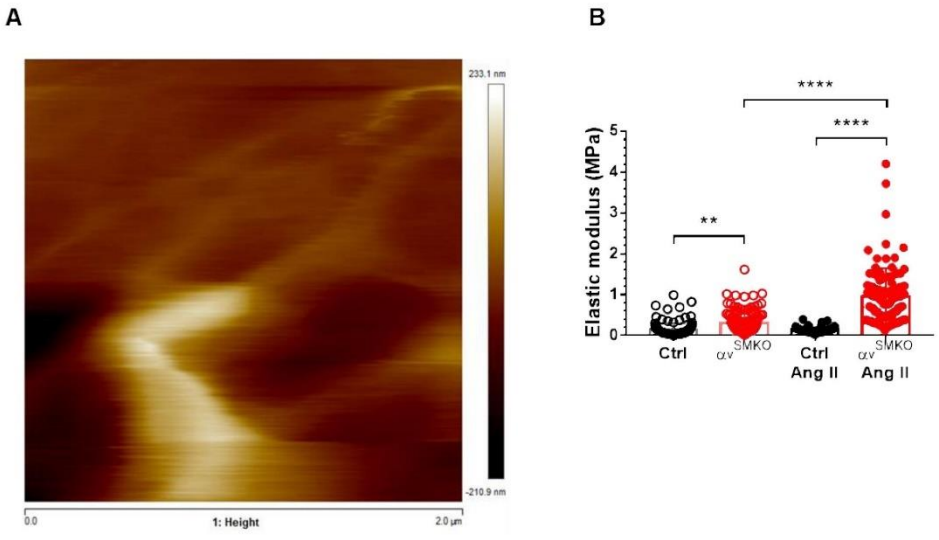

Ctrl
α_v^{SMKO}
Ctrl – Ang II
α_v^{SMKO} – Ang II
Media
Media
Adventitia
Adventitia
Adventitia
EL
COL
SMC
EN
FB

Figure 4


A
233.1 nm
-210.9 nm
0.0
1: Height
2.0 µm
B
Elastic modulus (MPa)
0
1
2
3
4
5
**
****
****
Ctrl
αv SMKO
Ctrl
Ang II
αv SMKO
Ang II

Concernant les paramètres mécaniques, nous observons une augmentation similaire de la rigidité carotidienne dans les souris contrôles traitées par Ang II et α_v^{SMKO} sans changements des paramètres de réactivité vasculaire. La teneur en collagène est augmentée après un traitement avec de l'Ang II. Les mesures par AFM montrent que le module de Young des CMLVs α_v^{smKO} est plus élevé par rapport aux contrôles. Après le traitement par l'Ang II on observe une augmentation significative du module de Young uniquement pour les CMLVs α^{smKO}. Les résultats de cet article permettent d'observer l'action des intégrines αvβ3 qui sont impliquées dans la rigidité de la paroi vasculaire mais aussi dans la rigidité des CMLVs.

VI. Discussion

Ce travail de doctorat a porté sur les conséquences d'une modification de la rigidité matricielle sur les CMLVs et le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans ces modifications. Nous avons montré que la rigidité de la MEC entrainait une modification de l'expression des protéines du cytosquelette et un renforcement des interactions CMLV/MEC. Nous avons démontré que ces modifications traduisaient une adaptation de la CMLV en modifiant sa rigidité.

Il existe principalement deux techniques concernant la mesure de rigidité cellulaire, la technique par AFM dites de « *colloidal probe* » permet de calculer le module d'Young de la cellule en appliquant à l'aide d'une sphère une pression sur la CMLV mais cette technique ne permet pas d'obtenir de résultats sur la cartographie cellulaire (Gavara et Chadwick 2012) . La technique « pick force » de nanoindentation permet en revanche de reconstituer à partir de chaque point de mesure une rigidité générale. De manière intéressante l'augmentation de la rigidité matricielle entraine une rigidité cellulaire globale plus importante. Cependant il est aussi possible de cartographier la cellule grâce à la technique développée par Grégory Francius permettant de mesurer la rigidité à chaque point de la cellule. Des résultats préliminaires qui n'ont pas été développés dans ce manuscrit montrent un front de migration avec une rigidité plus importante (Li et al. 2020). Les données obtenues présentent plusieurs limites. Des expériences doivent être réalisées avec des rigidités plus physiologiques de 4 à 20 kPa. Les gels utilisés étaient ceux achetés à la société Matrigen™ avant que nous développions au laboratoire les techniques pour fabriquer nos propres gels de rigidité croissante. Les résultats montrent que la rigidité maximale que peut atteindre la cellule lorsqu'elle est exposée à une rigidité du milieu très importante (pour le verre plus de 1 GPa) est d'environ 20 kPa. Sur un milieu de faible rigidité la CMLV s'adapte avec une

rigidité deux fois inférieure (10 kPa). Seawright et al., dans une publication de 2018 ont mesuré la rigidité cellulaire de CMLVs de singes jeunes et âgés et obtenu respectivement 10 et 17 kPa ce qui correspond à l'ordre de grandeur que nous avons retrouvé dans nos expériences (Seawright et al. 2018). De même dans une étude avec la même technique de nanoindentation, la rigidité mesurée pour des CMLVs de singe jeunes et âgés était de 3,5 et 22 kPa (Zhu et al. 2012). Nos résultats sont proches de ceux de la littérature avec une méthode similaire.

Ces résultats intéressants avec des variations de rigidité matricielle permettent de préciser le rôle de la matrice sur l'expression des protéines impliquées dans les AFs.

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, la taline, la vinculine, l'α-SMA, FAK et P-FAK sont identifiées comme impliquées dans les adhérences focales et dans la transmission des forces. Des rigidités croissantes de la MEC entrainent une augmentation de l'expression protéique des protéines impliquées dans les AFs. Dans une publication de 2019, Nakao et al., ont montré que la taline était nécessaire à l'augmentation de la rigidité cellulaire sur des ostéoblastes de souris (Nakao et al. 2019). De même, l'expression protéique de la vinculine augmente en fonction de rigidité croissante de la MEC pour des CMLVs aortiques de rat (Shen et al. 2019). Pour des CMLVs de souris l'expression de FAK reste la même lorsque la rigidité matricielle augmente mais l'expression de p-FAK augmente avec des gels de 2, 11 et 24 kPa (Mui et al. 2015). Les résultats que nous retrouvons dans la littérature sont en accord avec nos résultats sur les modifications de l'expression des protéines en fonction de la rigidité de la MEC. Les protéines impliquées dans les AFs sont augmentées lorsque les rigidités cellulaire et matricielle sont augmentées. La phosphorylation de FAK augmente également avec l'augmentation du module de Young des gels. Cependant le choix de la plage de rigidité est soumis à des contraintes techniques et s'avère difficile en se basant sur la

littérature. En effet, dans certaines publications des rigidités faibles ou hautes correspondent à 1 et 8 kPa (Janmey, Fletcher, et Reinhart-King 2020) alors qu'il n'est pas rare de trouver des rigidités matricielles variant de 1 à 50 kPa (Bertero et al., 2016) ou supérieures à 100 kPa (Sit et al. 2020), les paramétrages de l'AFM ou le modèle utilisé pourraient avoir une incidence sur les résultats obtenus (**Tableau 3**). Cela suppose qu'en augmentant la rigidité matricielle, les différences d'expression protéique que nous avons observées pourraient être plus importantes encore.

Tableau 3 : Aperçu de rigidité cellulaire en fonction de paramètres de l'AFM.

Cellules étudiées	Pointes d'AFM utilisées	Force du levier exercée (si précisée, en nN)	Indentation (si précisée, en nm)	Modèle	Rigidité (kPa)	Références
Phaeodactylum tricornutum (Bactérie)	Conique	1,75 et 2	200	Hertz	75 - 2100	(Francius et al. 2008)
CMLVs aortiques de souris	Conique recouverte de fibronectine			Hertz	5 - 7	(McCallinhart et al. 2020)
CMLVs aortiques de rats	Conique en nitrure de silicium	30	Supérieure à 800	Hertz	1,5	(Yan et al. 2020)
CMLVs aortique de singes	Conique recouverte de fibronectine			Hertz	14	(Zhu et al. 2012)
CMLVs soléaires de rats	Conique en silicone nitride			Sneddon	10	(Seawright et al. 2018)
Cellules cancéreuses humaines	Conique en nitrure de silicium	3	50	Sneddon	5	(Polyakov et al. 2011; Li et al. 2020)

Après avoir quantifié les différents acteurs des AFs en fonction de la rigidité de la MEC nous avons observé les CMLVs dans un contexte dynamique et en transfectant nos cellules avec la protéine FAK pour suivre les mouvements des cellules.

