

Université de Montréal

**Expression de la protéine Thy-1 sur  
les fibroblastes cardiaques et lors  
de la fibrose cardiaque**

par

François Hudon-David

Institut de recherche clinique de Montréal

Unité de Biologie Cellulaire de l'Hypertension

Département de Sciences Biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.)  
en sciences biomédicales

Août 2006

©François Hudon-David, 2006





## AVIS

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

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

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

## NOTICE

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

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

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

**Page d'identification du jury**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Expression de la protéine Thy-1 sur les fibroblastes  
cardiaques et lors de la fibrose cardiaque**

présenté par

François Hudon-David

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr Angelino Calderone**

président-rapporteur

**Dr Gaétan Thibault**

directeur de recherche

**Dr Denis Deblois**

membre du jury

Mémoire accepté le : \_\_\_\_\_

## SOMMAIRE

L'hypertension artérielle est un des principaux facteurs de risques des maladies cardiovasculaires et est une cause majeure d'hypertrophie et de fibrose cardiaque. Cette dernière se présente comme étant une accumulation de la matrice extracellulaire causant une modification des propriétés élastiques du myocarde et la diminution de la fonction cardiaque. Elle se traduit par le changement de phénotype des fibroblastes cardiaques en un phénotype contractile (myofibroblastes), suite à divers stimuli.

La protéine Thy-1 étant exprimée à la surface de différents fibroblastes, la présente étude avait pour but d'examiner son expression sur les fibroblastes cardiaques de rat ainsi que son implication dans la fibrose cardiaque. Thy-1 est une protéine à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), présente dans les radeaux lipidiques. De fonction encore inconnue, elle semble être impliquée dans l'adhésion cellulaire en raison de sa structure d'immunoglobuline et dans la signalisation intracellulaire via une association avec des kinases comme SFKs.

Nous avons pu confirmer l'expression de Thy-1 par tous les fibroblastes cardiaques de rat, à l'intérieur de radeaux lipidiques distincts de ceux contenant de la cavéoline-1 ou de la flotilline-1. Bien que l'expression de Thy-1 augmente dans les zones de fibrose cardiaque chez les rats DOCA-sel, elle est indépendante du phénotype (contractile ou non) des fibroblastes. Sa liaison avec certains leucocytes jouerait un rôle dans le recrutement de granulocytes et de monocytes vers les régions fibrotiques. Les prochaines études seront facilitées par l'utilisation d'un modèle de rats déficients en fibroblastes cardiaques sur lequel nous avons travaillé, qui est basé sur l'injection intramyocardique d'une immunotoxine ciblant la protéine Thy-1.

**Mots-clé :** CD90, fibroblastes, myofibroblastes, matrice extracellulaire, hypertension, ischémie, inflammation, recrutement cellulaire.

## **ABSTRACT**

Arterial hypertension, which is a major risk factor for cardiovascular diseases, can cause of cardiac hypertrophy and fibrosis. The latter occurs when mechanical and hormonal stimulation leads fibroblasts to change their phenotype into a contractile one, named myofibroblasts, and to overproduce extracellular matrix proteins in fibrotic regions. It causes modification of myocardium elastic properties, which decrease cardiac function.

Thy-1 is a membrane glycosylphosphatidylinositol-anchored protein expressed in lipid rafts of many different fibroblasts. We wanted to examine its expression on cardiac fibroblasts in relation to cardiac fibrosis. Although its cellular function is still unknown, Thy-1 may have a role in intracellular signalization by association with SFKs and in mice T cell activation by association with TCR/CD3. Also, its immunoglobulin-like variable domain suggests a role in inflammatory cell recruitment.

In this study, we confirmed the expression of Thy-1 on rat cardiac fibroblasts, in lipid rafts that do not contain caveolin-1 or flotillin-1. In fact, myocardium possesses a homogeneous population of fibroblasts, which express Thy-1 at diverse degrees. Although Thy-1 expression changes in hypertensive DOCA-salt rats, it is independent of fibroblast phenotype (contractile or not). In addition, preliminary results did not dismiss possibility of a non-exclusive participation of Thy-1 in monocytes and granulocytes recruitment toward fibrosis regions, via an unknown ligand. Other studies have to be done to precise these results, by using a cardiac-fibroblast deficient rat model on which we worked here, based on the intra-myocardium injection of an immunotoxin specific to Thy-1.

**Key words:** CD90, fibroblasts, myofibroblasts, extracellular matrix, hypertension, inflammation, cells recruitment, ischemia.

## TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	ix

### 1. INTRODUCTION: Le Système Cardiovasculaire

<b>1.1. Organes et tissus formant le système cardiovasculaire.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Fonction cardiaque.....</b>	<b>2</b>
1.2.1. <u>Fonction et anatomie structurelle du cœur</u> .....	2
1.2.2. <u>Composition cellulaire et moléculaire du cœur</u> .....	4
1.2.2.1. <u>Cardiomyocytes</u> .....	5
➤ <u>Caractéristiques</u> .....	5
➤ <u>Contraction</u> .....	5
1.2.2.2. <u>Fibroblastes cardiaques</u> .....	7
➤ <u>Fibroblastes VS Myofibroblastes</u> .....	7
➤ <u>Matrice extracellulaire</u> .....	10
1.2.3. <u>Pathologies cardiaques</u> .....	12
1.2.3.1. <u>Description du phénomène et des conséquences</u> .....	12
1.2.3.2. <u>Hypertrophie cardiaque : types, causes et conséquences</u> ...	13
1.2.3.3. <u>Fibrose cardiaque</u> .....	17
➤ <u>Description générale et conséquences</u> .....	17
➤ <u>Causes et voies de signalisation</u> .....	19
<b>1.3. Tension artérielle.....</b>	<b>23</b>
1.3.1. <u>Homéostasie</u> .....	23
1.3.1.1. <u>Système Rénine-Aldostérone-Angiotensine</u> .....	25
1.3.2. <u>Hyper et hypotension</u> .....	28
1.3.3. <u>Modèles expérimentaux</u> .....	30
<b>1.4. Inflammation cardiaque</b>	
1.4.1. <u>Généralités</u> .....	31
1.4.2. <u>Recrutement et activation cellulaire</u> .....	33
1.4.2.1. <u>Cytokines</u> .....	33
1.4.2.2. <u>Protéines d'adhésion et infiltration des leucocytes</u> .....	35
1.4.3. <u>Inflammation et hypertension cardiaque</u> .....	39

<b>1.5. Protéine Thy1</b>	
1.5.1. <u>Description</u> .....	40
1.5.2. <u>Fonctions potentielles</u> .....	42
1.5.3. <u>Ligand de Thy-1</u> .....	43
1.5.4. <u>Localisation de Thy-1 dans les radeaux lipidiques</u> .....	45
<b>2. <u>HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS</u></b> .....	47
<b>3. <u>CONTRIBUTION ORIGINALE (ARTICLE)</u></b> .....	49
<b>4. <u>RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES</u></b> .....	80
4.1. <b>Implication potentielle de Thy-1           dans le recrutement de cellules inflammatoires</b> .....	80
4.2. <b>Mise au point d'un modèle de rat déficient en fibroblastes</b> .....	89
<b>5. <u>DISCUSSION</u></b> .....	93
<b>6. <u>CONCLUSION</u></b> .....	102
<b>7. <u>RÉFÉRENCES</u></b> .....	103
<b>8. <u>REMERCIEMENTS</u></b> .....	113



**LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1 : Cibles de l'AngII et ses actions..... 26**

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes suite à divers stimuli.....	9
<b>Figure 2 :</b> Activation des voies de MAP kinases par le stress mécanique.....	16
<b>Figure 3 :</b> Interactions entre différents facteurs de croissance impliqués dans la fibrose cardiaque.....	20
<b>Figure 4 :</b> Mécanismes d'activation de la fibrose périvasculaire et interstitielle suite à des stimuli pro-inflammatoires .....	22
<b>Figure 5 :</b> Extravasation des cellules inflammatoires.....	38
<b>Figure 6 :</b> Protéine Thy-1 à ancre GPI.....	41

## FIGURES ASSOCIÉES À LA CONTRIBUTION ORIGINALE

<b>Figure 1:</b> Immunohistochemical analysis of Thy-1 in control rat heart.....	74
<b>Figure 2:</b> Immunohistochemical analysis of Thy-1 in DOCA-salt rat heart.....	75
<b>Figure 3:</b> Q-PCR of Thy-1 and $\alpha 8$ integrin mRNA.....	76
<b>Figure 4:</b> Analysis of Thy-1 on cultured cardiac fibroblasts. ....	77
<b>Figure 5:</b> Lipid rafts and Thy-1 localization.....	78
<b>Figure 6:</b> TGF- $\beta$ stimulation of cardiac fibroblasts.....	79

## FIGURES DES RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

<b>Figure 1:</b> Adhésion des PBMCs sur des fibroblastes cardiaques en culture.....	81
<b>Figure 2:</b> Immunocytochimie sur essais d'adhésion cellulaire.....	83
<b>Figure 3:</b> Liaison de GST-Thy-1 aux granulocytes.....	85
<b>Figure 4:</b> Essais de compétition dans l'adhésion cellulaire... ..	87
<b>Figure 5:</b> Cytotoxicité du saporin et du conjugué OX7-SAP.....	91

**LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS**

ACE:	Angiotensin converting enzyme
AcSDKP:	Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro
ACTH:	Adrenocorticotropic hormone
ADN:	Acide désoxyribonucléique
AGT:	Angiotensinogène
ALDO:	Aldostérone
AngII:	Angiotensine II
ANP:	Atrial natriuretic peptide
AP-1:	Activator protein 1
ARN:	Acide ribonucléique
AT-1 ou 2:	Récepteurs à l'angiotensine
ATP:	Adénosine triphosphate
bFGF:	Basic fibroblast growth factor
BK:	Bradykinine
BNP:	Brain natriuretic peptide
CAM:	Cell adhesion molecule
CatD:	Cathepsine D
CatG:	Cathepsine G
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CSF-1:	Colony-stimulating factor-1
DOCA:	Desoxycorticosterone acetate
EGF:	Epidermal growth factor
ERK:	Extracellular-signal regulated kinase
ET-1:	Endothéline-1
F-actine :	Actine filamenteuse
FAK:	Focal adhesion kinase
FGF-2:	Fibroblast growth factor 2
G:	Gap
G-CSF:	Granulocyte colony-stimulating factor

GPI:	Glycosylphosphatidylinositol
GTPase:	Guanidine triphosphatase
GST:	Glutathione S-transferase
HCP:	Hypertrophie cardiaque pathologique
HDMEC:	Human dermal microvascular endothelial cells
HML:	Human mononuclear leukocytes
HSP:	Heat shock protein
ICAM:	Intercellular adhesion molecule
IFN:	Interféron
Ig:	Immunoglobuline
I $\kappa$ B:	Inhibiteur de NF- $\kappa$ B:
IL:	Interleukine
iNOS:	Inducible nitric oxide synthase
JAK:	Janus kinase
LFA-1:	Leukocyte functional antigen-1; $\alpha_L\beta_2$
M:	Mitose
Mac-1:	Intégrine $\alpha_M\beta_2$ ; CD11b/CD18
Mac-1:	Membrane attack complex-1
MAP kinase:	Mitogen-activated protein kinase
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein-1
MEC:	Matrice extracellulaire
MEK:	MAP kinase/ERK-activating kinase
MIDAS:	Metal ion dependent adhesion site
mmHG:	Millimètre de mercure
MMP:	Métalloprotéinase
MyoFb:	Myofibroblaste
NE:	Norépinéphrine
NF- $\kappa$ B:	Nuclear factor kappa B
NFS:	Noyau du faisceau solitaire
NO:	Nitric oxide

PAI-1:	Plasminogen activator inhibitor-1
PBMC:	Peripreral blood mononuclear cell
PBS:	Phosphate buffer saline
PCR:	Polymerase chain reaction
PDGF:	Platelet-derived growth factor
PECAM:	Platelet-endothelial cell adhesion molecule
PG:	Prostaglandine
PIP:	Propeptide
PKC:	Protéine kinase C
PLC:	Phospholipase C
PMN:	Polymorphonucléaire
PMA:	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PSGL-1:	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTK:	Protéine tyrosine kinase
RAAS:	Renin-angiotensin-aldosterone system
RGD:	Arginine-Glycine-Aspartate
RLD:	Arginine-Leucine-Aspartate
ROS:	Reactive oxygen species
S:	Synthèse
SAP:	Saporin
SDS:	Sodium dodécyl sulfate
SFK:	Src-family protein tyrosine kinase
SM a-actin:	Smooth muscle alpha-actin
SMAD:	Mothers against decepentaplegic
STAT:	Transducer and activator of transcription
TGF- $\beta$ :	Transforming growth factor bêta
TIMP:	Tissue inhibitors of metalloproteinase
TnC:	Troponine C
TNF-a:	Tumor necrosis factor alpha
TnI	Troponine I

TnT:	Troponine T
VCAM:	Vascular cell adhesion molecule
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
VLA-4:	Very late antigen-4; $\alpha_4\beta_1$
VSMC:	Vascular smooth muscle cells

À mes parents, sans qui  
rien de tout cela n'aurait  
été possible, sans leurs  
encouragements et leur  
soutien; merci pour tout,  
je vous aime.

À mon conjoint, pour avoir  
été à mes côtés durant mes études  
universitaires; je t'aime.

# **1. INTRODUCTION: Le Système Cardiovasculaire**

Depuis les trois ou quatre dernières décennies, l'augmentation de l'espérance de vie dans les pays industrialisés, de même que le vieillissement de la population et des changements majeurs dans le style de vie général ont mené à un accroissement drastique du nombre de certains maux auxquels la recherche médicale doit maintenant s'attaquer sans plus tarder. Par exemple, les cas de maladies cardiorespiratoires, de cancers divers, de diabète et de dégénérescence du système nerveux comme l'Alzheimer se sont multipliés jusqu'à faire des maladies cardiorespiratoires et du cancer la cause de 62% des décès en 2003 (données de Statistique Canada<sup>1</sup>). Les maladies cardiorespiratoires sont dites à traits complexes, c'est-à-dire qu'elles sont causées par une multitude de facteurs de risque autant génétiques qu'environnementaux comme le tabagisme et l'alimentation. Parmi ces facteurs, l'hypertension artérielle, elle-même un trait complexe, est un élément déterminant dans l'apparition de déficiences de la fonction cardiaque.

## **1.1. Organes et tissus formant le système cardiovasculaire**

Le système cardiovasculaire, bien qu'extrêmement complexe, peut se diviser en trois composantes essentielles, soit le cœur, les vaisseaux sanguins et le sang lui-même. Ce dernier est composé essentiellement de 55% de plasma sanguin, un liquide aqueux contenant diverses substances en solution, et de 45% d'éléments dits « figurés », c'est-à-dire plusieurs types de cellules et de fragments cellulaires.<sup>2</sup> Parmi les éléments figurés, notons simplement les érythrocytes, des cellules anucléées dont le noyau hème transporte l'oxygène des poumons jusqu'aux diverses parties de l'organisme, les leucocytes, un ensemble de cellules jouant un rôle important dans les mécanismes de défense immunitaire (voir la section 1.4), et enfin les plaquettes, des fragments cytoplasmiques servant principalement à la coagulation sanguine dans les cas de rupture d'un vaisseau sanguin. Outre les éléments figurés, le plasma sanguin



transporte aussi une grande quantité de protéines différentes, de nutriments, d'hormones, d'électrolytes, de gaz et de déchets métaboliques. Il constitue par conséquent un facteur majeur de l'homéostasie corporelle et il est important pour la répartition de la chaleur dans tout l'organisme.

Le sang voyage à travers un réseau complexe de vaisseaux de toutes tailles et caractéristiques grâce à la puissante pompe que constitue le cœur. Après avoir traversé et quitté ce dernier, le sang circule en effet à l'intérieur d'une succession d'artères de plus en plus petites, allant des artères élastiques (ou vaisseaux conducteurs) aux capillaires, en passant par les artères musculaires (ou vaisseaux distributeurs), les artérioles (ou vaisseaux de résistance) et les artérioles terminales. Les capillaires, où se produisent les échanges de nutriments et de gaz, sont suivis de veinules postcapillaires et des petites et grosses veines, dont le diamètre va en augmentant vers le cœur. Il est à noter que les artères, en particulier les vaisseaux distributeurs, ont un rôle prépondérant dans la régulation de la pression sanguine, celle-ci affectant les échanges se produisant dans les capillaires et les glomérules rénaux. Le réseau veineux, pour sa part, présente de larges conduits dans lesquels la faible pression ne permettrait pas seule le retour aisé du sang vers le cœur. Plusieurs mécanismes entrent donc en action. En effet, la compression des veines abdominales qui se produit lors de la respiration, la contraction des muscles squelettiques des membres et l'action des valvules empêchant les reflux de sang en sens inverse permettent de ramener le sang vers la pompe cardiaque, d'où le cycle reprendra.<sup>3</sup>

## **1.2. Fonction cardiaque**

### **1.2.1. Fonction et anatomie structurelle du cœur**

Le cœur est un muscle particulier dont la fonction principale est de faire circuler le sang à l'intérieur de tout le réseau d'artères et de veines du corps. Il est composé de quatre chambres distinctes appariées selon leur disposition dans le cœur, le côté droit étant séparé du côté gauche par une paroi épaisse appelée

septum.<sup>4</sup> La portion de droite est composée de l'oreillette et du ventricule droits. En quittant les veines caves supérieure et inférieure drainant l'ensemble du cœur, le sang pénètre en premier lieu dans l'oreillette avant de se diriger vers le ventricule. Cette portion du cœur fait partie de la petite circulation, ou circulation pulmonaire, étant responsable du pompage du sang vers les poumons afin d'en assurer la réoxygénation et l'expulsion du gaz carbonique accumulé. La portion de gauche, constituée elle aussi d'une oreillette et d'un ventricule, récolte le sang nouvellement oxygéné provenant des poumons par les veines pulmonaires afin de le pomper dans l'aorte vers l'ensemble du réseau sanguin, de façon à fournir l'oxygène nécessaire aux cellules du corps. Il est à noter que le ventricule gauche dessert l'organisme en entier, par un réseau où la résistance opposée à l'écoulement du sang est cinq fois plus importante que dans la petite circulation.<sup>4</sup> Le ventricule gauche se doit donc d'être une pompe beaucoup plus efficace que le ventricule droit, ce qui est rendu possible par des parois jusqu'à trois fois plus épaisses et à une cavité quasi-circulaire, contrairement au ventricule droit pratiquement enroulé autour de son pendant gauche. Des valves à flux unidirectionnel séparent les oreillettes des ventricules, disposées de telle sorte qu'elles empêchent le sang de refluer vers les oreillettes, suite à son entrée dans les ventricules, lors de son éjection dans les circulations pulmonaire et systémique. Conséquemment, la circulation du sang dans le cœur se fait en deux grandes étapes, soit la diastole, pendant laquelle le cœur se relaxe afin d'y faire pénétrer le sang, et la systole, pendant laquelle le sang est éjecté par la contraction du cœur.

Les parois du cœur sont composées de plusieurs couches de tissus différents.<sup>4</sup> Tout à l'extérieur, le péricarde est constitué de tissu conjonctif disposé en deux lames formant une mince cavité. Celle-ci renferme un lubrifiant séreux diminuant les frictions dues aux battements cardiaques. La lame interne, ou lame viscérale du péricarde séreux, est aussi appelée épicarde. Elle repose directement sur le myocarde, le constituant musculaire du cœur. Enfin, l'intérieur des oreillettes et ventricules est tapissé par l'endocarde, un

endothélium lisse améliorant l'écoulement du sang à l'intérieur du cœur. Le sang ne pouvant manifestement pas fournir les nutriments essentiels à l'ensemble des cellules de cette épaisse paroi, le cœur s'est doté d'une circulation particulière. La circulation coronarienne est constituée des artères coronaires droite et gauche, qui prennent naissance à la base de l'aorte et se ramifient en multiples rameaux afin de nourrir autant l'intérieur des parois que leur surface. Le sang retourne ensuite dans l'oreillette droite via les veines du cœur se rejoignant pour former le sinus coronaire.

Une seconde fonction, non-négligeable, est aussi accomplie par le cœur à un niveau endocrinologique. Le facteur auriculaire natriurétique (ANP, pour *atrial natriuretic peptide*), est en effet sécrété par les oreillettes, d'où son nom, sous l'effet de l'augmentation de la tension auriculaire causée par un accroissement de la pression veineuse centrale.<sup>5</sup> L'ANP sécrété inhibe la réabsorption de sodium et donc d'eau par les tubules distaux des reins, dans le but de diminuer le volume sanguin par une hausse de l'excrétion urinaire.

#### 1.2.2. Composition cellulaire et moléculaire du cœur

Les diverses couches du cœur sont constituées d'autant de cellules différentes. Par exemple, on retrouve des cellules vasculaires de muscles lisses<sup>6</sup> (VSMC pour *vascular smooth muscle cells*) et des cellules vasculaires endothéliales contenues dans les vaisseaux sanguins de la circulation coronarienne<sup>7</sup>, des cellules épithéliales et mésenchymateuses dans l'épicarde<sup>8</sup> et des cellules endothéliales dans l'endothélium<sup>9</sup>. Cependant, ce sont les cardiomyocytes du myocarde qui constituent près de 90% de la masse du cœur pour environ 30% du nombre de cellules<sup>10</sup>, alors que les fibroblastes, des cellules de soutien, constituent près de 70% du nombre des cellules cardiaques.<sup>11</sup>

### 1.2.2.1. Cardiomyocytes

#### ➤ Caractéristiques

Les cardiomyocytes sont de grosses cellules binucléées<sup>12</sup> formant les fibres musculaires cardiaques. Les cardiomyocytes sont rattachés les uns aux autres via des disques intercalaires composés de desmosomes et de jonctions ouvertes. Ces dernières permettent le passage des ions entre les cellules de façon à transmettre pratiquement instantanément le potentiel d'action à tous les myocytes d'une région. Cette étroite communication intercellulaire rend possible la synchronisation de leur contraction. Les fibres cardiaques, regroupées en sarcomères, présentent une apparence striée en raison de leur contenu élevé en filaments de myosine et d'actine. Ces filaments, placés parallèlement pour la majorité, sont responsables de la contraction cardiaque. Lors de celle-ci, en effet, les têtes des filaments de myosine s'attachent aux filaments d'actine en déplaçant les filaments les uns par rapport aux autres de telle sorte que la longueur de la cellule diminue (contraction) ou augmente (relaxation). Cette opération nécessite une très grande quantité d'ATP, produite en partie par les mitochondries. Il ne faut donc pas s'étonner de constater qu'environ 25% du volume des fibres musculaire est occupé par ces productrices d'énergie.<sup>4</sup> Enfin, le réticulum sarcoplasmique stock le calcium nécessaire aux contractions cardiaques.

#### ➤ Contraction

La régulation de la contraction cardiaque étant excessivement importante pour l'ensemble de l'organisme, son déroulement complexe implique plusieurs structures et protéines spécifiques. Chacun de ces éléments peut jouer un rôle dans une déficience cardiaque donnée. Le signal initial de contraction est le changement de potentiel au niveau de la membrane plasmique, ce qui provoque l'ouverture de canaux rapides à sodium voltage-dépendants. Cette ouverture amène un changement plus important du potentiel membranaire qui déclenche l'ouverture de canaux calciques permettant l'entrée

rapide de calcium à partir du réticulum sarcoplasmique (principalement) et du milieu extracellulaire. Il est à noter que l'entrée de calcium provenant de l'espace interstitiel participe à la stimulation du relâchement de calcium par le réticulum sarcoplasmique.<sup>13</sup> Par la suite, le calcium libéré va se lier à la troponine C (TnC), qui forme un complexe avec les sous-unités TnT et TnI, liant respectivement la tropomyosine (assemblée en filaments accolés aux filaments d'actine) et l'actine. L'arrivée du calcium permet de déplacer la troponine en entraînant les filaments de tropomyosine. Ce déplacement libère enfin le site de liaison à la myosine des filaments d'actine, ce qui conduit à l'adhésion des filaments de myosine à ceux d'actine. La contraction qui suit est due à des changements conformationnels des têtes de myosines effectués à l'aide d'ATP.

Contrairement aux muscles squelettiques, le muscle cardiaque contrôle lui-même la fréquence de ses contractions à l'aide de cardiomyocytes spécialisés appelés cellules cardionectrices.<sup>12</sup> À leur potentiel de repos, ces cellules possèdent la capacité de se dépolariser lentement de façon spontanée grâce au relâchement et à la capture du calcium dans le cytoplasme à l'aide de pompe et de canaux calciques. Elles élèvent le potentiel membranaire jusqu'à l'atteinte du seuil d'excitation des cellules voisines, d'où part alors le potentiel d'action responsable de la contraction cardio-musculaire.<sup>4</sup> Bien que le nœud auriculo-ventriculaire et les cellules His-Purkinge possèdent tous deux cette capacité d'auto-dépolarisation, c'est le nœud sinusal, situé dans l'oreillette droite, qui en est le régulateur dominant en raison de la plus courte période de son cycle.<sup>14</sup> Bien que l'on considère généralement que le cœur se contracte d'un seul bloc, la réalité est quelque peu différente. L'onde de contraction se déploie plutôt dans les oreillettes en premier afin de pousser le sang vers les ventricules. Elle se déplace ensuite vers l'apex du cœur, c'est-à-dire vers le bas des ventricules, avant de retourner vers le haut afin de pousser le sang vers les poumons ou l'aorte.