La transfection des CMLVs pour FAK a été un élément important de cette thèse. Le plasmide FAK-GFP gracieusement donné par l'équipe de Philippe Rondé (CNRS UMR_7021) était principalement utilisé pour la transfection de cellules cancéreuses en culture. Cependant, la transfection ne fonctionnait pas sur les CMLVs, entrainant leur apoptose et de nombreux artéfacts rendant l'imagerie impossible. Le recours à un adénovirus a été *in fine* privilégié. Cependant, même si la technique s'avère moins délétère pour les cellules elle n'en reste pas moins difficile à maitriser tant les concentrations doivent être faible (0,005 µL/L de plasmide). Pour des rigidités importantes, la fluorescence des AFs masquaient le signal des artéfacts présents à l'intérieur du cytoplasme. Cependant, quand les rigidités et donc le signal des AFs diminuaient, il devenait difficile d'observer un marquage correct et d'utiliser ces images dans le logiciel ImageJ™. De même, les mesures au cours du temps ont posé différents problèmes. En effet, même si l'échantillon analysé sous le microscope disposait d'un maintien de la température à 37°C et d'une atmosphère contrôlée en oxygène et CO_2 les cellules examinées plus d'1 heure avec 1 image par minute sur 3 plans (en z) commençaient à montrer des signes de souffrance et se rétractaient. Il conviendra d'adapter ce protocole afin de pouvoir observer le comportement des cellules durant au moins deux heures sans doute en diminuant l'exposition des cellules et le nombre de plan par cellule ou par heure. La différence de taille des AFs marquées est significativement différente pour le contrôle correspondant à du verre par rapport à des rigidités de 5 et 10 kPa. Les résultats obtenus sont en adéquation avec ceux de la littérature pour différentes lignées cellulaires comme des cellules mammaires de

souris, ou pour des CMLVs aortiques de rats (Helguero et al. 2005), (Saphirstein et al. 2013). L'augmentation de la taille des adhérences focales lorsque la rigidité matricielle augmente suggère un regroupement de protéines plus important et une liaison entre la MEC, les AFs et le cytosquelette de la CMLV. La conséquence est une modification de la structure et de la rigidité cellulaire. Ces résultats sont similaires à ceux d'une publication où des CMLVs de rats sans interactions taline/vinculine ou sans interactions entre les FAs et le cytosquelette ont un nombre et une taille des FAs diminués ainsi qu'une rigidité cellulaire plus faible (Priddle et al. 1998).

Ces interactions capitales pour le devenir cellulaire dans des conditions physiologiques ou pathologiques peuvent induire des modifications de la prolifération ou de la migration cellulaire. La dynamique des AFs est un sujet important pour les cellules cancéreuses et leurs capacités d'invasion et de migration. Dans de nombreuses études FAK est décrite comme une cible d'intérêt pour les thérapies anti-cancéreuses (Dawson et al. 2021). Son rôle est aussi étudié dans les CMLVs où une diminution de l'activité de FAK entrainait une baisse de prolifération et de migration (Murphy, Jeong, et Lim 2020). De manière intéressante la dynamique des AFs et de FAK est largement étudiée pour les cellules cancéreuses et moins pour les CMVLs. Nos résultats montrent une diminution de la stabilité des adhérences focales lorsque la rigidité matricielle diminue, la stabilité correspondant au nombre d'AFs présent à t=0 puis à t=60 minutes. Ces résultats supposent que de faibles rigidités pourraient entrainer un renouvellement plus important des AFs au cours du temps. Cependant, dans la littérature une étude sur des CMLVs bovines n'a pas mis en évidence de différence dans le nombre d'AFs au cours du temps en fonction de différentes rigidités (Xu et al. 2020). Ces différences de résultat pourraient s'expliquer par les techniques de mesures. En effet, dans la publication citée précédemment les AFs ont été suivies

individuellement durant deux heures d'observation avec un calcul de traction de force exercée par l'AF. Cette combinaison de l'imagerie et de la reconstitution de la force de traction est un élément intéressant qui pourrait être mis en pratique. En effet, durant ces travaux nous avons obtenu plusieurs résultats préliminaires intéressants sur la microscopie à traction de force.

Après avoir mesuré les modifications qu'entrainaient des rigidités différentes sur la rigidité cellulaire, l'expression protéique et la dynamique des adhérences focales médiés par ces protéines et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, nous avons exploré un autre rôle de cette dernière : son rôle dans la modulation de la coagulation en fonction de la rigidité. Cette intégrine est en effet un récepteur pour la prothrombine.

Nos résultats montrent que la génération de thrombine diminue lorsque la rigidité augmente. Les faibles rigidités matricielles (0,5 et 4 kPa) entrainent une génération de thrombine comparable à celle retrouvée dans la littérature. Cependant, nous avons observé que lorsque la rigidité de la MEC augmente (dans un modèle de rat spontanément hypertendu), la génération de thrombine diminue d'environ 30% (Ait Aissa et al. 2015). Cependant, il est bien décrit que l'augmentation de la rigidité des artères au cours du vieillissement augmente de la même manière que le risque de thrombose (Patrick Lacolley et al. 2017) (Franchini 2006). Ces résultats suggèrent que les CMLVs de la paroi des artères rigides pourraient ne pas intervenir de manière déterminante dans ces troubles hémostatiques. Ces suppositions sont corroborées par les résultats de génération de thrombine en présence de RGT où nous avons observé en présence de cet inhibiteur une diminution de la génération de thrombine : lorsque celle-ci est faible le pourcentage de diminution est plus important comparativement à une rigidité importante. L'inhibiteur semble permettre de diminuer la part de la génération de thrombine dépendante de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Vucko et al. 2019).

Cependant, la contribution de l'intégrine parait inégale selon la rigidité de la matrice. En effet, même si nous observons une diminution dans les trois groupes, la forte rigidité entraine une diminution de l'ETP extrêmement faible. Ces données suggèrent que l'intégrine à des rigidités élevées participe peu à la génération de thrombine car elle serait impliquée préférentiellement dans les AFs comme vu précédemment. Afin de poursuivre ces travaux il serait intéressant d'effectuer des mesures d'affinité entre l'intégrine et la prothrombine dans des situations de rigidités matricielles différentes puisqu'il est probable que l'intégrine activée et liée à la MEC par des motifs RGD subisse un encombrement stérique empêchant la fixation de la prothrombine.

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est connue comme étant un récepteur du VWF par son motif RGD (Denis et al. 1993). Mais la signalisation mise en jeu dans la prolifération des CMLVs n'avait pas été étudiée. Nos résultats montrent dans l'aorte une colocalisation entre l'alpha actine des CMLVs de la néointima et le VWF de manière proportionnelle à l'atteinte vasculaire. L'études *in vivo* de carotides ligaturées de souris contrôles et déficientes en VWF a permis d'obtenir des résultats équivalents à ceux observés en histologie de vaisseau humain confirmant un mécanisme liant les CMLVs et le VWF. De plus, les mesures de migration de CMLVs *in vitro* de donneurs sains indiquent qu'en présence de VWF les CMLVs acquièrent un pouvoir prolifératif près de deux fois supérieur. En microscopie confocale nous avons observé une colocalisation entre l'intégrine et VWF. L'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ induit une perte des capacités prolifératives des CMLVs. Ces résultats montrent l'action du VWF qui est largement présent dans la neointima de la paroi artérielle au niveau des CMLVs. Cette action implique une interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le récepteur LRP4 qui permet la transduction du signal et la prolifération pathologique des CMLVs. Cibler et diminuer

l'affinité de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour le VWF ou la signalisation intracellulaire permettrait de diminuer les effets prolifératifs des CMLVs.

Enfin l'utilisation d'un modèle *in-vivo* invalidé pour la sous unité α_v et le traitement à l'Ang II pour induire une hypertension a permis d'apprécier les paramètres mécaniques de la paroi artérielle et les modifications cellulaires associées. La rigidité cellulaire des CMLVs de souris est augmentée et la teneur en collagène est diminuée après un traitement à l'Ang II, cela se traduit par une augmentation similaire de la rigidité carotidienne dans les deux groupes traités par l'Ang II mais pas de modification sur la réactivité ou le tonus myogénique. Après le traitement par l'Ang II le module de Young est augmenté uniquement pour les CMLVs de souris α_v^{smKO} et pas pour le groupe contrôle. La rigidité artérielle augmentée chez la souris α_v^{smKO} est plutôt en rapport avec l'augmentation de la rigidité cellulaire que la modification de la MEC. Ce modèle montre la participation de la rigidité des CMLVs à la rigidité de la paroi dépendante des intégrines et indépendante des contraintes de pression

VII. Conclusion :

Nous avons montré que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avait de nombreux rôles physiopathologiques et permettait une modulation de la réponse des CMLVs en adaptation à leur environnement.

Les CMLVs par l'interaction entre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et les motifs RGD de protéines de la MEC s'adaptent aux modifications de la rigidité matricielle en induisant une réponse médiée par les AFs. Des rigidités matricielles augmentées permettent de moduler la formation de thrombine à la surface des CMLVs médiée par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette dernière dans un contexte physiopathologique intervient dans la migration et la prolifération des CMLVs dans la néo-intima de vaisseaux lésés en présence de VWF. Actuellement il n'existe pas de stratégie anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ à l'exception de l'angiogenèse pour des thérapies anti-cancéreuses. Le modèle de souris développé permet d'apprécier l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la rigidité de la paroi et la contribution de la rigidité cellulaire. L'inhibition complète de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ de la paroi induirait une distensibilité des artères de gros calibres pouvant mener à des anévrismes. Son rôle dans la rigidité artérielle, dans la rigidité cellulaire et dans la prolifération des CMLVs en fait une cible thérapeutique intéressante, en particulier dans les anévrismes abdominaux caractérisés par des thrombus interpariétaux. Il serait intéressant de développer des molécules/vecteurs ciblant spécifiquement les intégrines $\alpha_v\beta_3$ des CMLVs ou leurs ligands.

VIII. Références bibliographiques

Aa, de Melker, Sterk Lm, Delwel Go, Fles Dl, Daams H, Weening Jj, et Sonnenberg A. 1997. « The A and B Variants of the Alpha 3 Integrin Subunit: Tissue Distribution and Functional Characterization. » *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 76 (4): 547-63.

Ait Aissa, Karima, Jérémy Lagrange, Amel Mohamadi, Huguette Louis, Bénédicte Houppert, Pascal Challande, Denis Wahl, Patrick Lacolley, et Véronique Regnault. 2015. « Vascular Smooth Muscle Cells Are Responsible for a Prothrombotic Phenotype of Spontaneously Hypertensive Rat Arteries ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35 (4): 930-37. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305377.

Albinsson, Sebastian, et Per Hellstrand. 2007. « Integration of signal pathways for stretch-dependent growth and differentiation in vascular smooth muscle ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 293 (2): C772-82. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00622.2006.

Bertero, Thomas, William M. Oldham, Katherine A. Cottrill, Sabrina Pisano, Rebecca R. Vanderpool, Qiujun Yu, Jingsi Zhao, et al. s. d. « Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension ». *The Journal of Clinical Investigation* 126 (9): 3313-35. https://doi.org/10.1172/JCI86387.

Bezie, Y., P. Lacolley, S. Laurent, et G. Gabella. 1998. « Connection of Smooth Muscle Cells to Elastic Lamellae in Aorta of Spontaneously Hypertensive Rats ». *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 32 (1): 166-69. https://doi.org/10.1161/01.hyp.32.1.166.

Boutouyrie, Pierre. 2007. « Rigidité artérielle : quelles techniques et quelle place actuelle dans les méthodes d'évaluation du risque ? » *Sang Thrombose Vaisseaux* 19 (9): 473-78. https://doi.org/10.1684/stv.2007.0204.

Clyman, R. I., F. Mauray, et R. H. Kramer. 1992. « Beta 1 and Beta 3 Integrins Have Different Roles in the Adhesion and Migration of Vascular Smooth Muscle Cells on Extracellular Matrix ». *Experimental Cell Research* 200 (2): 272-84. https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90173-6.

Clyman, R. I., J. Tannenbaum, Y. Q. Chen, D. Cooper, P. D. Yurchenco, R. H. Kramer, et N. S. Waleh. 1994. « Ductus Arteriosus Smooth Muscle Cell Migration on Collagen: Dependence on Laminin and Its Receptors ». *Journal of Cell Science* 107 (Pt 4) (avril): 1007-18.

Curran, M. E., D. L. Atkinson, A. K. Ewart, C. A. Morris, M. F. Leppert, et M. T. Keating. 1993. « The Elastin Gene Is Disrupted by a Translocation Associated with Supravalvular Aortic Stenosis ». *Cell* 73 (1): 159-68. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90168-p.

Davies, John D., Keri L. H. Carpenter, Iain R. Challis, Nikki L. Figg, Rosamund McNair, Diane Proudfoot, Peter L. Weissberg, et Catherine M. Shanahan. 2005. « Adipocytic Differentiation and Liver x Receptor Pathways Regulate the Accumulation of Triacylglycerols in Human Vascular Smooth Muscle Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (5): 3911-19. https://doi.org/10.1074/jbc.M410075200.

Dawson, John C, Alan Serrels, Dwayne G Stupack, David D Schlaepfer, et Margaret C Frame. 2021. « Targeting FAK in anti-cancer combination therapies ». *Nature reviews. Cancer* 21 (5): 313-24. https://doi.org/10.1038/s41568-021-00340-6.

Denis, C., J. A. Williams, X. Lu, D. Meyer, et D. Baruch. 1993. « Solid-Phase von Willebrand Factor Contains a Conformationally Active RGD Motif That Mediates Endothelial Cell Adhesion through the Alpha v Beta 3 Receptor ». *Blood* 82 (12): 3622-30.

Dietz, H. C., I. McIntosh, L. Y. Sakai, G. M. Corson, S. C. Chalberg, R. E. Pyeritz, et C. A. Francomano. 1993. « Four Novel FBN1 Mutations: Significance for Mutant Transcript Level and EGF-like Domain Calcium Binding in the Pathogenesis of Marfan Syndrome ». *Genomics* 17 (2): 468-75. https://doi.org/10.1006/geno.1993.1349.

Durham, Andrew L, Mei Y Speer, Marta Scatena, Cecilia M Giachelli, et Catherine M Shanahan. 2018. « Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness ». *Cardiovascular Research* 114 (4): 590-600. https://doi.org/10.1093/cvr/cvy010.

Eliceiri, B. P., et D. A. Cheresh. 2001. « Adhesion Events in Angiogenesis ». *Current Opinion in Cell Biology* 13 (5): 563-68. https://doi.org/10.1016/s0955-0674(00)00252-0.

Franchini, Massimo. 2006. « Hemostasis and Aging ». *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 60 (2): 144-51. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2006.06.004.

Francius, Grégory, Benoît Tesson, Etienne Dague, Véronique Martin-Jézéquel, et Yves F. Dufrêne. 2008. « Nanostructure and Nanomechanics of Live Phaeodactylum Tricornutum Morphotypes ». *Environmental Microbiology* 10 (5): 1344-56. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01551.x.

Galbraith, Catherine G., Kenneth M. Yamada, et Michael P. Sheetz. 2002. « The relationship between force and focal complex development ». *The Journal of Cell Biology* 159 (4): 695-705. https://doi.org/10.1083/jcb.200204153.

Gardel, Margaret L., Benedikt Sabass, Lin Ji, Gaudenz Danuser, Ulrich S. Schwarz, et Clare M. Waterman. 2008. « Traction Stress in Focal Adhesions Correlates Biphasically with Actin Retrograde Flow Speed ». *The Journal of Cell Biology* 183 (6): 999-1005. https://doi.org/10.1083/jcb.200810060.

Gavara, Núria, et Richard S. Chadwick. 2012. « Determination of the Elastic Moduli of Thin Samples and Adherent Cells Using Conical Atomic Force Microscope Tips ». *Nature Nanotechnology* 7 (11): 733-36. https://doi.org/10.1038/nnano.2012.163.

Giancotti, F. G. 2000. « Complexity and Specificity of Integrin Signalling ». *Nature Cell Biology* 2 (1): E13-14. https://doi.org/10.1038/71397.

Guvendiren, Murat, et Jason A. Burdick. 2010. « The Control of Stem Cell Morphology and Differentiation by Hydrogel Surface Wrinkles ». *Biomaterials* 31 (25): 6511-18. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.037.

Halka, Anastassi T., Neill J. Turner, Andrew Carter, Jonathan Ghosh, Michael O. Murphy, John P. Kirton, Cay M. Kielty, et Michael G. Walker. 2008. « The Effects of Stretch on Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype in Vitro ». *Cardiovascular Pathology: The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 17 (2): 98-102. https://doi.org/10.1016/j.carpath.2007.03.001.

Handford, P. A., A. K. Downing, D. P. Reinhardt, et L. Y. Sakai. 2000. « Fibrillin: From Domain Structure to Supramolecular Assembly ». *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology* 19 (6): 457-70. https://doi.org/10.1016/s0945-053x(00)00100-1.

Hardt, Stefan E., Armin Just, Raffi Bekeredjian, Wolfgang Kübler, Hartmut R. Kirchheim, et Helmut F. Kuecherer. 1999. « Aortic pressure-diameter relationship assessed by intravascular ultrasound: experimental validation in dogs ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 276 (3): H1078-85. https://doi.org/10.1152/ajpheart.1999.276.3.H1078.

Helguero, Luisa A., Malin Hedengran Faulds, Jan-Åke Gustafsson, et Lars-Arne Haldosén. 2005. « Estrogen Receptors Alfa (ERα) and Beta (ERβ) Differentially Regulate Proliferation and Apoptosis of the Normal Murine Mammary Epithelial Cell Line HC11 ». *Oncogene* 24 (44): 6605-16. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208807.

Hellstrand, Per, et Sebastian Albinsson. 2005. « Stretch-Dependent Growth and Differentiation in Vascular Smooth Muscle: Role of the Actin Cytoskeleton ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 83 (10): 869-75. https://doi.org/10.1139/y05-061.

Hinek, A. 1994. « Nature and the Multiple Functions of the 67-KD Elastin-/Laminin Binding Protein ». *Cell Adhesion and Communication* 2 (3): 185-93. https://doi.org/10.3109/15419069409004436.

Hoffman, Brenton D. 2014. « The Detection and Role of Molecular Tension in Focal Adhesion Dynamics ». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 126: 3-24. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394624-9.00001-4.

Hoshiga, M., C. E. Alpers, L. L. Smith, C. M. Giachelli, et S. M. Schwartz. 1995. « Alpha-v Beta-3 Integrin Expression in Normal and Atherosclerotic Artery ». *Circulation Research* 77 (6): 1129-35. https://doi.org/10.1161/01.res.77.6.1129.