### 1.2.2.2. Fibroblastes cardiaques

#### ➤ Fibroblastes VS Myofibroblastes

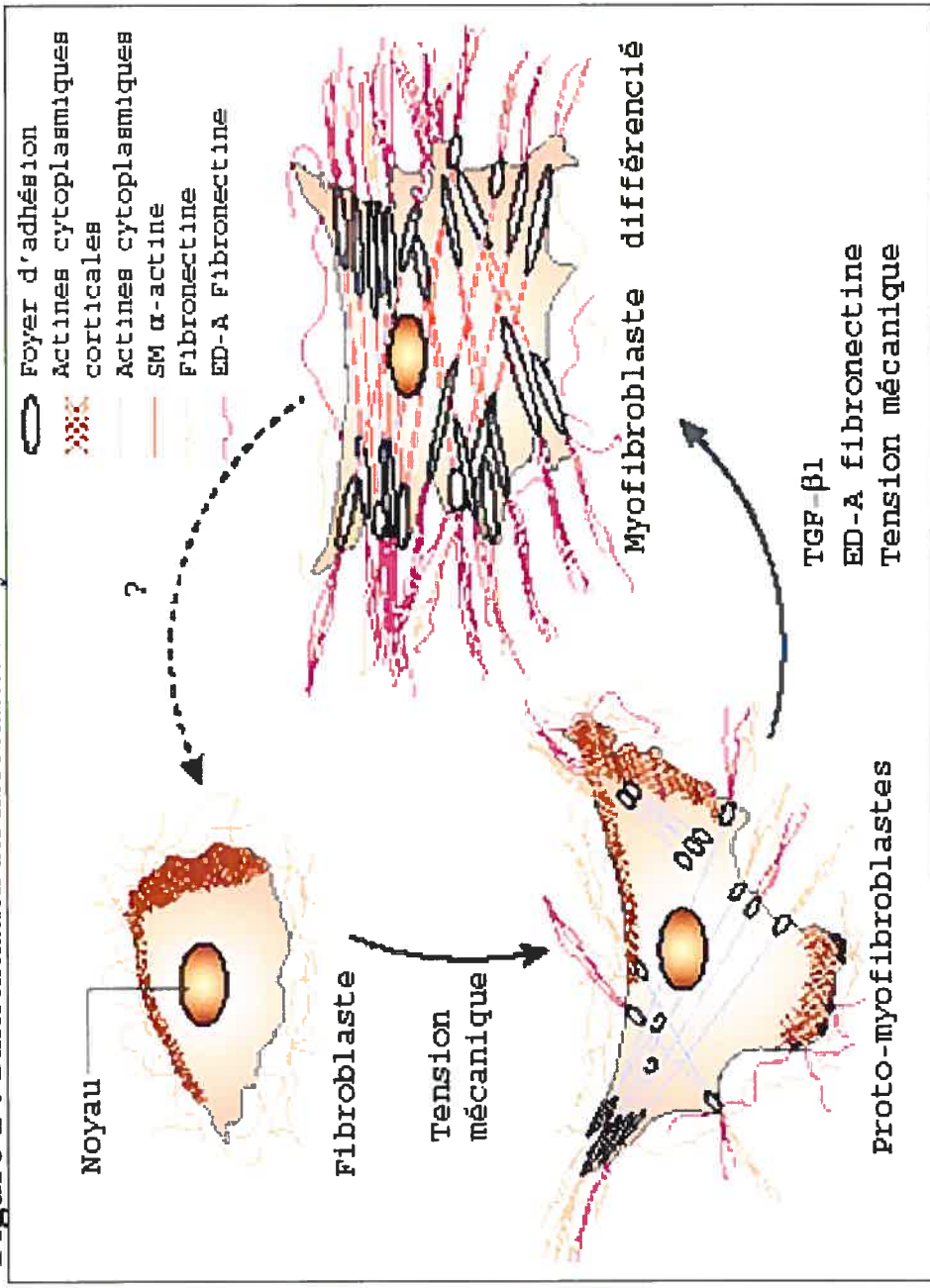
Contrairement aux cardiomyocytes, les fibroblastes ne sont pas des cellules contractiles (voir revue, Baudino et al. 2006). Beaucoup plus petits que les cardiomyocytes, ils se glissent dans les espaces interstitiels en feuilles ou fibres disposées parallèlement aux fibres musculaires, de même qu'entre les couches de cellules du myocarde.<sup>10</sup> Dans le nœud sinusal, du moins, des jonctions ouvertes entre deux fibroblastes ou entre un cardiomyocytes et un fibroblaste permettent la conduction électrique du potentiel d'action. Il est à supposer qu'un tel couplage électrique doive se produire ailleurs dans le cœur, afin de permettre à des cellules situées au-delà de régions d'infarctus d'être aussi stimulées.<sup>10,15,16</sup> Les connexines et les cadhérines semblent être très impliquées dans ces connections intercellulaires.<sup>11</sup> La fonction principale des fibroblastes cardiaques, comme ailleurs dans l'organisme, est de maintenir l'intégrité de la structure cardiaque par la régulation de la matrice extracellulaire (MEC). En effet, leur rôle principal est de synthétiser des protéines de la MEC ainsi que d'autres protéines agissant sur les précédentes.<sup>17</sup> Par exemple, ils sécrètent des métalloprotéinases (MMPs pour *matrix metalloproteinases*), des facteurs de croissance et des cytokines. Les MMPs sont des enzymes capables de dégrader des protéines de la MEC afin de faciliter le remodelage cardiaque, un phénomène d'adaptation normal pouvant cependant aussi mener à des conséquences pathologiques comme l'infiltration de cellules inflammatoires.<sup>11</sup> On y retrouve entre autres des collagénases, des élastases et des gélatinases,<sup>18</sup> qui, comme leurs noms l'indiquent, sont capables de digérer différentes composantes de la MEC. Cette digestion est essentielle au remodelage structurel qui se produit lors de l'hypertrophie cardiaque. L'élargissement des cardiomyocytes nécessite en effet la création d'un espace au détriment de la MEC. Parmi les facteurs de croissance relâchés par les fibroblastes cardiaques, le TGF- $\beta$  (pour *transforming growth factor*) et le bFGF (ou FGF-2 pour *basic fibroblast growth factor*) sont deux des facteurs de

croissance agissant de façon paracrine et autocrine dont l'expression par les fibroblastes est activée par l'angiotensine II.<sup>17</sup>

Les fibroblastes, à l'inverse des cardiomyocytes, ne sont pas des cellules terminalement différenciées. Ils peuvent donc modifier leur phénotype normalement sous l'influence des stimuli appropriés.<sup>11</sup> En effet, un surcroît de tension mécanique du myocarde provoque leur différenciation en proto-myofibroblastes, puis en myofibroblastes (voir la revue de Tomasek et al. 2002).<sup>19</sup> Le phénotype des fibroblastes en culture ressemble d'ailleurs à celui des proto-myofibroblastes, ce qui pointerait la mise en culture comme un stress suffisant à provoquer la première différenciation. Comme l'illustre la figure 1, les proto-myofibroblastes produisent alors des filaments d'actine appelés « fibres de stress ». Ils produisent aussi des fibrilles de fibronectine, assemblées avec l'isoforme fœtal de la fibronectine, et des foyers d'adhésion, qui consistent en des structures membranaires permettant l'adhésion du cytosquelette d'actine à la MEC à l'aide de protéines d'adhésion comme les intégrines. Les foyers d'adhésion participent aussi à la signalisation intracellulaire via de multiples protéines comme les intégrines, la kinase FAK (pour *focal adhesion kinase*) et la famille des GTPases Rho (GTPase pour guanosine 5'-triphosphatase).<sup>11</sup>

La différenciation suivante, qui transforme les proto-myofibroblastes en myofibroblastes, nécessite la stimulation des premiers au TGF- $\beta$ , dont l'action peut être paracrine ou autocrine.<sup>19</sup> Un autre stimulus de cette différenciation se ferait par une famille d'inhibiteurs des MMPs, les TIMPs (pour *tissue inhibitors of metalloproteinases*), qui participent de façon importante au remodelage de la MEC en diminuant sa dégradation par les MMPs et en stimulant les myofibroblastes à synthétiser du collagène.<sup>20</sup> Les myofibroblastes résultants possèdent alors un fort phénotype contractile en raison de la présence accrue des fibres de stress, des fibrilles de fibronectine et des foyers d'adhésion. En plus des actines cytoplasmiques de formes  $\beta$  et  $\gamma$  déjà exprimées par les fibroblastes, les myofibroblastes expriment une nouvelle protéine contractile, soit l' $\alpha$ -actine retrouvée habituellement dans les muscles lisses (ou SM  $\alpha$ -actine

**Figure 1 : Différenciation des fibroblastes en myofibroblastes suite à divers stimuli**



Tirée de Tomasek et al. 2002<sup>19</sup>



pour *smooth muscle  $\alpha$ -actin*). Ce phénotype spécifique aux myofibroblastes leur permet de participer activement à la cicatrisation d'une blessure en rendant possible leur migration vers la plaie.<sup>19</sup> Il est important de souligner que, contrairement à une cicatrisation normale après laquelle les myofibroblastes meurent par apoptose, leur résistance à la mort cellulaire programmée (grâce, entre autres, à la présence de TGF- $\beta$ ) et leur activité persistante mènent à la fibrose cardiaque (voir section 1.2.3.3).<sup>21</sup> Mentionnons que la capacité de division des fibroblastes cardiaques serait semble-t-il relativement faible et que la plupart des nouveaux fibroblastes proviendraient de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse, de péricytes, et de cellules adventitielles associées à la vasculature.<sup>11</sup> De plus, les myofibroblastes impliqués dans la guérison d'une lésion sembleraient aussi provenir, en plus des fibroblastes activés recrutés aux environs de la lésion, de fibroblastes circulant dans les vaisseaux sanguins et appelés fibrocytes, selon des processus imparfaitement connus.<sup>21-23</sup>

Plusieurs études semblent démontrer que les fibroblastes auraient un rôle de sentinelle important puisqu'ils peuvent détecter et transmettre des changements mécaniques, électriques et biochimiques de l'environnement afin de permettre au cœur une meilleure adaptation.<sup>11</sup> En effet, leur imbrication dans la MEC les rend très sensibles aux forces mécaniques supportées par le myocarde et leur réseau d'interconnexions avec les cardiomyocytes ou entre fibroblastes leur permet des communications intercellulaires rapides et efficaces. Celles-ci sont d'autant plus complexes étant donné la capacité des fibroblastes à sécréter des cytokines pro-inflammatoires et autres diverses molécules comme les facteurs de croissance pouvant agir de façon autocrine ou paracrine à l'intérieur du myocarde.

#### ➤ Matrice extra-cellulaire

La MEC est un tissu conjonctif permettant le maintien de la structure du myocarde, la distribution des forces mécaniques à travers le myocarde et la

transmission de signaux mécaniques entre les cellules.<sup>11,24</sup> Elle est constituée de quatre composantes générales : des protéines structurales, des protéines adhérentes, des protéines anti-adhérentes et des protéoglycans.<sup>25</sup> Les premières sont représentées par un réseau de fibres extrêmement résistantes de collagène des types I et III, ainsi que par des fibres d'élastine donnant une certaine élasticité au tissu. À ces fibres s'ajoutent des protéines d'adhésion comme la fibronectine, la laminine et du collagène de plusieurs autres types (IV, V et VI dans une moindre proportion). Les protéines anti-adhérentes comme l'ostéopontine, la thrombospondine et la ténascine semblent très importantes dans les phénomènes de cicatrisation des plaies.<sup>26</sup> Enfin, une dernière catégorie de protéines s'insèrent aussi dans la MEC, soit les protéoglycans, c'est-à-dire des glycoprotéines contenant une longue chaîne de groupes disaccharides répétés nommés glycosaminoglycans. Ces glycoprotéines particulières interagissent avec de multiples facteurs de croissance comme le TGF- $\beta$  ou le FGF qui sont impliqués dans la promotion de l'inflammation<sup>11</sup>, de même qu'avec des molécules d'eau nécessaires à la diffusion des nutriments entre les vaisseaux sanguins et les cellules. L'ensemble de la MEC et de ses cellules forme un enchevêtrement complexe à l'intérieur duquel les interactions protéiques sont multiples. Par exemple, l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  lie la fibronectine et le fibrinogène, de même que les formes protéolysées de collagène et de laminine.<sup>27</sup> Ces multiples liaisons entre la MEC et les fibroblastes, en plus des différentes composantes de la MEC, permettent la formation d'un support très résistant tout en étant flexible, deux caractéristiques nécessaires au cycle de contraction/relaxation du muscle cardiaque. Le réseau fibreux de collagène permet par ailleurs de traduire la contraction des cardiomyocytes en contraction des parois cardiaques.<sup>17</sup> De plus, les proportions de ces divers constituants et la densité de la MEC influencent la compliance cardiaque, c'est-à-dire la capacité des cavités cardiaques à se distendre sous l'effet de changements de volume et de pression, de manière à en modifier les paramètres hémodynamiques.<sup>11,28</sup>

### 1.2.3. Pathologies cardiaques

#### 1.2.3.1. Description du phénomène et des conséquences

La déficience cardiaque est plus un syndrome qu'une maladie, en ce sens qu'elle peut découler d'une multitude de pathologies différentes. Arnold M. Katz la définit comme :

*« a clinical syndrome in which heart disease reduces cardiac output, increase venous pressure, and is accompanied by molecular abnormalities that cause progressive deterioration of the failing heart and premature myocardial cell death.<sup>1</sup> » (Katz, 2000, p3<sup>29</sup>).*

Le myocarde lui-même peut être endommagé par un infarctus, un virus ou par l'absorption d'une trop grande quantité d'alcool ou de certains médicaments.<sup>29</sup> Parallèlement, l'apport du cœur en sang peut être insuffisant, sa stimulation électrique inadéquate ou sa capacité de contraction/relaxation altérée. Un défaut de relaxation du cœur (lusitropie) mène à l'évident anormal des veines pulmonaires et peut être attribué entre autres à la sténose de la valve mitrale, c'est-à-dire au rétrécissement de la valve séparant l'oreillette et le ventricule gauche, ou encore à une hypertrophie concentrique. De l'autre côté, un défaut de contraction du cœur (inotropie) mène à l'évident inhabituel du cœur lui-même et peut être dû à la sténose de l'aorte ou à la scarification du ventricule gauche suite à un infarctus. Le ventricule droit peut aussi être affecté de façon semblable, bien que ce soit plus rare. Si l'inotropie peut être modifiée par l'impédance aortique, qui détermine l'augmentation de la pression artérielle dans l'aorte pour l'ajout d'un volume donné de sang, la lusitropie peut être perturbée par des anomalies structurelles (ex : dans les valves) ou physiologiques (ex : changement du volume sanguin), ou encore par celles des myocytes (ex : dans les flux de calcium) ou des composantes non-myocytaires comme les tissus conjonctifs. Évidemment, si le cœur est incapable

---

<sup>1</sup> « ... un syndrome clinique dans lequel la maladie du cœur réduit l'éjection du sang, augmente la pression veineuse et est accompagnée d'anomalies moléculaires causant la détérioration du cœur défaillant ainsi que la mort prématurée des cardiomyocytes. »

de faire entrer un volume adéquat de sang, il est par le fait même incapable d'en éjecter suffisamment. Les deux problèmes sont donc inéluctablement liés.

Les effets cliniques et physiologiques résultant de ces anomalies sont multiples. Les capacités de pompe du cœur étant affectées, il peut résulter une accumulation du sang dans les veines, ce qui se traduit par une augmentation de la pression et l'accumulation de fluides dans les membres inférieurs (œdème). L'accumulation du sang dans le circuit pulmonaire se traduit aussi par un œdème (pulmonaire), de même que par une respiration difficile.<sup>29</sup> Or, d'autres effets secondaires s'additionnent jusqu'à démarrer un cycle vicieux aggravant l'insuffisance cardiaque. En effet, lors d'une accumulation de sang à l'entrée du cœur, la diminution de l'éjection de sang dans les artères entraîne une diminution de la pression artérielle déclenchant un processus de rétention de sel et d'eau par les reins dans le but de réajuster la tension. Or, cette augmentation du volume sanguin accentue l'insuffisance cardiaque en augmentant la pression dans les veines à l'entrée du cœur. Ce cercle vicieux se manifeste aussi lors de la mise en place de mécanismes de compensation par l'organisme. Ces processus, bénéfiques à l'origine, développent généralement des effets nocifs à long terme, lorsque le problème initial n'est pas réglé. On parle alors de compensations pathologiques. L'hypertrophie cardiaque et l'inflammation sont deux de ces mécanismes de défenses qui, s'ils persistent, peuvent apporter d'autres problèmes ou aggraver ceux déjà existants.

#### 1.2.3.2. Hypertrophie cardiaque : types, causes et conséquences

Comme toute hypertrophie musculaire, l'hypertrophie cardiaque peut se présenter sous deux formes principales : physiologique et pathologique.<sup>30</sup> La première, entièrement bénéfique, se produit par exemple chez les athlètes, dont la discipline physique exige un pompage efficace du sang et une oxygénation maximale. Dans ce cas particulier, l'homogénéité du tissu est préservée en raison de la croissance proportionnée des divers constituants cardiaques.<sup>16</sup> La seconde (HCP), plus préoccupante, se produit lors d'une déficience du système

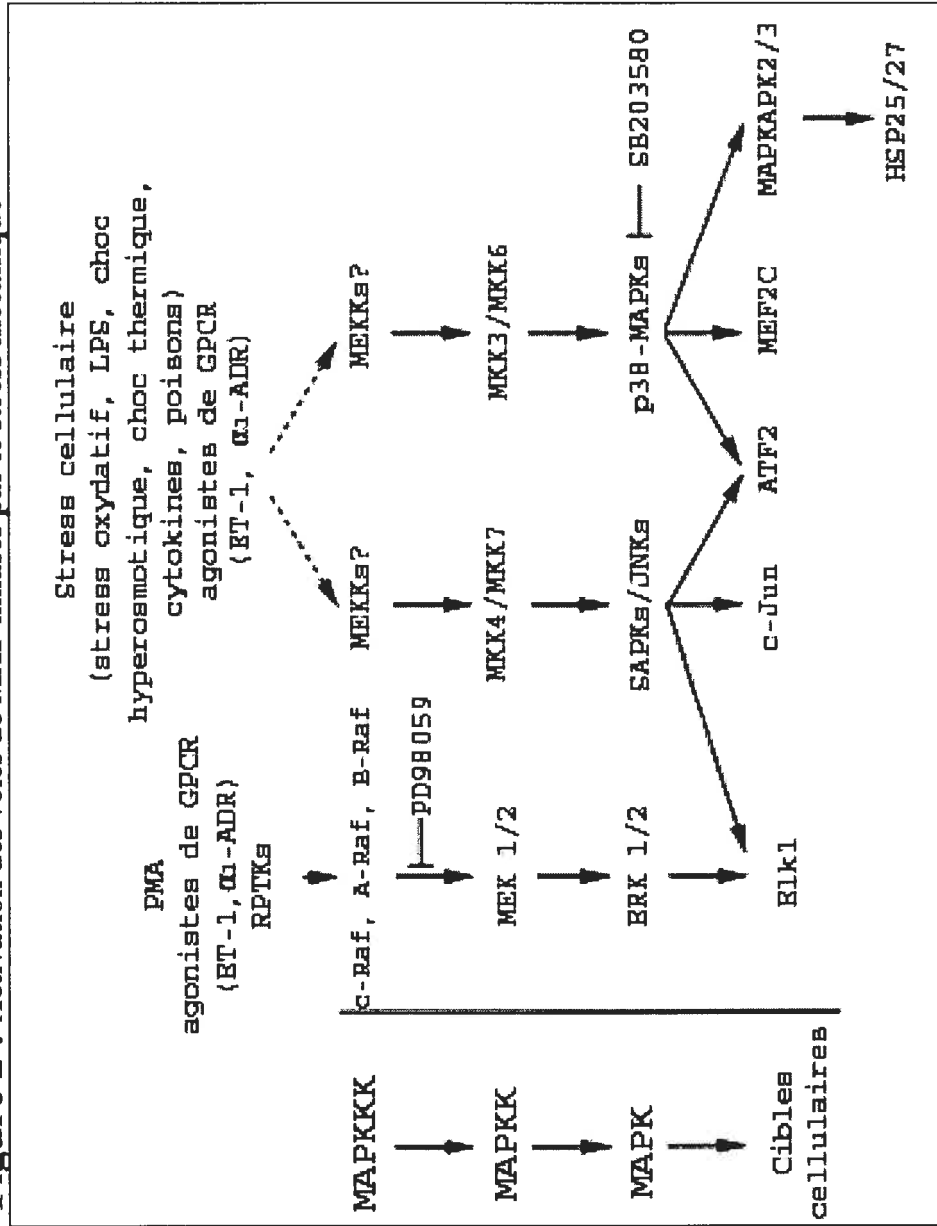
cardiovasculaire et résulte généralement en effets malsains à long terme. Elle peut être provoquée par de l'hypertension, des désordres endocriniens, un infarctus du myocarde ou par une contractilité anormale en raison de mutations des protéines contractiles ou sarcomériques.<sup>30</sup> Contrairement à l'hyperplasie, lors de laquelle il y a une augmentation du nombre de cellules d'un tissu, l'hypertrophie résulte plutôt de l'augmentation de la taille des cellules impliquées. Le cas du cœur est très particulier en raison d'une caractéristique spécifique des cardiomyocytes. Lors de leur développement, ces derniers atteignent en effet un stade de différenciation terminale à partir duquel il leur est impossible de revenir en arrière.<sup>31</sup> Leur cycle cellulaire est alors suspendu de manière définitive, les empêchant par conséquent d'entrer en mitose et de se diviser en deux cellules-filles.<sup>12,30</sup> Alors que le cycle d'une cellule comprend habituellement une période de synthèse accrue de protéines et d'ADN (S) séparée de la phase de division proprement dite (M) par deux phases de repos ( $G_1$  entre M et S,  $G_2$  entre S et M), les cardiomyocytes terminalement différenciés demeurent arrêtés en phase  $G_1$  ou, selon certains auteurs, en  $G_0$ .<sup>29</sup> Lorsque le travail cardiaque doit augmenter afin de compenser pour une certaine déficience, les cardiomyocytes n'ont d'autres choix que de grossir eux-même au lieu de se diviser. De récentes études, démontreraient cependant une certaine capacité de régénération des cardiomyocytes (voir revue de Nadal-Ginard et al. 2003).<sup>32</sup> Certaines cellules cardiaques, appelées alors pseudo-souches (*stem-like cells*), conserveraient en effet cette capacité, hypothèse supportée entre autres par l'augmentation du nombre de myocytes dans le cœur au cours du temps ou lors d'un infarctus.<sup>32,33</sup> Ces données étant toutefois controversées, il faudra encore attendre quelques années avant de confirmer le tout. Néanmoins, la participation de l'augmentation de la taille des cardiomyocytes dans la HCP est unanimement reconnue.

Cliniquement parlant, on retrouve deux types de HCP causée par deux stimuli physiologiques principaux. L'hypertrophie excentrique est souvent générée lors d'une augmentation du volume sanguin cardiaque, sans élévation

de pression, et peut s'expliquer entre autres par des problèmes valvulaires.<sup>34</sup> Il y a dans ce cas un élargissement de la cavité ventriculaire et du ventricule lui-même, alors que l'épaisseur des parois diminue. De plus, c'est sur la longueur que les cardiomyocytes grossissent et les nouveaux sarcomères se disposent en série. Au contraire, l'hypertrophie concentrique se produit généralement lors d'une augmentation de la pression cardiaque et elle se traduit par un élargissement des parois du ventricule gauche (la plupart du temps), bien que la chambre du cœur ne grossisse pas.<sup>34</sup> Cet élargissement des parois est dû à un accroissement sur le sens de la largeur des cardiomyocytes, à l'intérieur desquels les sarcomères s'ajoutent parallèlement les uns aux autres. Les patients souffrant de cette seconde forme d'hypertrophie sont plus à même de développer d'autres événements cardiovasculaires.<sup>35</sup>

Les mécanismes cellulaires menant à la HCP sont multiples, de même que les stimuli. Par exemple, un stress mécanique comme l'étirement ou la déformation des parois ventriculaires provoque l'activation de la voie de signalisation des protéines MAP kinase<sup>36</sup> (voir figure 2). D'un autre côté, l'hypoxie induirait l'hypertrophie des cardiomyocytes via l'action de l'endothéline-1 (ET-1).<sup>37</sup> Dans tous les cas, un des effets des stimuli prohypertrophiques est de stimuler l'expression de gènes fœtaux<sup>29,34</sup>, c'est-à-dire de gènes codant pour des isoformes de protéines normalement présents lors du stade de développement fœtal. Par exemple, l'ANP et le BNP (pour *brain natriuretic peptide*) sont à nouveau exprimés par les myocytes ventriculaires alors que seuls les myocytes ventriculaires néonataux les produisent en conditions normales.<sup>38</sup> Plusieurs protéines contractiles, comme l' $\alpha$ -actine du muscle cardiaque et la chaîne légère 2 de la myosine ventriculaire, voient aussi leur expression augmentée.<sup>34</sup> Parmi plusieurs facteurs de croissance, le TGF- $\beta$  est l'un des importants joueurs dans cette modification du patron d'expression protéique, grâce à la cascade de signalisation des SMADs.<sup>29</sup> En outre, il inhibe la prolifération et induit la fibrose, dont il sera question à la prochaine section.

**Figure 2 : Activation des voies de MAP kinases par le stress mécanique**



Tirée et adaptée de Sugden et al. 1998<sup>34</sup>

Ce changement dans l'expression protéique perturbe malheureusement les cardiomyocytes à tel point qu'il provoque leur mort prématurée par un processus apoptotique.<sup>29</sup> L'apoptose, contrairement à la nécrose, est un mécanisme de mort cellulaire programmée dans laquelle il n'y a pas d'inflammation et qui se produit sur des cellules individuelles et non pas sur de large zone de tissus. Cela faisant, un nouveau cercle vicieux se développe puisque la mort de cardiomyocytes aggrave la déficience cardiaque, qui augmente l'hypertrophie, qui augmente la mort cellulaire. De plus, l'épaississement des parois ventriculaires diminue l'approvisionnement des cardiomyocytes en oxygène en raison de l'augmentation de la tension des vaisseaux coronariens, dans lesquels le sang passent alors moins bien, ainsi qu'en raison de l'accroissement de la distance à travers laquelle doit diffuser les molécules d'oxygène jusqu'aux cellules.<sup>29</sup>

#### 1.2.3.3. Fibrose cardiaque

##### ➤ Description générale et effets

Lors d'une défaillance cardiaque, plusieurs phénomènes compensatoires se produisent afin de palier les déficiences du cœur atteint et ainsi permettre à l'organisme de poursuivre ses activités quotidiennes. Au niveau systémique, par exemple, des hormones et autres composantes comme l'oxyde nitrique sont sécrétées afin d'ajuster le volume et la pression sanguine. De son côté, le cœur peut modifier sa pulsation, de même qu'il peut subir un processus de remodelage structurel affectant autant sa forme que sa taille et sa fonction.<sup>17</sup> L'hypertrophie concentrique ou excentrique est un exemple frappant de remodelage cardiaque impliquant une hypertrophie des cardiomyocytes, une sur-prolifération des fibroblastes ainsi que leur activation en myofibroblastes, de même qu'une mort cellulaire accrue et de la fibrose.

La fibrose cardiaque peut être définie comme une accumulation anormale de la MEC dans l'espace interstitiel et les régions périvasculaires (principalement du collagène de type I).<sup>16</sup> Cette accumulation de fibrilles de



collagène épaissit les parois des ventricules et gêne par conséquent la contraction et la relaxation du cœur en modifiant son élasticité.<sup>17</sup> Elle peut aussi affecter le couplage électrique des cardiomyocytes en les séparant, ce qui peut provoquer de l'arythmie cardiaque, de même que réduire leur apport en oxygène en diminuant la densité capillaire et en augmentant la distance de diffusion de l'oxygène dans le myocarde.<sup>17,38</sup> De plus, elle peut diminuer la capacité vasodilatatrice des artères coronaires situées à l'intérieur du myocarde.<sup>39</sup> Tous ces effets peuvent à leur tour causer de nouveaux problèmes cardiaques comme l'infarctus du myocarde, d'où l'importance de contrer le développement de la fibrose cardiaque. Il est à noter que des tests sanguins pourraient d'ailleurs permettre aux médecins de suivre l'évolution de celle-ci chez des patients hypertendus, à l'aide d'un marqueur biochimique retrouvé dans le sang. En effet, la formation des fibrilles de collagène de type I entraîne le clivage de l'extrémité C-terminale des monomères de collagène, libérant un pro-peptide (PIP) détectable dans le sang.<sup>39</sup>

Bien que la fibrose soit généralement associée uniquement à l'accumulation de la matrice extracellulaire, on retrouve en réalité deux types de fibrose cardiaque qui se produisent dans des circonstances différentes, suite à des stimuli divers. L'infarctus du myocarde, celui-là même qui peut découler d'une fibrose précédente, se produit lorsqu'une région du cœur subit une ischémie prolongée et résulte en une nécrose plus ou moins étendue.<sup>16</sup> Les cardiomyocytes qui meurent alors, ne pouvant être renouvelés, sont donc remplacés par des myofibroblastes et de la MEC selon les processus de la fibrose réparatrice, en laissant une cicatrice de tissus peu contractiles.<sup>22</sup> Au contraire, la fibrose réactionnelle ne constitue pas un remplacement des cellules mais plutôt cette accumulation de protéines de la MEC impliquée dans le remodelage et l'hypertrophie cardiaque. Une telle accumulation résulte d'une production excessive des protéines de la MEC, comme le collagène I et la fibronectine, et/ou d'une diminution de leur dégradation par les métalloprotéinases.<sup>16,17</sup>