Hou, Guangpei, Wolfgang F. Vogel, et Michelle P. Bendeck. 2002. « Tyrosine Kinase Activity of Discoidin Domain Receptor 1 Is Necessary for Smooth Muscle Cell Migration

and Matrix Metalloproteinase Expression ». *Circulation Research* 90 (11): 1147-49. https://doi.org/10.1161/01.res.0000022166.74073.f8.

Humphrey, Jay D., et Martin A. Schwartz. 2021. « Vascular Mechanobiology: Homeostasis, Adaptation, and Disease ». *Annual Review of Biomedical Engineering* 23 (juillet): 1-27. https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-092419-060810.

Ilić, D., Y. Furuta, S. Kanazawa, N. Takeda, K. Sobue, N. Nakatsuji, S. Nomura, J. Fujimoto, M. Okada, et T. Yamamoto. 1995. « Reduced Cell Motility and Enhanced Focal Adhesion Contact Formation in Cells from FAK-Deficient Mice ». *Nature* 377 (6549): 539-44. https://doi.org/10.1038/377539a0.

Janmey, Paul A., Daniel A. Fletcher, et Cynthia A. Reinhart-King. 2020. « Stiffness Sensing by Cells ». *Physiological Reviews* 100 (2): 695-724. https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2019.

Kanchanawong, Pakorn, Gleb Shtengel, Ana M. Pasapera, Ericka B. Ramko, Michael W. Davidson, Harald F. Hess, et Clare M. Waterman. 2010. « Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions ». *Nature* 468 (7323): 580-84. https://doi.org/10.1038/nature09621.

Kanda, S., M. Kuzuya, M. A. Ramos, T. Koike, K. Yoshino, S. Ikeda, et A. Iguchi. 2000. « Matrix Metalloproteinase and Alphavbeta3 Integrin-Dependent Vascular Smooth Muscle Cell Invasion through a Type I Collagen Lattice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (4): 998-1005. https://doi.org/10.1161/01.atv.20.4.998.

Kielty, Cay M, Clair Baldock, David Lee, Matthew J Rock, Jane L Ashworth, et C Adrian Shuttleworth. 2002. « Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. » *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 357 (1418): 207-17. https://doi.org/10.1098/rstb.2001.1029.

Kortesmaa, J., P. Yurchenco, et K. Tryggvason. 2000. « Recombinant Laminin-8 (Alpha(4)Beta(1)Gamma(1)). Production, Purification,and Interactions with Integrins ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (20): 14853-59. https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.14853.

Koyama, N., J. Seki, S. Vergel, E. J. Mattsson, T. Yednock, N. L. Kovach, J. M. Harlan, et A. W. Clowes. 1996. « Regulation and Function of an Activation-Dependent Epitope of the Beta 1 Integrins in Vascular Cells after Balloon Injury in Baboon Arteries and in Vitro ». *The American Journal of Pathology* 148 (3): 749-61.

Kreidberg, J. A., M. J. Donovan, S. L. Goldstein, H. Rennke, K. Shepherd, R. C. Jones, et R. Jaenisch. 1996. « Alpha 3 Beta 1 Integrin Has a Crucial Role in Kidney and Lung Organogenesis ». *Development* 122 (11): 3537-47.

Kuivaniemi, H., G. Tromp, et D. J. Prockop. 1997. « Mutations in Fibrillar Collagens (Types I, II, III, and XI), Fibril-Associated Collagen (Type IX), and Network-Forming Collagen (Type X) Cause a Spectrum of Diseases of Bone, Cartilage, and Blood Vessels ». *Human Mutation* 9 (4): 300-315. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1997)9:4<300::AID-HUMU2>3.0.CO;2-9.

Lacaria, Leda, Janina R. Lange, Wolfgang H. Goldmann, Felix Rico, et José Luis Alonso. 2020. « Avβ3 Integrin Expression Increases Elasticity in Human Melanoma Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 525 (4): 836-40. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.156.

Lacolley, P., M. E. Safar, B. Lucet, K. Ledudal, C. Labat, et A. Benetos. 2001. « Prevention of Aortic and Cardiac Fibrosis by Spironolactone in Old Normotensive Rats ». *Journal of the American College of Cardiology* 37 (2): 662-67. https://doi.org/10.1016/s0735-1097(00)01129-3.

Lacolley, Patrick, Pierre Boutouyrie, Marina Glukhova, Jean-Marie Daniel Lamaziere, Pierre-François Plouin, Patrick Bruneval, Phat Vuong, Pierre Corvol, et Stéphane Laurent. 2002. « Disruption of the Elastin Gene in Adult Williams Syndrome Is Accompanied by a Paradoxical Reduction in Arterial Stiffness ». *Clinical Science (London, England: 1979)* 103 (1): 21-29. https://doi.org/10.1042/cs1030021.

Lacolley, Patrick, Véronique Regnault, Patrick Segers, et Stéphane Laurent. 2017. « Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease ». *Physiological Reviews* 97 (4): 1555-1617. https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2017.

Lacolley, Patrick, Michel E. Safar, Veronique Regnault, et Edward D. Frohlich. 2009. « Angiotensin II, mechanotransduction, and pulsatile arterial hemodynamics in hypertension ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 297 (5): H1567-75. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00622.2009.

Lagrange, Jeremy, et Philip Wenzel. 2019. « The Regulatory Role of Coagulation Factors in Vascular Function ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 24 (janvier): 494-513. https://doi.org/10.2741/4731.

Lagrange, Jérémy, Morel E. Worou, Jean-Baptiste Michel, Alexandre Raoul, Mélusine Didelot, Vincent Muczynski, Paulette Legendre, et al. 2021. « The VWF/LRP4/AVβ3-Axis Represents a Novel Pathway Regulating Proliferation of Human Vascular Smooth Muscle Cells ». *Cardiovascular Research*, février. https://doi.org/10.1093/cvr/cvab042.

Laurent, Stephane, John Cockcroft, Luc Van Bortel, Pierre Boutouyrie, Cristina Giannattasio, Daniel Hayoz, Bruno Pannier, Charalambos Vlachopoulos, Ian Wilkinson, et Harry Struijker-Boudier. 2006. « Expert Consensus Document on Arterial

Stiffness: Methodological Issues and Clinical Applications. » *European Heart Journal* 27 (21): 2588-2605. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehl254.

Lee, Stephen S.J., Vroni Knott, Jelena Jovanović, Karl Harlos, Jonathan M. Grimes, Laurence Choulier, Helen J. Mardon, David I. Stuart, et Penny A. Handford. 2004. « Structure of the Integrin Binding Fragment from Fibrillin-1 Gives New Insights into Microfibril Organization ». *Structure (London, England : 1993)* 12 (4): 717-29. https://doi.org/10.1016/j.str.2004.02.023.

Li, Jie, Kamil Elkhoury, Claire Barbieux, Michel Linder, Stéphanie Grandemange, Ali Tamayol, Grégory Francius, et Elmira Arab-Tehrany. 2020. « Effects of Bioactive Marine-Derived Liposomes on Two Human Breast Cancer Cell Lines ». *Marine Drugs* 18 (4): 211. https://doi.org/10.3390/md18040211.

Loufrani, Laurent, Kevin Retailleau, Arnaud Bocquet, Odile Dumont, Kerstin Danker, Huguette Louis, Patrick Lacolley, et Daniel Henrion. 2008. « Key role of α1β1-integrin in the activation of PI3-kinase-Akt by flow (shear stress) in resistance arteries ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 294 (4): H1906-13. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00966.2006.

Louis, Huguette, Augustine Kakou, Veronique Regnault, Carlos Labat, Aude Bressenot, Jacqueline Gao-Li, Humphrey Gardner, et al. 2007a. « Role of α1β1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 293 (4): H2597-2604. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00299.2007.

———. 2007b. « Role of α1β1-integrin in arterial stiffness and angiotensin-induced arterial wall hypertrophy in mice ». *American Journal of Physiology-Heart and*

Circulatory Physiology 293 (4): H2597-2604. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00299.2007.

Mack, C. P., A. V. Somlyo, M. Hautmann, A. P. Somlyo, et G. K. Owens. 2001. « Smooth Muscle Differentiation Marker Gene Expression Is Regulated by RhoA-Mediated Actin Polymerization ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (1): 341-47. https://doi.org/10.1074/jbc.M005505200.

Mao, Xianqing, Rose Said, Huguette Louis, Jean-Pierre Max, Mustapha Bourhim, Pascal Challande, Denis Wahl, Zhenlin Li, Veronique Regnault, et Patrick Lacolley. 2012. « Cyclic Stretch-Induced Thrombin Generation by Rat Vascular Smooth Muscle Cells Is Mediated by the Integrin Avβ3 Pathway ». *Cardiovascular Research* 96 (3): 513-23. https://doi.org/10.1093/cvr/cvs274.

Matsumae Hironobu, Yoshida Yoshinori, Ono Koh, Togi Kiyonori, Inoue Katsumi, Furukawa Yutaka, Nakashima Yasuhiro, et al. 2008. « CCN1 Knockdown Suppresses Neointimal Hyperplasia in a Rat Artery Balloon Injury Model ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28 (6): 1077-83. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.162362.