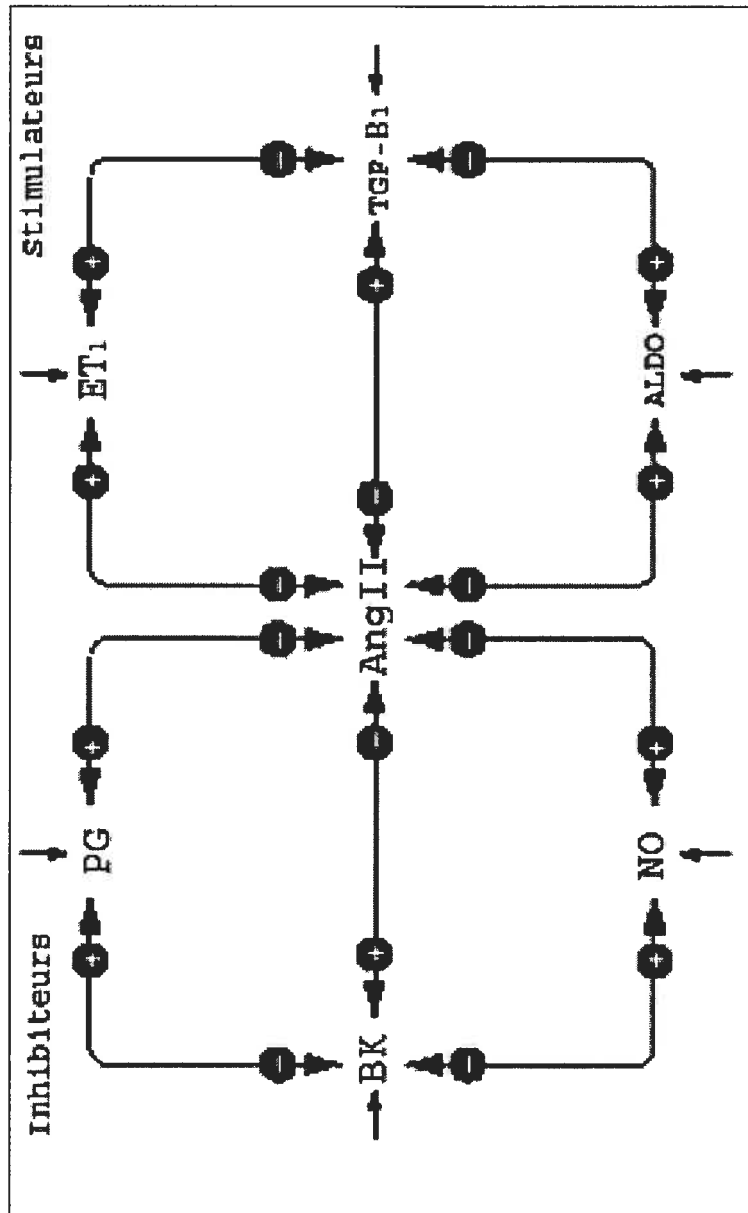
### ➤ Causes et voies de signalisation

Alors que l'hypertension est directement responsable de la réponse hypertrophique des cardiomyocytes, entre autres par l'augmentation du stress mécanique sur les récepteurs appropriés, l'activation des fibroblastes en myofibroblastes et le déclenchement de la fibrose nécessite en plus la participation de voies de signalisation cellulaire activées par diverses hormones et facteurs de croissance, via des mécanismes indépendants de la pression sanguine.<sup>16,40</sup> Parmi ces hormones, l'angiotensine II (AngII), dont il sera question à la section 1.3.1.1, semblerait capable d'engendrer une fibrose du myocarde indépendamment de la charge mécanique subie par le cœur.<sup>39</sup> Une étude a même démontré qu'une hyperglycémie d'un patient diabétique augmenterait le dépôt de collagène cardiaque, probablement via l'AngII.<sup>41</sup> Il est clair, cependant, que la fibrose se produit lors d'un déséquilibre entre les stimuli pro- et anti-fibrotiques. Les premiers sont représentés par les composantes du système rénine-angiotensine-aldostérone (AngII, aldostérone et déoxycorticostérone), ainsi que par certaines cytokines inflammatoires comme le TGF- $\beta$ , des catécholamines et des facteurs de croissance. Les seconds sont plutôt représentés par l'ANP, la bradykinine, les prostaglandines, l'oxyde nitrique et les glucocorticoïdes.<sup>16,40</sup>

L'équilibre entre ces inhibiteurs et ces stimulateurs de la croissance est d'une complexité qui en a empêché jusqu'à présent la compréhension complète. Cependant, plusieurs études ont déjà démontré l'existence de liens étroits entre l'AngII, l'ET-1 et le TGF- $\beta$  (voir la figure 3). L'AngII et le TGF- $\beta$ , par exemple, sont connus pour induire la transcription du précurseur de l'ET-1 dans certaines cellules comme les VSMCs<sup>42</sup> Or, l'ET-1 stimule la production de la collagène soit directement soit en induisant la sécrétion d'aldostérone.<sup>40</sup> Parallèlement, l'AngII stimule les myofibroblastes et les macrophages à exprimer du TGF- $\beta$ , qui induit ensuite la transcription de collagène et de TIMPs.<sup>43</sup> Une rétroaction positive est même présente puisque le TGF- $\beta$  induit

**Figure 3 : Interactions entre différents facteurs de croissance impliqués dans la fibrose cardiaque**

PG: prostaglandines; BK: bradykinine; NO: oxyde nitrique; Aldo: aldostérone; ET: endothéline; AngII : angiotensine II; TGF- $\beta$  : *transforming growth factor beta*.  
 (+ : régulation positive; - : régulation négative)

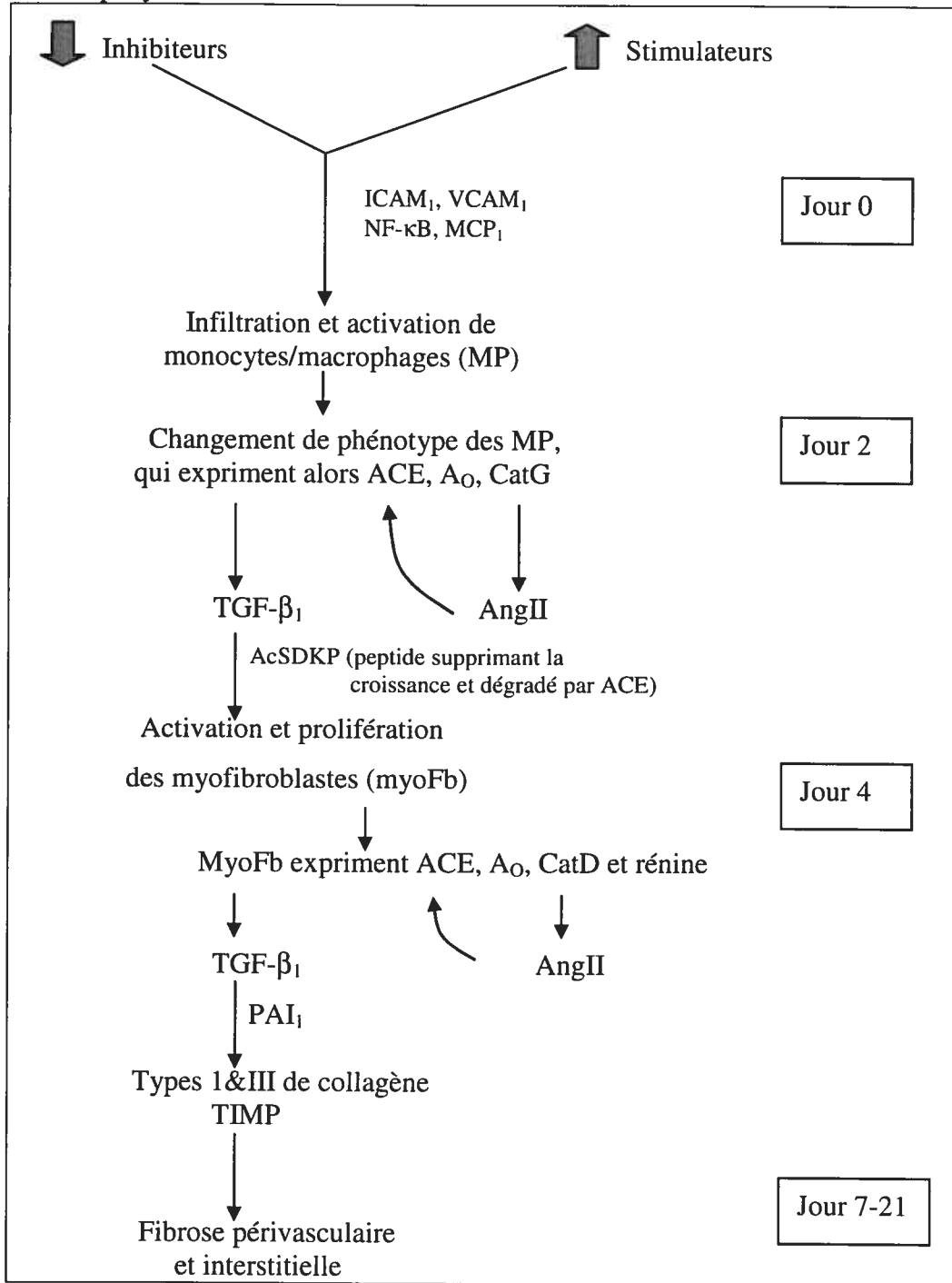


Tirée et modifiée de Weber, K.T. 2000<sup>16</sup>

la synthèse de l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène (ACE) par les myofibroblastes, les fibroblastes en produisant très peu, ce qui accroît la concentration d'AngII localement.<sup>40</sup> Par ailleurs, les myofibroblastes expriment aussi hautement le récepteur AT<sub>1</sub> à l'AngII.<sup>22</sup> Enfin, la molécule d'adhésion ICAM (voir section 1.4.2.2) exprimée sur les macrophages pourrait induire directement la prolifération des fibroblastes et leur production de TGF- $\beta$  dans les zones de fibrose périvasculaire de myocarde soumis à une hypertension, de façon indépendante de la simple accumulation des macrophages.<sup>40</sup> La figure 4 illustre les événements menant à la fibrose selon leur ordre chronologique.

**Figure 4 : Mécanismes d'activation de la fibrose périvasculaire et interstitielle suite à des stimuli pro-inflammatoires**

Cat : cathepsine; PAI-1 : *plasminogen activator inhibitor-1*; AcSDKP : Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro



Tirée et modifiée de Weber, K.T. 2000<sup>16</sup>

### 1.3. Tension artérielle

#### 1.3.1. Homéostasie

Selon le grand dictionnaire terminologique de l'Office québécois de la langue française, l'homéostasie en biologie est définie comme étant la « tendance [...] d'un organisme à garder ou à reprendre son équilibre, menacé par l'action de facteurs physiques ou chimiques, grâce au mécanisme de systèmes régulateurs ». Chaque individu vivant, animal ou végétal, maintient en effet à l'intérieur d'un intervalle physiologique idéal des paramètres corporels autant biochimiques que physiologiques. Pour ce faire, le corps produit et sécrète un nombre considérable de messagers hormonaux, protéiques ou chimiques, dont une grande partie voyage dans la circulation sanguine. Bien que la pression veineuse soit aussi importante pour le flot sanguin, le principal contrôle de la pression sanguine se fait au niveau des artères. La pression artérielle, plus étudiée en raison du nombre considérable de mécanismes de régulation et des dérèglements menant à divers problèmes médicaux, est donc un facteur nécessitant une étroite surveillance de la part des praticiens de la santé. De fait, bien que ses déterminants directs soient la charge cardiaque et la résistance vasculaire, ses déterminants indirects sont plus nombreux et doivent aussi faire l'objet d'une attention accrue. Les mécanismes neuronaux, l'équilibre des électrolytes, les composantes du système rénine/aldostérone/angiotensine, les hormones diverses et les peptides opioïdes sont en effet impliqués dans le maintien d'une tension artérielle optimale, pour ne pas dire constante.<sup>44</sup>

À la base, c'est le système nerveux central qui dirige l'ensemble des opérations de conservation de l'équilibre des pressions. Le système nerveux autonome, par exemple, englobe les systèmes sympathique (associé aux situations d'urgence et d'action) et parasympathique (associé à la détente et à la digestion) dont les effets souvent antagonistes conservent la pression artérielle à l'intérieur d'un intervalle pré-établi.<sup>4</sup> Il est important de souligner le rôle plus important du système sympathique dans la régulation de la tension artérielle. Il

maintient en effet les muscles lisses des vaisseaux sanguins dans un état de constriction appelé tonus sympathique qu'il est possible de diminuer ou d'augmenter si l'organisme doit réduire sa tension artérielle ou l'élever, respectivement.<sup>4</sup> De plus, certains organes comme le cerveau et les reins disposent de mécanismes d'autorégulation de la pression artérielle dans les artérioles de résistance, par une réponse myogénique (musculaire) des parois des vaisseaux sanguins et par la relâche de facteurs vasoactifs.

Des barorécepteurs (ou mécanorécepteurs) capables de détecter l'étirement d'un tissu sont donc disposés un peu partout dans le corps afin de déceler les variations de la pression sanguine. Entre autres, les barorécepteurs aortocarotiques situés au niveau de l'aorte et des carotides détectent un changement de pression, alors que les barorécepteurs cardio-pulmonaires situés au niveau des oreillettes et ventricules détectent des changements de volume sanguin.<sup>3</sup> À ces barorécepteurs s'ajoutent des chimiorécepteurs sensibles à l'excès de gaz carbonique ( $\text{CO}_2$ ) et de protons ( $\text{H}^+$ ) ou à la déficience en oxygène ( $\text{O}_2$ ) dans le sang, de même que des osmorécepteurs captant les différences dans l'osmolarité, c'est-à-dire la concentration totale de tous les solutés dissous dans le sang. L'intégration de tous ces signaux est faite par le noyau du faisceau solitaire (NFS), situé au niveau du bulbe rachidien. Le NFS peut stimuler l'hypothalamus à libérer (via l'hypophyse) de la vasopressine, un agent antidiurétique. Il agit aussi sur les systèmes parasympathique et sympathique, ce dernier induisant entre autres la libération de rénine par les glandes surrénales.<sup>3,45</sup>

Le système nerveux sympathique libère aussi d'autres substances vasoactives comme les catécholamines.<sup>3</sup> La norépinéphrine (NE) et l'épinéphrine, par exemple, vont stimuler les récepteurs  $\alpha$ - et  $\beta$ -adrénergiques, ce qui augmente le rythme cardiaque et la force des contractions, de même que provoque une vasoconstriction, une bronchodilatation, une analgésie et une hypertrophie vasculaire. La dopamine, pour sa part, diminue la pression

sanguine par une vasodilatation et une diurèse/natriurèse plus élevée, de même qu'elle inhibe la sécrétion de NE et d'aldostérone.