McCallinhart, Patricia E., Youjin Cho, Zhe Sun, Samir Ghadiali, Gerald A. Meininger, et Aaron J. Trask. 2020. « Reduced stiffness and augmented traction force in type 2 diabetic coronary microvascular smooth muscle ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 318 (6): H1410-19. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00542.2019.

Michel, Jean-Baptiste, Zhenlin Li, et Patrick Lacolley. 2012. « Smooth muscle cells and vascular diseases ». *Cardiovascular Research* 95 (2): 135-37. https://doi.org/10.1093/cvr/cvs172.

Mithieux, Suzanne M., et Anthony S. Weiss. 2005. « Elastin ». *Advances in Protein Chemistry* 70: 437-61. https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70013-9.

Mousa, Shaker A., et David A. Cheresh. 1997. « Recent Advances in Cell Adhesion Molecules and Extracellular Matrix Proteins: Potential Clinical Implications ». *Drug Discovery Today* 2 (5): 187-99. https://doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01027-1.

Mui, Keeley L., Yong Ho Bae, Lin Gao, Shu-Lin Liu, Tina Xu, Glenn L. Radice, Christopher S. Chen, et Richard K. Assoian. 2015. « N-Cadherin Induction by ECM Stiffness and FAK Overrides the Spreading Requirement for Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells ». *Cell reports* 10 (9): 1477-86. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.023.

Murphy, James M., Kyuho Jeong, et Ssang-Taek Steve Lim. 2020. « FAK Family Kinases in Vascular Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (10): 3630. https://doi.org/10.3390/ijms21103630.

Myllyharju, J., et K. I. Kivirikko. 2001. « Collagens and Collagen-Related Diseases ». *Annals of Medicine* 33 (1): 7-21. https://doi.org/10.3109/07853890109002055.

Nakao, Nobuhiko, Koichiro Maki, Mohammad R. K. Mofrad, et Taiji Adachi. 2019. « Talin Is Required to Increase Stiffness of Focal Molecular Complex in Its Early Formation Process ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 518 (3): 579-83. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.091.

Owens, Gary K., Meena S. Kumar, et Brian R. Wamhoff. 2004. « Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease ». *Physiological Reviews* 84 (3): 767-801. https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2003.

Pepin, M., U. Schwarze, A. Superti-Furga, et P. H. Byers. 2000. « Clinical and Genetic Features of Ehlers-Danlos Syndrome Type IV, the Vascular Type ». *The New England Journal of Medicine* 342 (10): 673-80. https://doi.org/10.1056/NEJM200003093421001.

Pickering, J. G., L. H. Chow, S. Li, K. A. Rogers, E. F. Rocnik, R. Zhong, et B. M. Chan. 2000. « Alpha5beta1 Integrin Expression and Luminal Edge Fibronectin Matrix Assembly by Smooth Muscle Cells after Arterial Injury ». *The American Journal of Pathology* 156 (2): 453-65. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64750-5.

Polyakov, Pavel, Charles Soussen, Junbo Duan, Jérôme F. L. Duval, David Brie, et Grégory Francius. 2011. « Automated Force Volume Image Processing for Biological Samples ». *PloS One* 6 (4): e18887. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018887.

Priddle, Helen, Lance Hemmings, Susan Monkley, Alison Woods, Bipin Patel, Deborah Sutton, Graham A. Dunn, Daniel Zicha, et David R. Critchley. 1998. « Disruption of the Talin Gene Compromises Focal Adhesion Assembly in Undifferentiated but Not Differentiated Embryonic Stem Cells ». *The Journal of Cell Biology* 142 (4): 1121-33.

Provenzano, Paolo P., et Patricia J. Keely. 2011. « Mechanical Signaling through the Cytoskeleton Regulates Cell Proliferation by Coordinated Focal Adhesion and Rho GTPase Signaling ». *Journal of Cell Science* 124 (Pt 8): 1195-1205. https://doi.org/10.1242/jcs.067009.

Qiu, Hongyu, Yi Zhu, Zhe Sun, Jerome P. Trzeciakowski, Meredith Gansner, Christophe Depre, Ranillo R. G. Resuello, et al. 2010. « Short Communication: Vascular Smooth Muscle Cell Stiffness as a Mechanism for Increased Aortic Stiffness with Aging ». *Circulation Research* 107 (5): 615-19. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.221846.

Reindel, Rebecca, Susan C. Baker, Kwang-Youn Kim, Carol A. Rowley, Stanford T. Shulman, Jan M. Orenstein, Elizabeth J. Perlman, Mark W. Lingen, et Anne H. Rowley. 2013. « Integrins A4 and AM, Collagen1A1, and Matrix Metalloproteinase 7 Are Upregulated in Acute Kawasaki Disease Vasculopathy ». *Pediatric Research* 73 (3): 332-36. https://doi.org/10.1038/pr.2012.185.

Reneman, Robert S., Jan M. Meinders, et Arnold P. G. Hoeks. 2005. « Non-Invasive Ultrasound in Arterial Wall Dynamics in Humans: What Have We Learned and What Remains to Be Solved ». *European Heart Journal* 26 (10): 960-66. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi177.

Resch, Markus, Peter Schmid, Kerstin Amann, Sabine Fredersdorf, Joachim Weil, Christian Schach, Christoph Birner, et al. 2011. « Eplerenone prevents salt-induced vascular stiffness in Zucker diabetic fatty rats: a preliminary report ». *Cardiovascular Diabetology* 10 (octobre): 94. https://doi.org/10.1186/1475-2840-10-94.

Romer, Lewis H., Konstantin G. Birukov, et Joe G. N. Garcia. 2006. « Focal Adhesions: Paradigm for a Signaling Nexus ». *Circulation Research* 98 (5): 606-16. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000207408.31270.db.

Ruan Cheng-Chao, Zhu Ding-Liang, Chen Qi-Zhi, Chen Jing, Guo Shu-Jie, Li Xiao-Dong, et Gao Ping-Jin. 2010. « Perivascular Adipose Tissue–Derived Complement 3 Is Required for Adventitial Fibroblast Functions and Adventitial Remodeling in Deoxycorticosterone Acetate–Salt Hypertensive Rats ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (12): 2568-74. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.215525.

Rüegg, C., et A. Mariotti. 2003. « Vascular Integrins: Pleiotropic Adhesion and Signaling Molecules in Vascular Homeostasis and Angiogenesis ». *Cellular and*

Molecular Life Sciences: CMLS 60 (6): 1135-57. https://doi.org/10.1007/s00018-003-2297-3.

Rupp, Paul A., András Czirók, et Charles D. Little. 2004. « Alphavbeta3 Integrin-Dependent Endothelial Cell Dynamics in Vivo ». *Development (Cambridge, England)* 131 (12): 2887-97. https://doi.org/10.1242/dev.01160.

Safar, Michel E., Jacques Blacher, et Piotr Jankowski. 2011. « Arterial Stiffness, Pulse Pressure, and Cardiovascular Disease—Is It Possible to Break the Vicious Circle? » *Atherosclerosis* 218 (2): 263-71. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.039.

Samouillan, Valerie, Jany Dandurand, Laura Nasarre, Lina Badimon, Colette Lacabanne, et Vicenta Llorente-Cortés. 2012. « Lipid Loading of Human Vascular Smooth Muscle Cells Induces Changes in Tropoelastin Protein Levels and Physical Structure ». *Biophysical Journal* 103 (3): 532-40. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.06.034.

Saphirstein, Robert J., Yuan Z. Gao, Mikkel H. Jensen, Cynthia M. Gallant, Susanne Vetterkind, Jeffrey R. Moore, et Kathleen G. Morgan. 2013. « The Focal Adhesion: A Regulated Component of Aortic Stiffness ». *PLoS ONE* 8 (4): e62461. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062461.

Scheppke, Lea, Eric A. Murphy, Alessandro Zarpellon, Jennifer J. Hofmann, Alona Merkulova, David J. Shields, Sara M. Weis, et al. 2012. « Notch Promotes Vascular Maturation by Inducing Integrin-Mediated Smooth Muscle Cell Adhesion to the Endothelial Basement Membrane ». *Blood* 119 (9): 2149-58. https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348706.

Schlaepfer, David D., Satyajit K. Mitra, et Dusko Ilic. 2004. « Control of Motile and Invasive Cell Phenotypes by Focal Adhesion Kinase ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1692 (2-3): 77-102. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.008.

Schnapp, L. M., J. M. Breuss, D. M. Ramos, D. Sheppard, et R. Pytela. 1995. « Sequence and Tissue Distribution of the Human Integrin Alpha 8 Subunit: A Beta 1-Associated Alpha Subunit Expressed in Smooth Muscle Cells ». *Journal of Cell Science* 108 (Pt 2) (février): 537-44.

Schnapp, L. M., N. Hatch, D. M. Ramos, I. V. Klimanskaya, D. Sheppard, et R. Pytela. 1995. « The Human Integrin Alpha 8 Beta 1 Functions as a Receptor for Tenascin, Fibronectin, and Vitronectin ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (39): 23196-202. https://doi.org/10.1074/jbc.270.39.23196.