#### 1.3.1.1. Système Rénine-Angiotensine

Malgré leur puissance, les mécanismes de contrôle neuronaux de la pression artérielle ne suffisent pas entièrement à la tâche de la maintenir à l'intérieur des valeurs physiologique idéales. Parmi les autres processus impliqués, le système RAAS (pour *renin-angiotensin-aldosterone system*) est l'un des plus importants et certainement un des plus étudiés en recherche médicale. Bien que l'élément actif du RAAS soit principalement l'angiotensine II, cette hormone peptidique de huit acides aminés n'est pas le seul facteur impliqué dans la cascade de signalisation complexe que forme le RAAS. Comme son nom l'indique, le RAAS est constitué de trois composantes primaires, soit la rénine, les angiotensines et l'aldostérone.

Si plusieurs tissus ou organes comme le cerveau, le cœur ou les ovaires produisent de la rénine, la source majeure de cette enzyme reste toutefois les cellules juxtaglomérulaires des glomérules rénaux.<sup>3,46</sup> La rénine est d'abord exprimée sous forme de prépro-rénine qui doit être clivée à l'intérieur de la cellule une première fois en prorénine, puis une seconde fois avant que sa forme active ne puisse être sécrétée suite à la réception des stimuli appropriés. Il est à noter qu'une nouvelle enzyme, nommée PreR-Co, clive la prorénine tissulaire, produite localement, sans toutefois cliver son homologue plasmatique retrouvée cependant en grande concentration dans le sang.<sup>47</sup> La rénine active est donc sécrétée dans le sang suite à une diminution de la pression de perfusion dans les reins (ressentie par des barorécepteurs) ou de la livraison de sel dans les tubules distaux (détectée par les cellules de la macula densa), de même qu'après une stimulation par le système sympathique ou par des facteurs humoraux.<sup>3</sup>

L'angiotensinogène (AGT) est sécrété dans le sang par les hépatocytes, mais il est aussi produit localement par d'autres organes comme le cerveau, les glandes sexuels et le cœur, dans lequel il est synthétisé par les cardiomyocytes



et les fibroblastes. C'est le précurseur originel à partir duquel découlent toutes les formes de l'angiotensine, via différents clivages peptidiques.<sup>3</sup> En particulier, l'Ang II résulte d'un premier clivage de l'AGT en AngI par la rénine, suivi d'un second clivage de l'AngI par l'enzyme ACE (pour *angiotensin converting enzyme*) exprimée à la surface des cellules endothéliales. ACE, par ailleurs, clive aussi la bradykinine afin d'inhiber sa capacité vasodilatatrice. Bien que certaines autres formes d'angiotensine comme l'Ang1-7 aient des fonctions spécifiques, l'AngII est certainement la plus active, du moins selon les connaissances actuelles. L'AngII agit via les récepteurs AT-1 et AT-2 (et leurs sous-types), dont les effets physiologiques sont souvent opposés.<sup>3,48</sup> Par exemple, la liaison de l'AngII au récepteur AT-1, via l'activation de voies de signalisation comme celle des MAP kinase ou de la protéine kinase C (PKC), stimule la vasoconstriction et la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales. Le tableau 1, modifié à partir de celui de Hypertension Primer<sup>3</sup>, résume certains des effets physiologiques de l'AngII médiés par le récepteur AT-1.

**Tableau 1 : Cibles de l'AngII et ses actions**

<b>Organes ou cellules ciblés</b>	<b>Action</b>
Cellule vasculaire de muscle lisse	Vasoconstriction, hypertrophie et hyperplasie
Endothélium vasculaire	Sécrétion de prostaglandine, oxyde nitrique et endothéline
Tissu conjonctif vasculaire	Synthèse de protéines de la MEC
Myocarde	Hypertrophie
Glandes surrénales	Sécrétion d'aldostérone
Cellules juxtaglomérulaires	Inhibition de la relâche de rénine (rétroaction négative)
Tubule proximal des reins	Réabsorption du sodium
Neurones sympathiques	Relâche de norépinéphrine
Foie	Synthèse d'angiotensinogène (rétroaction positive)

Modifié de Katz AM. 2000<sup>29</sup>

Les effets d'AT-1, contrôlés entre autres par des boucles de rétroactions positives ou négatives, visent en général à augmenter le volume sanguin et/ou la pression artérielle. Ils peuvent résulter en hypertrophie ou fibrose cardiaque ainsi qu'en inflammation s'ils se poursuivent à long terme. À l'opposé, le récepteur AT-2, prédominant durant le stade fœtal, protège certains organes de l'action excessive de AT-1 en induisant la natriurémie, l'apoptose et la sécrétion de bradykinine, un vasodilatateur agissant via la production d'oxyde nitrique.<sup>3</sup> L'action de l'AngII sur les glandes surrénales est très importante au niveau des pathologies cardiovasculaires en raison des effets de l'aldostérone. Celui-ci agit en effet sur la transcription génique afin d'accroître le nombre de canaux sodiques dans les conduits rénaux et ainsi augmenter la réabsorption de sodium, de même qu'il pourrait être responsable d'une réponse nécrotique ou fibrotique dans les reins et le cœur, de façon indépendante de la pression systolique.<sup>49,50</sup> Son action sur les fibroblastes cardiaques, quoique imparfaitement élucidée, serait d'augmenter leur prolifération de manière à favoriser la fibrose.<sup>50</sup> De plus, il peut agir directement et de façon transcription indépendante sur la mobilisation du calcium dans les VSMC et les leucocytes mononucléaires (HML pour *human mononuclear leukocytes*) et semblerait agir sur des paramètres cardiovasculaires comme la résistance vasculaire, selon des mécanismes à élucider.<sup>49</sup>

Outre les systèmes nerveux et RAAS, l'organisme maintient sa pression artérielle à l'aide d'une panoplie d'autres mécanismes plus ou moins reliés entre eux.<sup>3</sup> Par exemple, l'ACTH (pour *adrenocorticotropic hormone*) augmente aussi la sécrétion d'aldostérone. L'endothéline, un vasoconstricteur sécrété par l'endothélium et impliqué dans la fibrose et l'hypertrophie vasculaire, est relâchée suite à une stimulation par l'AngII, le TGF- $\beta$ , un faible stress de cisaillement ou la vasopressine. Cette dernière est un vasoconstricteur et un stimulateur de la rétention d'eau libéré par la neurohypophyse (mais produite par l'hypothalamus) lors d'une diminution de la pression ou du volume sanguin ou encore lors d'une augmentation de l'osmolarité.<sup>4</sup> Il existe quantité

d'autres éléments vasoactifs qui agissent soit en tant que vasodilatateur (kinines, peptides natriurétiques, oxyde nitrique, adrénomédulline, bFGF, VEGF), vasoconstricteur (thromboxane A<sub>2</sub>, PDGF, EGF) ou les deux (sérotonine) et qui peuvent aussi jouer divers rôles à d'autres niveaux comme la natriurémie et la sécrétion d'aldostérone, de même qu'interagir les uns avec les autres.<sup>3</sup>

### 1.3.2. Hyper- et hypotension

Visiblement, les phénomènes régulant la pression artérielle forment un ensemble complexe à l'intérieur duquel quantité de déséquilibres temporaires ou non peuvent apparaître. Lorsque ces déséquilibres mènent la tension artérielle à l'extérieur des paramètres physiologiques prédéterminés, il est alors question d'hypertension ou d'hypotension. La tension artérielle, dont les unités cliniques sont les millimètres de mercure (mmHg), est exprimée par deux chiffres consécutifs correspondant respectivement à la pression systolique (contraction du cœur) et à la pression diastolique (relaxation du cœur). Selon le Collège des médecins de famille du Canada, une pression normale serait inférieure à 130/85 mmHG.<sup>51</sup>

Bien que pouvant entraîner des désagréments lorsqu'elle est présente sous une forme sévère, l'hypotension est au contraire souvent considérée comme un signe de bonne forme physique et ne constitue pas un grave danger pour la santé.<sup>52</sup> Une baisse trop forte de la tension artérielle peut cependant causer des malaises plus ou moins prononcés si le cerveau vient à manquer de sang, allant de la simple faiblesse générale à l'évanouissement (syncope), en passant par des palpitations et des étourdissements. La majorité des cas rencontrés est de type orthostatique, c'est-à-dire qu'elle est causée par un redressement trop rapide du corps provoquant une accumulation de sang dans ses parties inférieures, ou alors post-prandiale, c'est-à-dire survenant après un gros repas. Évidemment, l'insuffisance cardiaque, une déshydratation grave, une hémorragie, la prise de médicaments ou certaines maladies chroniques

comme la maladie d'Addison peuvent aussi causer une hypotension prolongée et/ou sérieuse.<sup>52</sup>

L'hypertension, pour sa part, pourrait être définie comme une tension artérielle de plus de 140/90 mmHg à partir de laquelle les risques de maladies cardiovasculaires, d'accidents cérébrovasculaires et de lésions aux reins sont plus élevés.<sup>53</sup> Ainsi, l'hypertension peut mener à l'infarctus du myocarde, au durcissement accéléré des artères pouvant causer des anévrismes ou diminuer drastiquement l'apport sanguin d'un organe ou d'un tissu, de même que réduire la filtration rénale de manière à permettre une accumulation importante de déchets dans le sang. Malgré l'état des connaissances actuelles sur la régulation de la pression artérielle, la médecine moderne ne peut identifier la cause originelle de l'hypertension que dans un cas sur vingt, qui est appelé hypertension secondaire, alors que tous les autres cas sont appelés hypertension essentielle ou primaire.<sup>54</sup> Parmi les causes d'hypertension secondaire, on retrouve principalement des affections rénales, dont l'athérosclérose des artères rénales qui diminuent l'apport sanguin aux glomérules, et surrénales, lors desquelles il y a surproduction d'aldostérone (hyperaldostéronisme), de cortisol (syndrome de Cushing) ou d'adrénaline/noradrénaline (phéochromocytome).<sup>54</sup> Dans une moindre mesure, la prise de contraceptifs oraux peut aussi augmenter de façon substantielle la pression artérielle, de même que l'acromégalie et l'hyperparathyroïdisme.<sup>53</sup> Bien que les causes de l'hypertension primaire soient inconnues, l'existence de plusieurs facteurs de risque a déjà été prouvée, autant au niveau environnemental que génétique. Les facteurs environnementaux pouvant influencer la tension artérielle sont l'ingestion exagérée de sodium et d'alcool, l'obésité et le stress prolongé.<sup>55</sup> Le tabagisme lui-même ne cause pas d'hypertension, mais il inhibe les effets bénéfiques des traitements anti-hypertenseurs et constitue un des facteurs de risques de cardiopathie et d'accidents cérébrovasculaires.<sup>53</sup> De leur côté, les facteurs génétiques toucheraient autant le sexe de l'individu<sup>56</sup> que sa capacité à gérer le sodium, les composantes du système RAAS et pratiquement tous les autres constituants des

mécanismes de régulation de la pression artérielle comme les gènes de l'endothéline et de ses récepteurs, du système noradrénergique, etc.<sup>55</sup> L'addition de tous ces facteurs de risques et leurs interactions déterminent la gravité de l'hypertension d'un individu.

### 1.3.3. Modèles expérimentaux

Plusieurs modèles animaux basés sur des techniques génétiques ou autres ont été mis au point afin d'étudier les mécanismes de régulation de la pression artérielle.<sup>57</sup> Les modèles génétiques ont été développés principalement pour étudier l'hypertension essentielle en raison de l'implication de multiples gènes. Bien que le plus répandu soit le croisement et l'élevage sur plusieurs générations de souches animales présentant des phénotypes désirés, la délétion ou la surexpression génique des composantes de la régulation de la tension artérielle sont aussi utilisées. Les modèles non-génétiques sont plus ciblés et correspondent à l'hypertension secondaire due à une cause précise et connue. Des moyens chirurgicaux comme la constriction, la sténose ou l'occlusion des artères, de même que des voies métaboliques comme l'infusion de composantes du RAAS, l'inhibition de l'oxyde nitrique ou des diètes particulières, sont alors utilisés.

Le modèle DOCA-sel utilisé dans cette étude fait partie de cette seconde catégorie de modèles. Ces animaux traités présentent une hypertension artérielle ainsi qu'une hypertrophie cardiaque associée à une diminution de l'apport sanguin des coronaires et une fibrose périvasculaire et interstitielle.<sup>58</sup> Ce modèle consiste à infuser les animaux choisis avec de l'acétate de déoxycorticostérone (DOCA) pendant quelques semaines à l'aide d'une pompe osmotique ou d'un implant de silicone, tout en les abreuvant exclusivement d'eau salée à une concentration isotonique. De plus, une uninephrectomie est pratiquée afin de réduire la capacité de filtration des reins. Le modèle DOCA-sel est caractérisé par une augmentation des concentrations plasmatiques de vasopressine et d'endothéline-1. Ces deux hormones joueraient alors un rôle

important dans le maintien d'une pression artérielle élevée, par des mécanismes se chevauchant et pouvant se compenser lorsque l'un des deux est déficient.<sup>58,59</sup> ET-1 serait aussi un facteur hypertrophique des cardiomyocytes.<sup>58</sup> De plus, un phénomène de remodelage des artères de résistance mène à la réduction de leur lumière. Enfin, ce modèle montre une diminution importante de la concentration plasmatique de rénine en raison de l'inhibition, du moins partielle, du système RAAS, probablement via des boucles de rétroinhibition.<sup>58</sup> Bien que très efficace à provoquer l'hypertension artérielle et l'hypertrophie cardiaque accompagnée de fibrose et d'inflammation, le modèle DOCA-sel présente les désavantages de nécessiter l'utilisation de fortes doses de DOCA (300 à 1000 mg × kg<sup>-1</sup> × jour<sup>-1</sup>), l'ingestion de grandes quantités de NaCl et la pratique d'une chirurgie visant à réduire la masse rénale.<sup>60</sup> Dans tous les cas, il est nécessaire de suivre la progression de l'hypertension. La méthode dite du « tail-cuff » permet de mesurer périodiquement la pression artérielle à l'aide d'un manchon appliqué sur la queue des rats. Malheureusement, cette technique peu dispendieuse provoque un stress important chez les animaux, ce qui peut altérer la mesure.<sup>57</sup> Beaucoup plus coûteuse, la télémétrie est cependant une technique précise permettant de mesurer la tension artérielle basale en continue d'animaux non stressés, à l'aide d'une sonde implantée dans l'animal. Le choix de la technique à utiliser doit par conséquent tenir compte des besoins et des moyens des laboratoires.

#### **1.4. Inflammation cardiaque**

##### **1.4.1. Généralités**

L'inflammation est un processus de défense que les organismes évolués ont développés afin de se protéger des attaques extérieures des micro-organismes ou leurs produits, ainsi que de certains pathogènes ou autres éléments internes comme des cellules anormales. Elle est produite et régulée par le système immunitaire, que l'on sous-divise en immunité innée (non-spécifique) ou acquise (spécifique).<sup>4</sup> L'immunité innée est assurée par les

barrières et les réflexes naturels avec lesquels naît un individu, de même que par des processus physiologiques non spécifiques impliquant entre autres des leucocytes et leurs produits. Pour sa part, l'immunité acquise doit se développer au fur et à mesure que l'organisme rencontre des envahisseurs et met en place des processus impliquant la sécrétion par les lymphocytes d'anticorps spécifiques à ces éléments.<sup>61</sup> Bien que l'inflammation soit à priori un processus de défense de l'organisme, elle entraîne aussi des dommages cellulaires dont les effets physiologiques se font plus ou moins sentir selon l'organe ou le tissu touché.<sup>62</sup> En effet, les organes disposant d'une redondance interne (de multiples glomérules rénaux indépendants, par exemple) ou externe (la présence de deux poumons, par exemple), ou encore d'une bonne capacité de régénération cellulaire sont beaucoup plus tolérants à l'inflammation que le cœur, dépourvue de ces caractéristiques. Lorsqu'il est soumis à une inflammation prolongée, par exemple, ce dernier présente souvent une cardiomyopathie dilatée, c'est-à-dire une décompensation du myocarde suite à sa détérioration.<sup>62</sup>

Au niveau clinique, l'inflammation cardiaque peut se présenter sous deux formes engageant soit uniquement l'immunité innée soit l'immunité innée et acquise.<sup>62</sup> La seconde forme se rencontre, plus rarement, lors de myocardite causée par des infections virales ou parasitaires. L'inflammation associée à la seule immunité innée se rencontre plus souvent puisqu'elle est due, outre à des infections bactériennes, à l'ischémie légère. Comme il a déjà été mentionné, cette dernière est souvent causée par la fibrose cardiaque, contrairement à l'ischémie prolongée qui est plutôt causée par un blocage des artères coronariennes. Or, l'ischémie légère, bien que néfaste par elle-même, est suivie par une reperfusion sanguine des zones touchées qui aggrave les dégâts cellulaires en apportant avec elle les composantes cellulaires (les leucocytes) et chimiques (les cytokines) de l'inflammation. De plus, cette reperfusion permet l'arrivée dans le myocarde de composés réactifs de l'oxygène (ROS, pour *reactive oxygen species*), produits soit par les parois artérielles soumises à de l'hypertension<sup>63</sup>, soit suite l'induction des mitochondries des cardiomyocytes

par les cytokines nouvellement présentes.<sup>64</sup> Une boucle de rétro-activation s'effectue alors puisque les ROS peuvent à leur tour induire l'expression et la libération des cytokines ayant stimulé leur production, comme le TNF- $\alpha$ <sup>64</sup>, ce qui peut ainsi nuire directement aux cardiomyocytes et aux cellules vasculaires.<sup>65</sup> Outre leur effet inhibiteur de la fonction myocardique, les ROS semblent activer des facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B et AP-1 (pour *activator protein-1*) et agir en tant que second messenger dans plusieurs cascades signalétiques du myocarde.<sup>64,65</sup> Enfin, ils joueraient possiblement un rôle dans la chémoattraction<sup>63,65</sup> et seraient indispensables lors des divers phénomènes associés au remodelage cardiaque.<sup>64</sup>

#### 1.4.2. Recrutement et activation cellulaire

##### 1.4.2.1. Cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines<sup>4</sup> sécrétées par les cellules et agissant comme puissants médiateurs de l'inflammation<sup>61</sup> et de la fibrose<sup>66</sup>, en servant de système de communication entre les multiples cellules impliquées lors de l'inflammation.<sup>67</sup> Bien leur fonction première soit l'adaptation du cœur aux attaques physiologiques et extérieures, elles conduisent aussi à des réponses pathologiques lorsqu'elles sont présentes trop longtemps et en trop grande concentration.<sup>62</sup> Elles comprennent les interleukines (IL) et les facteurs de croissance des colonies, les premières étant produites exclusivement par les leukocytes.<sup>4,61</sup> Le TNF- $\alpha$  (pour *tumor necrosis factor- $\alpha$* ), les IL 2 à 7 et 9 à 13, les interférons (IFNs), le TGF- $\beta$ , la prolactine et le facteur de croissance des granulocytes (G-CSF pour *granulocyte colony-stimulating factor*) donnent une idée de la diversité des protéines faisant partie de la grande famille des cytokines.<sup>29</sup> Tout comme leur nature, les cytokines ont des fonctions extrêmement diverses, allant de la stimulation de l'érythropoïèse à celle de la lactation en passant par la promotion de l'inflammation.<sup>29</sup> De plus, leurs effets peuvent être additifs, synergétiques ou antagonistes.<sup>67</sup> Fait paradoxal, certaines



cytokines comme le TNF- $\alpha$  induisent à elles seules des réponses diamétralement opposées en stimulant des cascades de signalisation menant autant à la croissance cellulaire qu'à l'apoptose.<sup>29</sup> De plus, certaines cytokines ont des fonctions redondantes, comme IL-1 et IL-6 qui provoquent la fièvre.<sup>61</sup> Cependant, la protection contre les effets néfastes de l'ischémie demeure toutefois une de leurs tâches principales dans le cœur, comme en témoigne l'expression de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 par les cardiomyocytes et les cellules immunitaires suite à l'ischémie.<sup>62</sup> En effet, les cytokines induisent la prolifération et la croissance cellulaire afin de permettre une bonne réparation et cicatrisation d'une lésion, via l'expression génique et la synthèse protéique. Par exemple, elles augmenteraient la synthèse d'enzymes dégradant les radicaux libres ainsi que de protéines de choc thermique protégeant contre le stress (hsp pour *heat shock proteins*), de même qu'elles stimulent la production d'oxyde nitrique.<sup>29</sup> En contre-partie, en plus d'attaquer les envahisseurs, ce dernier endommage aussi les cellules lorsqu'il est produit sur une trop longue période, et une croissance cellulaire prolongée mène à l'hypertrophie cardiaque et à la mort des cardiomyocytes. L'action des cytokines est par conséquent à double tranchant.

Bien que sécrétées par plusieurs cellules différentes, la synthèse des cytokines est partout régulée principalement par le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, qui active aussi d'autres gènes impliqués dans l'inflammation comme celui de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS, pour *inducible nitric oxide synthase*).<sup>29</sup> Les mitogènes, les endotoxines, les protéines virales et même les cytokines activent ce facteur de transcription. Les cytokines permettent en effet une rétroaction positive visant à amplifier la réaction inflammatoire, via l'activation de leurs propres récepteurs membranaires spécifiques. Synthétisées sous la forme de pro-protéines, les cytokines doivent d'abord être clivées par des enzymes spécifiques à la membrane plasmique. Ces derniers sont de type tyrosine kinase, c'est-à-dire qu'ils phosphorylent d'autres protéines sur des résidus d'acides aminés tyrosine grâce à leur protéine associée JAK (pour *janus*

*kinase*). La liaison d'une cytokine à son récepteur induit alors deux cascades de phosphorylation, l'une activant NF- $\kappa$ B par l'inhibition de son inhibiteur (I $\kappa$ B) et l'autre activant les STAT (pour *transducer and activator of transcription*), deux familles de facteurs de transcription régulant une panoplie de gènes différents. Les stimuli physiologiques pour la libération des cytokines comprennent entre autres l'hypertension, l'angine instable, l'infarctus du myocarde, la reperfusion ischémique et la défaillance cardiaque.

#### 1.4.2.2. Protéines d'adhésion et infiltration des leucocytes

Parmi les gènes dont la transcription est stimulée par les cytokines, on retrouve entre autres les gènes codant pour des protéines d'adhésion.<sup>68</sup> Bien que se retrouvant sous forme soluble dans le sang, ces protéines de structures très différentes sont en fait exprimées par les cellules endothéliales ainsi que par les cellules du système immunitaire, les leucocytes. Ce dernier terme englobe plusieurs types cellulaires, dont les principaux sont représentés par les cellules mononucléées (PBMC pour *peripheral blood mononuclear cells*) comprenant les lymphocytes et les monocytes, de même que par des cellules qualifiées de polymorphonucléaires (PMN) comprenant les granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles. Les granulocytes tirent leur nom de la présence dans le cytoplasme de granules, ou lysosomes, remplis d'enzymes pouvant être libérés dans l'espace interstitiel afin d'attaquer les envahisseurs.<sup>61</sup> Alors que les monocytes se différencient en macrophages lorsqu'ils migrent dans un tissu, les lymphocytes B et T médient plutôt la réaction immunitaire spécifique due aux anticorps. Tous ces types cellulaires sont plus ou moins recrutés, dépendamment du type d'inflammation se produisant. On associe généralement un recrutement de neutrophiles et de macrophages à une inflammation sévère, alors que la forme chronique (plus de trois semaines) est plutôt associée à un recrutement des monocytes et lymphocytes.

Le recrutement des différentes cellules inflammatoires au site d'inflammation nécessite la participation de plusieurs substances, dont les

molécules d'adhésion cellulaire (CAM, pour *cell adhesion molecules*) et les chimiokines. Ces cytokines particulières sont responsables de la chimiotaxie, c'est-à-dire de l'attraction et du mouvement de cellules inflammatoires le long d'un gradient de concentration.<sup>67</sup> Suite à l'apparition d'une lésion comme celle provoquée par l'ischémie, elles sont sécrétées par les cellules endothéliales et les leucocytes dans le but d'y attirer de nouvelles cellules inflammatoires. Outre cette sécrétion d'agents chimiotaxiques, les cellules de l'endothélium et les leucocytes expriment de plus un surcroît de CAM, des protéines exprimées sur la surface de la membrane plasmique et dont font partie les intégrines, les sélectines et leurs ligands. De plus, le cytosquelette des cellules endothéliales se modifie afin d'ouvrir les jonctions intercellulaires et ainsi augmenter la perméabilité vasculaire, d'une importance capitale pour l'infiltration des divers éléments inflammatoires.<sup>67</sup>

Les intégrines sont des protéines d'adhésion présentes à la surface des membranes cellulaires des fibroblastes, des cardiomyocytes et des leucocytes. Elles sont capables de lier plusieurs protéines de la MEC présentant un motif RGD (arginine, glycine et acide aspartique) dans leur séquence d'acides aminés.<sup>69</sup> Hétérodimériques, elles sont formées d'une combinaison de deux sous-unités liées de façon non-covalente ( $\alpha$  et  $\beta$  de différents types). Bien qu'il existe plus de 17 sous-unités  $\alpha$ , il n'existe que huit sous-unités  $\beta$ <sup>70</sup> et seuls les leucocytes expriment l'isoforme  $\beta_2$  à leur surface.<sup>67</sup> Parmi les intégrines de type  $\beta_2$ , l'intégrine  $\alpha_4\beta_1$  ou VLA-4 (pour *very late antigen-4*) est en partie responsable de la liaison des divers leucocytes à la paroi de l'endothélium et de leur recrutement au site d'inflammation, via sa liaison avec son ligand endothélial VCAM-1 (pour *vascular cell adhesion molecule-1*). Le Mac-1 (pour *membrane attack complex-1*) et l'intégrine  $\alpha_L\beta_2$  ou LFA-1 (pour *leukocyte functional antigen-1*) lient pour leur part les ICAMs (pour *intercellular cell adhesion molecule*) eux aussi exprimés sur les cellules endothéliales. Outre leur importance dans l'adhésion cellulaire, les intégrines constituent aussi des récepteurs transmembranaires capables de transmettre des signaux autant vers

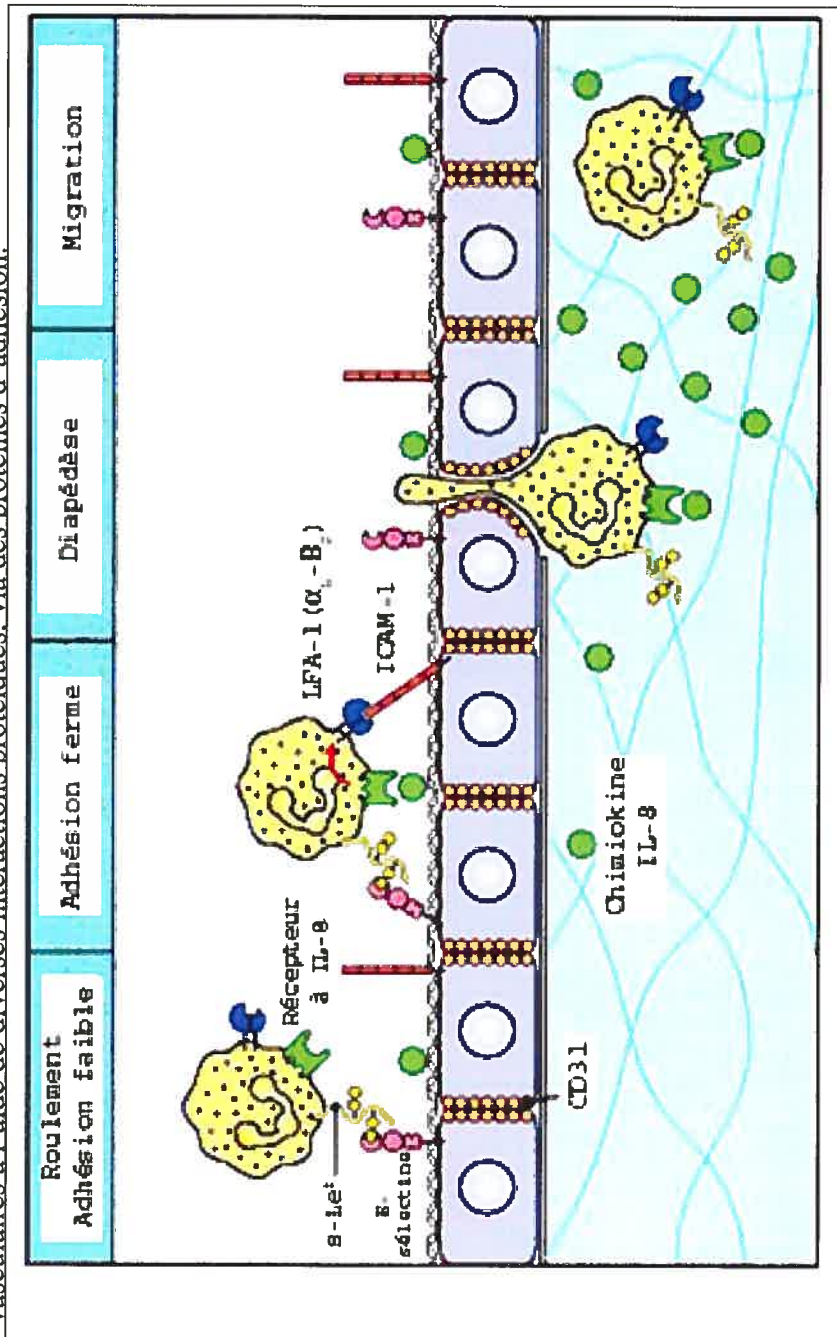
l'intérieur des cellules que vers l'extérieur et peuvent aussi agir à titre de transmetteur mécanique, étant associées aux cytosquelette intracellulaire.<sup>71,72</sup>