Seawright, John W., Harini Sreenivasappa, Holly C. Gibbs, Samuel Padgham, Song Y. Shin, Christine Chaponnier, Alvin T. Yeh, Jerome P. Trzeciakowski, Christopher R. Woodman, et Andreea Trache. 2018. « Vascular Smooth Muscle Contractile Function Declines With Age in Skeletal Muscle Feed Arteries ». *Frontiers in Physiology* 9 (juillet): 856. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00856.

Shanahan, Catherine M., Matthew H. Crouthamel, Alexander Kapustin, et Cecilia M. Giachelli. 2011. « Arterial Calcification in Chronic Kidney Disease: Key Roles for Calcium and Phosphate ». *Circulation Research* 109 (6): 697-711. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.234914.

Shen, Kai, Harshavardhan Kenche, Hua Zhao, Jinping Li, et Jasimine Stone. 2019. « The Role of Extracellular Matrix Stiffness in Regulating Cytoskeletal Remodeling via Vinculin in Synthetic Smooth Muscle Cells ». *Biochemical and biophysical research communications* 508 (1): 302-7. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.142.

Sheppard, Allan M., Michael D. Onken, Clknn D. Rosen, Peter G. Noakes, et Douglas C. Dean. 1994. « Expanding Roles for α4 Integrin and its Ligands in Development ». *Cell Adhesion and Communication* 2 (1): 27-43. https://doi.org/10.3109/15419069409014200.

Sinha, Sanjay, Dharini Iyer, et Alessandra Granata. 2014. « Embryonic Origins of Human Vascular Smooth Muscle Cells: Implications for in Vitro Modeling and Clinical Application ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 71 (12): 2271-88. https://doi.org/10.1007/s00018-013-1554-3.

Sit, Brian, Zhen Feng, Ioannis Xanthis, Emilie Marhuenda, Simona Zingaro, Cathy Shanahan, Gareth E. Jones, Cheng-han Yu, et Thomas Iskratsch. 2020. « Matrix Stiffness and Blood Pressure Together Regulate Vascular Smooth Muscle Cell Phenotype Switching and Cofilin Dependent Podosome Formation ». https://doi.org/10.1101/2020.12.27.424498.

Smith, P. G., R. Garcia, et L. Kogerman. 1997. « Strain Reorganizes Focal Adhesions and Cytoskeleton in Cultured Airway Smooth Muscle Cells ». *Experimental Cell Research* 232 (1): 127-36. https://doi.org/10.1006/excr.1997.3492.

Sporn, L. A., V. J. Marder, et D. D. Wagner. 1986. « Inducible Secretion of Large, Biologically Potent von Willebrand Factor Multimers ». *Cell* 46 (2): 185-90. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90735-x.

Srivatsa, S. S., L. A. Fitzpatrick, P. W. Tsao, T. M. Reilly, D. R. Holmes, R. S. Schwartz, et S. A. Mousa. 1997. « Selective Alpha v Beta 3 Integrin Blockade Potently Limits Neointimal Hyperplasia and Lumen Stenosis Following Deep Coronary Arterial Stent Injury: Evidence for the Functional Importance of Integrin Alpha v Beta 3 and

Osteopontin Expression during Neointima Formation ». *Cardiovascular Research* 36 (3): 408-28. https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00184-3.

Sun, Zhe, Luis A. Martinez-Lemus, Michael A. Hill, et Gerald A. Meininger. 2008. « Extracellular matrix-specific focal adhesions in vascular smooth muscle produce mechanically active adhesion sites ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295 (1): C268-78. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00516.2007.

Swirski, Filip K., et Matthias Nahrendorf. 2014. « Do Vascular Smooth Muscle Cells Differentiate to Macrophages in Atherosclerotic Lesions? » *Circulation Research* 115 (7): 605-6. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.304925.

Tardy, Y., J. J. Meister, F. Perret, H. R. Brunner, et M. Arditi. 1991. « Non-Invasive Estimate of the Mechanical Properties of Peripheral Arteries from Ultrasonic and Photoplethysmographic Measurements ». *Clinical Physics and Physiological Measurement: An Official Journal of the Hospital Physicists' Association, Deutsche Gesellschaft Fur Medizinische Physik and the European Federation of Organisations for Medical Physics* 12 (1): 39-54. https://doi.org/10.1088/0143-0815/12/1/003.

« The alpha 6 and beta 4 integrin subunits are expressed by smooth muscle cells of human small vessels: a new localization in mesenchymal cells. - O Cremona, P Savoia, P C Marchisio, G Gabbiani, C Chaponnier, 1994 ». s. d. Consulté le 1 avril 2021. https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/42.9.8064129.

Vlachopoulos, Charalambos, Michael O'Rourke, et Wilmer W. Nichols. 2011. *McDonald's Blood Flow in Arteries: Theoretical, Experimental and Clinical Principles*. CRC Press.

Vucko, Timothé, Nicolas Pétry, François Dehez, Alexandrine Lambert, Antonio Monari, Cécile Lakomy, Patrick Lacolley, et al. 2019. « C-Glyco"RGD" as AIIbβ3 and Avβ

Integrin Ligands for Imaging Applications: Synthesis, in Vitro Evaluation and Molecular Modeling ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 27 (18): 4101-9. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.07.039.

Wang, H. B., M. Dembo, et Y. L. Wang. 2000. « Substrate Flexibility Regulates Growth and Apoptosis of Normal but Not Transformed Cells ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 279 (5): C1345-1350. https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.279.5.C1345.

Webb, Donna J., Karen Donais, Leanna A. Whitmore, Sheila M. Thomas, Christopher E. Turner, J. Thomas Parsons, et Alan F. Horwitz. 2004. « FAK-Src Signalling through Paxillin, ERK and MLCK Regulates Adhesion Disassembly ». *Nature Cell Biology* 6 (2): 154-61. https://doi.org/10.1038/ncb1094.

Welser Jennifer V., Lange Naomi, Singer Cherie A., Elorza Margaret, Scowen Paul, Keef Kathleen D., Gerthoffer William T., et Burkin Dean J. 2007. « Loss of the α7 Integrin Promotes Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation and Altered Vascular Remodeling ». *Circulation Research* 101 (7): 672-81. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.151415.

Wiesner, S., K. R. Legate, et R. Fässler. 2005. « Integrin-Actin Interactions ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (10): 1081-99. https://doi.org/10.1007/s00018-005-4522-8.

Wise, Steven G., et Anthony S. Weiss. 2009. « Tropoelastin ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (3): 494-97. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.03.017.

Wnuck Lipinski, Karin von, Petra Keul, Nicola Ferri, Susann Lucke, Gerd Heusch, Jens W. Fischer, et Bodo Levkau. 2006. « Integrin-Mediated Transcriptional Activation of

Inhibitor of Apoptosis Proteins Protects Smooth Muscle Cells against Apoptosis Induced by Degraded Collagen ». *Circulation Research* 98 (12): 1490-97. https://doi.org/10.1161/01.RES.0000229267.77982.0d.

Wu, X., J. E. Mogford, S. H. Platts, G. E. Davis, G. A. Meininger, et M. J. Davis. 1998. « Modulation of Calcium Current in Arteriolar Smooth Muscle by Alphav Beta3 and Alpha5 Beta1 Integrin Ligands ». *The Journal of Cell Biology* 143 (1): 241-52. https://doi.org/10.1083/jcb.143.1.241.

Xu, Han, Stephanie Donegan, Jordan M. Dreher, Alicia J. Stark, Elizabeth P. Canović, Dimitrije Stamenović, et Michael L. Smith. 2020. « Focal Adhesion Displacement Magnitude Is a Unifying Feature of Tensional Homeostasis ». *Acta Biomaterialia* 113 (septembre): 372-79. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.043.

Yamamoto, K., et M. Yamamoto. 1994. « Cell Adhesion Receptors for Native and Denatured Type I Collagens and Fibronectin in Rabbit Arterial Smooth Muscle Cells in Culture ». *Experimental Cell Research* 214 (1): 258-63. https://doi.org/10.1006/excr.1994.1256.

Yan, Wenhua, Tianhan Li, Tieying Yin, Zhengjun Hou, Kai Qu, Nan Wang, Colm Durkan, et al. 2020. « M2 macrophage-derived exosomes promote the c-KIT phenotype of vascular smooth muscle cells during vascular tissue repair after intravascular stent implantation ». *Theranostics* 10 (23): 10712-28. https://doi.org/10.7150/thno.46143.

Yao, C. C., B. L. Ziober, R. M. Squillace, et R. H. Kramer. 1996. « Alpha7 Integrin Mediates Cell Adhesion and Migration on Specific Laminin Isoforms ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (41): 25598-603. https://doi.org/10.1074/jbc.271.41.25598.

Yee, K. O., M. M. Rooney, C. M. Giachelli, S. T. Lord, et S. M. Schwartz. 1998. « Role of Beta1 and Beta3 Integrins in Human Smooth Muscle Cell Adhesion to and Contraction of Fibrin Clots in Vitro ». *Circulation Research* 83 (3): 241-51. https://doi.org/10.1161/01.res.83.3.241.

Yeung, Tony, Penelope C. Georges, Lisa A. Flanagan, Beatrice Marg, Miguelina Ortiz, Makoto Funaki, Nastaran Zahir, Wenyu Ming, Valerie Weaver, et Paul A. Janmey. 2005. « Effects of Substrate Stiffness on Cell Morphology, Cytoskeletal Structure, and Adhesion ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 60 (1): 24-34. https://doi.org/10.1002/cm.20041.

Zargham, Ramin, et Gaétan Thibault. 2006. « α8 Integrin expression is required for maintenance of the smooth muscle cell differentiated phenotype ». *Cardiovascular Research* 71 (1): 170-78. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.03.003.

Zeidan, Asad, Jonas Broman, Per Hellstrand, et Karl Swärd. 2003. « Cholesterol Dependence of Vascular ERK1/2 Activation and Growth in Response to Stretch: Role of Endothelin-1 ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23 (9): 1528-34. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000090129.75275.C2.

Zhao, Junwei, Federica Santino, Daria Giacomini, et Luca Gentilucci. 2020. « Integrin-Targeting Peptides for the Design of Functional Cell-Responsive Biomaterials ». *Biomedicines* 8 (9): 307. https://doi.org/10.3390/biomedicines8090307.

Zhao, Yingzi, Paul M. Vanhoutte, et Susan W. S. Leung. 2015. « Vascular Nitric Oxide: Beyond ENOS ». *Journal of Pharmacological Sciences* 129 (2): 83-94. https://doi.org/10.1016/j.jphs.2015.09.002.

Zhu, Yi, Hongyu Qiu, Jerome P. Trzeciakowski, Zhe Sun, Zhaohui Li, Zhongkui Hong, Michael A. Hill, et al. 2012. « Temporal Analysis of Vascular Smooth Muscle Cell

Elasticity and Adhesion Reveals Oscillation Waveforms That Differ with Aging ». *Aging Cell* 11 (5): 741-50. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00840.x.

Zieman Susan J., Melenovsky Vojtech, et Kass David A. 2005. « Mechanisms, Pathophysiology, and Therapy of Arterial Stiffness ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25 (5): 932-43. https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000160548.78317.29.

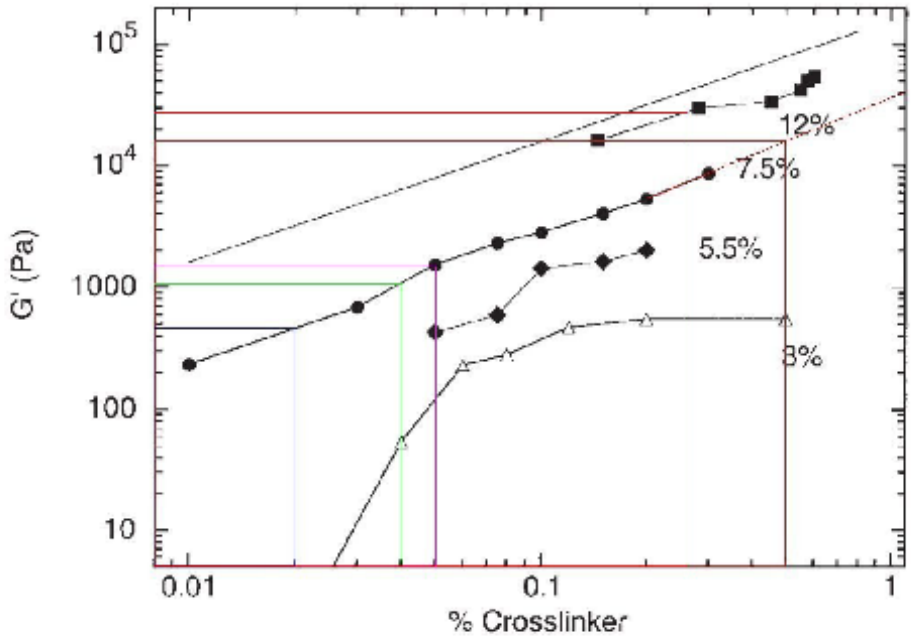
Annexes

Annexe 1

Preparation of polyacrylamide gel coated coverslips at given modulus

Following Figure 1 of the following paper:

Yeung T, Georges PC, Flanagan LA, Marg B, Ortiz M, Funaki M, Zahir N, Ming W, Weaver V, Janmey PA. Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion. Cell Motil Cytoskeleton. 2005 Jan;60(1):24-34.



We can extract the following conditions for some given gel modulus:

-	28 kPa	12% acrylamide	0.26% bis-acrylamide
-	17 kPa	12% acrylamide	0.15% bis-acrylamide
-	17 kPa	7.5% acrylamide	0.50% bis-acrylamide
-	1.5 kPa	7.5% acrylamide	0.05% bis-acrylamide
-	1 kPa	7.5% acrylamide	0.04% bis-acrylamide

And to reach the targeted concentration, we start with:

- 30% w/v acrylamide solution obtained by mixing 15 g acrylamide with 35 ml milli-Q water
- 1% w/v bis-acrylamide solution obtained by mixing 500 mg bisacrylamide with 49.5 ml milli-Q water

Also we first prepare 4.5 ml of solution (which is degassed for 30min) from which we then take 450µl that is then diluted in 50 µl of Hepes.

Annexe 2

Séquence du plasmide FAK-GFP :

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG
GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT
TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC
CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGT
ACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCA
CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCG
TAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACC
GTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGCCGAGCTGTTCACCGGCATCGTGCCCATCCTGATCG
AGCTGAATGGCGATGTGAATGGCCACAAGTTCAGCGTGAGCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTG
AAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCTGTGCCCTGGCCCACCCTGGTGACCACCCTGAGCTACGGCGTGCAGTGCTTCTC
ACGCTACCCCGATCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCTGAGGGCTACATCCAGGAGCGCACCATCTTCT
TCGAGGATGACGGCAACTACAAGTCGCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGATACCCTGGTGAATCGCATCGAGCTGACCGGC
ACCGATTTCAAGGAGGATGGCAACATCCTGGGCAATAAGATGGAGTACAACTACAACGCCCACAATGTGTACATCATGACCGA
CAAGGCCAAGAATGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGATGGCAGCGTGCAGCTGGCCGACCACTACC
AGCAGAATACCCCCATCGGCGATGGCCCTGTGCTGCTGCCCGATAACCACTACCTGTCCACCCAGAGCGCCCTGTCCAAGGAC
CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGATCTACTTCGGCTTCGTGACCGCCGCCGCCATCACCCACGGCATGGATGAGCTGTACAA
GTCCGGACTC**Agatct**atggcagctgcttaccttgaccccaacttgaatcacacaccaaattcgagtactaagactcacctgg
gtactggtatggaacgttctcctggtgcaatggagcga**A**tattaaaggtctttcattattttgaaagcaatagtgagccaacc
acctgggccagtattatcaggcatggagatgctactgatgtcaggggcatcattcagaagatagtggacagtcacaaagtaaa
gcatgtggcctgctatggattccgcctcagtcacctgcggtcagaggaggttcactggcttcacgtggatatgggcgtctcca
gtgtgagggagaagtatgagcttgctcacccaccagaggagtggaaatatgaattgagaattc**A**ttatttgccaaaaggattt
ctaaaccagtttactgaagataagccaacttttgaatttcttctatcaacaggtgaagagcgattatatgttagagatagctga
tcaagtggaccaggaaattgctttgaagttgggttgtctagaaatacggcgatcatactgggagatgcggggcaatgcactag
aaaagaagtctaactatgaagtattagaaaaagatgttggtttaaagcgatttttttcctaagagtttactggattctgtcaag
gccaaaacactaagaaaactgatccaacaaacatttagacaatttgccaaccttaatagagaagaaagtattctgaaattctt
tgagatcctgtctccagtctacagatttgataaggaatgcttcaagtgtgctcttggttcaagctggattatttcagtggaac
tggcaatcggcccagaagaaggaatcagttacctaacggacaagggctgcaatcccacacatcttgctgacttcactcaagtg
caaaccattcagtattcaaacagtgaagacaaggacagaaaaggaatgctacaactaaaaatagcaggtgcacccgagcctct
gacagtgacggcaccatccctaaccattgcggagaatatggctgacctaatagatgggtactgccggctggtgaatggaacct
cgcagtcatttatcatcagacctcagaaagaaggtgaacgggctttgccatcaataccaaagttggccaacagcgaaaagcaa
ggcatgcggacacacgccgtctctgtgtcagaaacagatgattatgctgagattatagatgaagaagatacttacaccatgcc
ctcaaccagggattatgagattcaaagagaaagaatagaacttggacgatgtattggagaaggccaatttggagatgtacatc
aaggcatttatatgagtccagagaatccagctttggcggttgcaattaaaacatgtaaaaactgtacttcggacagcgtgaga
gagaaatttcttcaagaagccttaacaatgcgtcagtttgaccatcctcatattgtgaagctgattggagtcatcacagagaa
tcctgtctggataatcatggagctgtgcacacttggagagctgaggtcatttttgcaagtaaggaaatacagtttggatctag
catctttgatcctgtatgcctatcagcttagtacagctcttgcatatctagagagcaaaagatttgtacacagggacattgct
gctcggaatgttctggtgtcctcaaatgattgtgtaaaattaggagactttggattatcccgatatatggaagatagtactta
ctacaaagcttccaaaggaaaattgcctattaaatggatggctccagagtcaatcaattttcgacgttttacctcagctagtg
acgtatggatgtttggtgtgtgtatgtgggagatactgatgcatggtgtgaagccttttcaaggagtgaagaacaatgatgta
atcggtcgaattgaaaatggggaaagattaccaatgcctccaaattgtcctcctaccctctacagccttatgacgaaatgctg
ggcctatgaccccagcaggcggcccaggtttactgaacttaaagctcagctcagcacaatcctggaggaagagaaggctcagc
aagaagagcgcatgaggatggagtccagaagacaggccacagtgtcctgggactccggagggtctgatgaagcaccgcccaag
cccagcagaccgggttatcccagtccgaggtccagcgaaggattttatcccagcccacagcacatggtacaaaccaatcatta
ccaggtttctggctaccctggttcacatggaatcacagccatggctggcagcatctatccaggtcaggcatctcttttggacc
aaacagattcatggaatcatagacctcaggagatagcaatgtggcagcccaatgtggaggactctacagtattggacctgcga
gggattgggcaagtgttgccaacccatctgatggaagagcgtctaatccgacagcaacaggaaatggaagaagatcagcgctg
gctggaaaaagaggaaagatttctgaaacctgatgtgagactctctcgaggcagtattgacagggaggatggaagtcttcagg
gtccgattggaaaccaacatatatatcagcctgtgggtaaaccagatcctgcagctccaccaaagaaaccgcctcgccctgga
gctcccggtcatctgggaagccttgccagcctcagcagccctgctgacagctacaacgagggtgtcaagc**CATGGAGGC**ttca
gccccaggaaatcagccccccctcctactgccaacctggaccggtcgaatgataaggtgtacgagaatgtgacgggcctggtga
aagctgtcatcgagatgtccagtaaaatccagccagccccaccagaggagtatgtccctatggtgaaggaagtcggcttggcc
ctgaggacattattggccactgtggatgagaccattcccctcctaccagccagcacccaccgagagattgagatggcacagaa
gctattgaactctgacctgggtgagctcatcaacaagatgaaactggcccagcagtatgtcatgaccagcctccagcaagagt
acaaaaagcaaatgctgactgctgctcacgccctggctgtggatgccaaaaacttactcgatgtcattgaccaagcaagactg
aaaatgct**A**gggcagacgagaccacactga**gTCGAC**
CAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCA
TTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAACGCGTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGT
TAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAA
GAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGG

GCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAG
CACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAG
AAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGC
GCCGCTACAGGGCGCGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA
ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCCTGAGGCGGAAAGAACC
AGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAAT
TAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAAC
CATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTT
TTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGC
TTTTGCAAAGATCGAT**ATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCT**
CCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCTGCGGGTA
AATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCT
TGACATTGGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTCACGTTGCAAGACCTGCCTGAAA
CCGAACTGCCCGCTGTTCTGCAGCCGGTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTC
GGCCCATTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCA
CTGGCAAACTGTGATGGACGACACCGTCAGTGCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCC
CCGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTCGGCTCCAACAATGTCCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCATTGAC
TGGAGCGAGGCGATGTTCGGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGTATGGAGCA
GCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCATTGGTCTTG
ACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCC
GGAGCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGA
TAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTTCTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGT
AGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACT
TGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCCTCGC
GATCCACAACCATGGCGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTC
AGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
GACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCC
TTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC
ACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGA
GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTAT
TCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGC
TGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGC
ACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACC
ACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAT
AGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACG
ACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGGCGC
GCCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGG
TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAG
ATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGT
TTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTC
TAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTG
GCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTG
AACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAA
GCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTT
CCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTC
AGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT
TCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT

Agatct : bglII

gTCGAC : SalI

ATGGTG…GAGCTGTACAAG : GFP
Atggcagc… cacactga : hFAK
NB : 4 mutations :

- En position 106 en acide nucléique : A au lieu de G -> Ile au lieu de Val
- En position 380 en acide nucléique : A au lieu de G -> His au lieu de Arg
- En position 2711 en acide nucléique : insertion de 9pb soit insertion des acides aminés PWR
- En position 3147 en acide nucléique : A au lieu de T (mutation silencieuse)

Résumé :

L'augmentation de la rigidité artérielle est un facteur de risque dans le développement des pathologies cardiovasculaires. Elle implique un ensemble de mécanismes complexes correspondant à la rigidité de chaque élément de la paroi. Dans la media les interactions entre les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et la matrice extracellulaire (MEC) s'effectuent par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et d'adhérences focales (AF) qui permettent la mécanotransduction. Les CMLVs ont de nombreux rôles physiopathologiques, elles interviennent en particulier dans le maintien du tonus myogénique et la motilité artérielle mais le laboratoire a également mis évidence son rôle dans la coagulation en particulier via l'$\alpha_v\beta_3$ comme récepteur pour la prothrombine. Ainsi notre hypothèse est que l'intégrine est impliquée dans la réponse des CMLVs dans la rigidité artérielle et ses mécanismes physiopathologiques. Les objectifs de ce travail ont été d'étudier l'adaptation des CMLVs à des MECs de rigidités différentes et l'impact de ces modifications dans la physiologie cellulaire et vasculaires. Les résultats de ces travaux montrent que la rigidité des CMLVs augmente avec la rigidité de la MEC. La synthèse des protéines impliquées dans les AF et la phosphorylation de la *focal adhesion kinase* (FAK) sont également augmentées avec la rigidité du support. Au niveau fonctionnel avec l'exemple de la coagulation, la génération de thrombine à la surface des CMLVs diminue lorsque la rigidité augmente et, l'utilisation d'un inhibiteur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ limite encore plus la génération de thrombine. Enfin, nous avons observé dans des aortes athérosclérotiques humaines une colocalisation du facteur von Willebrand (VWF) et de l'alpha actine des CMLVs et mis en évidence un rôle prolifératif du VWF sur les CMLVs via l'αvβ3. Cette fonction a été confirmée dans un modèle de souris déficiente en VWF. Lors de l'invalidation de cette intégrine dans un modèle de souris (α^{smKO}) traité avec de l'angiotensine II (Ang II) nous avons mesuré une rigidité artérielle aortique semblable au groupe contrôle. Cependant la rigidité cellulaire des CMLVs α^{smKO} traitées par Ang II était significativement plus importante. En conclusion, ces résultats ont montré le rôle majeur de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans les fonctions des CMLVs, autant dans leurs adaptations aux stimuli extérieurs comme des rigidités de la MEC que dans leurs fonctions en induisant une diminution de la génération de thrombine ou en participant à leur prolifération via le VWF.

Mots-clés : Intégrine $\alpha_v\beta_3$, cellules musculaires lisses vasculaires, hémostase, facteur von Willebrand, génération de thrombine.

Summary :

Arterial stiffness increase is a major risk factor in the development of cardiovascular pathologies. It involves complex mechanisms corresponding to the rigidity of each element of the arterial wall. In the media, interactions between vascular smooth muscle cells (VSMC) and extracellular matrix (ECM) are mediated by $\alpha_v\beta_3$ integrin and focal adhesions (FA) which allow mechanotransduction. VSMCs have several physiopathological roles, they are involved in myogenic tone and arterial motility, and our laboratory has also demonstrated its role in coagulation, in particular via $\alpha_v\beta_3$ as a prothrombin receptor. Our hypothesis is that integrin is involved in the response of VSMCs in arterial stiffness and its pathophysiological mechanisms. The objectives of this work were to study the adaptation of VSMCs to ECMs with different rigidities and the impact of these modifications on cell and vascular physiology. The results of this work show that the rigidity of VSMCs increases with the rigidity of the ECM. The synthesis of proteins involved in AF and phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK) were increased with the stiffness of the support. Functionally with the example of coagulation, the thrombin generation thrombin on the VSMCs surface decreases with increasing rigidity, and the use of an integrin inhibitor of $\alpha_v\beta_3$ further limits thrombin generation. Finally, we observed in human atherosclerotic aortas a co-localization of von Willebrand factor (VWF) and VSMCs and demonstrated a proliferative role of VWF on VSMCs via $\alpha_v\beta_3$. This function was confirmed in a VWF-deficient mouse model. The invalidation of this integrin in a mouse model (α^{smKO}) treated with angiotensin II (Ang II) we measured aortic arterial stiffness similar to the control, however the cellular stiffness of the α^{smKO} VSMC's treated with Ang II was significantly more important. These results showed the major role of $\alpha_v\beta_3$ integrin in the cellular biology of VSMCs, and in their adaptations to external stimuli such as rigidities of the ECM in their functions by inducing a decrease in the ability to support thrombin generation or in participating in their proliferation *via* the VWF. In conclusion, CMLVs, through its many roles, play a role on many scales in pathologies linked to aging. $\alpha_v\beta_3$ integrin is involved in many pathways of different functions and could be a therapeutic target of choice in order to modulate the responses of the arterial wall in aging.

Keywords : $\alpha_v\beta_3$ integrin, vascular smooth muscle cells, hemostasis, von Willebrand factor, thrombin generation.