Les sélectines sont regroupées sous trois appellations liées aux cellules qui les expriment, soit les sélectines-P pour les plaquettes activées et les cellules endothéliales, les sélectines-L pour les leucocytes et les sélectines-E pour les cellules endothéliales.<sup>67</sup> Il est à noter que l'expression des formes E- et P- des sélectines est induite par les cytokines, ce qui contribue à nouveau au recrutement des leucocytes lors de l'inflammation. Leurs partenaires sur l'endothélium sont les groupements oligosaccharides de glycoprotéines et des glycolipides.<sup>73</sup> Par exemple, le PSGL-1 (pour *P-selectin glycoprotein ligand-1*) est exprimée sur tous les leucocytes et se lie aux sélectines-P.

Les CAM rendent possible le recrutement des cellules inflammatoires et le processus de l'extravasation, illustrés dans la figure 5. D'abord, les sélectines effectuent un premier contact avec les leucocytes circulant dans les vaisseaux sanguins, qui se mettent alors à «rouler» le long de l'endothélium. Ce roulement ralenti à l'approche du site d'inflammation en raison de l'expression accrue de CAMs et de chimiokines, jusqu'à ce que les intégrines et leurs ligands s'ajoutent afin d'établir une adhésion ferme. Les intégrines et leurs ligands permettent ensuite aux leucocytes de s'insérer entre deux cellules endothéliales, après quoi des chimioattractants comme IL-8 les dirigent vers le site d'inflammation.<sup>67</sup>

### Figure 5 : Extravasation des cellules inflammatoires

Sous l'influence de chemoattracteurs, transmigration de cellules inflammatoires à travers les parois vasculaires à l'aide de diverses interactions protéiques, via des protéines d'adhésion.



Tirée de Immunobiology. Janeway et al. 2001<sup>74</sup>

### 1.4.3. Inflammation et hypertension cardiaque

En situation normale, c'est-à-dire sans stress particulier, le cœur ne produit pas de cytokines de façon constitutive.<sup>62</sup> Cependant, une infection virale, le rejet d'un greffon ou une myocardite amènent le myocarde à en produire, de même qu'une surcharge hémodynamique provoque l'accumulation de TNF- $\alpha$  et autres cytokines dans le myocarde.<sup>29</sup> L'inflammation présente dans la reperfusion après ischémie demeure toutefois une référence pour ce qui est de l'inflammation rencontrée dans le modèle DOCA-sel utilisé lors de cette étude, les deux étant accompagnés d'hypertension et d'hypertrophie.

Les événements inflammatoires associés à la reperfusion après ischémie sont multiples et très complexes. Chaque étape de l'inflammation, c'est-à-dire les changements vasculaires (perméabilité), l'extravasation des leucocytes et la phagocytose des éléments dangereux, de même que la reconstitution du tissu et la croissance cellulaire impliquent plusieurs facteurs dont ceux du système RAAS<sup>75</sup> et les cytokines. L'AngII, par exemple, module l'activité de NF- $\kappa$ B et augmente l'expression de VCAM par un mécanisme impliquant probablement l'aldostérone et ses récepteurs.<sup>76</sup> Dans le modèle DOCA-sel, caractérisé entre autres par une plus grande infiltration de macrophages dans les zones de fibrose, l'expression accrue de VCAM-1 et PECAM-1 (pour *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*) mais pas de ICAM-1 survient suite à l'activation du récepteur ET<sub>A</sub>, qui augmenterait le NF- $\kappa$ B actif.<sup>77</sup> Le récepteur à l'endothéline ET-1 augmenterait aussi le NF- $\kappa$ B en induisant un stress oxydatif<sup>78</sup>, de même qu'il stimulerait les VSMCs à sécréter de l'IL-6.<sup>79</sup> Dans les modèles de constriction aortique, ICAM-1 et la chimiokine MCP-1 (pour *monocyte chemoattractant protein-1*) recrutent vers l'espace périvasculaire les macrophages, qui sécrètent alors du TGF- $\beta$  et d'autres facteurs profibrotiques.<sup>63</sup> La surexpression de MCP-1 résulterait du stress mécanique infligé aux artères par l'augmentation de la pression, de même que de la production de facteurs pro-inflammatoires comme les ROS et les cytokines.

Comme il a déjà été mentionné, une augmentation de la pression artérielle mène à une production de TNF- $\alpha$  par les cardiomyocytes et d'autres cellules du myocarde. De plus, un infarctus induit les cardiomyocytes à produire de l'IL-6.<sup>29</sup> Les cytokines alors produites par le myocarde s'ajoutent à celles sécrétées par les cellules inflammatoires recrutées sur le lieu de l'inflammation. L'accumulation d'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), exprimée dans les macrophages, semble confirmer le recrutement de ces cellules dans un cœur défaillant. À toutes ces cytokines s'ajoutent en plus des composantes du complément, qui s'accumulent sur les cellules endothéliales afin de promouvoir encore plus le recrutement.<sup>80</sup> Il est à noter que les cellules inflammatoires recrutées sont surtout des macrophages et des lymphocytes T auxiliaires, les lymphocytes T cytotoxiques étant peu présents.

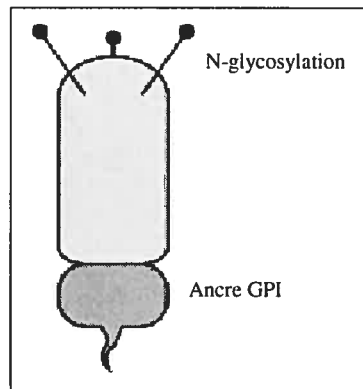
## **1.5. Protéine Thy1**

### **1.5.1. Description**

La protéine Thy-1, aussi nommée CD90 (pour une revue, voir Haeryfar & Hoskin, 2004), est une molécule d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines (Ig).<sup>81</sup> Elle comporte en effet un domaine Ig variable qui est amarré au côté extra-cellulaire de la membrane plasmique par une liaison covalente à une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) lui procurant une grande mobilité latérale. Cette ancre GPI peut d'ailleurs être clivée par la phospholipase C (PLC) afin de libérer une forme soluble de CD90. Thy-1 est une protéine de 25 à 29 kDa sous sa forme réduite et de 25 à 35 kDa sous sa forme non-réduite. Elle est hautement glycosylée puisque plus de 30% de sa masse est due à des carbohydrates.<sup>82</sup> De plus, comme le montre la figure 6 illustrant la protéine Thy-1 du rongeur, le domaine Ig de 111 ou 112 acides aminés est surmonté de trois groupements oligosaccharides attachés par des liens N et dont la nature varie selon l'espèce animale, le tissu ou le stade de différenciation cellulaire. Le Thy-1 humain ne contient, pour sa part, que deux groupements N-glycosylés.<sup>82</sup> Outre les différences dans la glycosylation de

Thy-1, il existe en réalité deux variants alléliques de Thy-1, nommés Thy-1.1 et Thy-1.2, ne différant que par la nature de l'acide aminé en position 89. Alors que la souris exprime ces deux variants, le rat n'en exprime que la première forme.<sup>83</sup>

**Figure 6 : Protéine Thy-1 à ancre GPI**



Tirée de Zucchini et al. 2001<sup>81</sup>

Thy-1 semble être exprimée par les fibroblastes et les cellules du cerveau de la plupart des espèces.<sup>82</sup> Chez les humains elle est aussi présente sur les cellules endothéliales, les cellules de muscle lisse, et sur certains types de cellules de la moelle osseuse ainsi que certains lymphocytes.<sup>81,82</sup> Chez la souris, on la retrouve aussi sur les thymocytes (lymphocytes T immatures), les cellules épidermiques, les cellules souches de la moelle osseuse, les myoblastes, les kératinocytes et les cellules T périphériques. Plusieurs modèles d'étude ont d'ailleurs été mis au point grâce à la présence de Thy-1 sur certaines cellules. Par exemple, la glomérulonéphrite due à un anticorps anti-Thy-1.1 repose sur la présence de cette protéine sur les cellules mésangiales du rein<sup>84,85</sup> alors que l'étude de la fibrose pulmonaire ou des dérèglements du myomètre repose sur sa présence à la surface de certains fibroblastes de ces tissus.<sup>21,86,87</sup> Ces tissus présentent deux sous-populations de fibroblastes, qui expriment ou non Thy-1.



### 1.5.2. Fonctions potentielles

La ou les fonctions exactes de la protéine Thy-1 n'ont pas encore été élucidées jusqu'à présent, bien que les hypothèses soient aussi nombreuses que les chercheurs qui l'étudient. L'absence de domaines transmembranaire et cytoplasmique empêche à première vue Thy-1 de posséder une activité de signalisation intracellulaire.<sup>81</sup> Pour palier à ce manque, une association physique de Thy-1 avec des protéines tyrosine kinases (PTK) comme p59fyn et p56/53lyn aurait été démontrée dans les cellules mésangiales de rat.<sup>81,83</sup> De plus, son appartenance à la superfamille des Ig, agissant habituellement en tant que récepteurs aux Ig (comme CD16 et CD89) ou aux facteurs de croissance (comme CSF-1),<sup>83</sup> propose aussi une fonction d'adhésion cellulaire. Par exemple, elle promouvrait l'adhésion des thymocytes à l'épithélium thymique et celle des cellules cytotoxiques aux cellules L. Son motif pseudo-RGD (RLD) lui permet aussi de lier les intégrines contenant la sous-unité  $\beta_3$ .<sup>83</sup> Thy-1 semblerait aussi pouvoir stabiliser les connections neuronales ou être impliquée dans l'apoptose des cellules mésangiales médiée par le complément.<sup>81</sup> L'expression de Thy-1 sur les fibroblastes pulmonaires serait même un modulateur moléculaire de l'activation du TGF- $\beta$  dans le cadre des stimuli profibrotiques, via la modulation de l'organisation du cytosquelette et de la formation des foyers d'adhésion.<sup>86</sup> Enfin, elle serait d'une grande importance pour les interactions entre les cellules mésangiales et les cellules endothéliales<sup>83</sup>, de même que pour l'activation des cellules T de souris.<sup>82</sup> Les mécanismes exacts par lesquels agirait Thy-1 afin d'influencer tous ces facteurs sont malheureusement inconnus à ce jour et c'est pourquoi de multiples recherches sont en cours.

Il semble certain, cependant, que Thy-1 puisse être utilisé comme marqueur de la différenciation de certains fibroblastes comme ceux des poumons de rat.<sup>88</sup> En effet, les fibroblastes pulmonaires présentent des morphologies différentes selon qu'ils expriment ou non Thy-1.<sup>86</sup> Par exemple, les premiers sont de forme allongée et possèdent dans leur cytoplasme du

matériel pseudo-lipidique, alors que les seconds sont plutôt sphériques et étendus et présentent parfois des dépôts de glycogène ainsi qu'un réseau plus développé de microfilaments et de microtubules.<sup>89</sup> D'ailleurs, ces derniers fibroblastes ont un potentiel de différenciation en myofibroblastes plus important que les premiers.<sup>86</sup> Il est important de faire une petite parenthèse et de noter qu'il existe probablement des spécificités tissulaires aux fibroblastes puisque le myomètre présente des fibroblastes Thy-1<sup>+</sup> qui expriment plus de SM  $\alpha$ -actine lorsqu'ils sont stimulés au TGF- $\beta$ .<sup>86</sup> Dans ce cas, ce sont ces fibroblastes qui possèdent un potentiel plus élevé de différenciation en myofibroblastes, alors que les cellules Thy-1<sup>-</sup> se différencient plutôt en lipofibroblastes.<sup>88</sup>

Au niveau biochimique, seuls les fibroblastes pulmonaires Thy-1<sup>-</sup> expriment le CMH de classe II (complexe majeur d'histocompatibilité) suite à une stimulation à l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ),<sup>21,89,90</sup> ce qui promouvoit l'inflammation chronique. De plus, lors de la fibrose pulmonaire, les fibroblastes exprimant Thy-1 sécrètent plus de collagène interstitiel alors que ceux ne l'exprimant pas répondent de façon plus prononcée aux cytokines en ce qui a trait à la prolifération cellulaire, à l'IL-6 et au TGF- $\beta$ ,<sup>21</sup> probablement via l'activation de TGF- $\beta$  latent.<sup>86</sup> Paradoxalement, ce sont les fibroblastes Thy-1<sup>-</sup> qui sont plus présents dans les zones de fibrose, suggérant un effet anti-fibrotique de Thy-1<sup>86</sup>, de même que ce sont les seuls à produire de l'IL-1 $\alpha$  suite à la stimulation par le TNF $\alpha$ .<sup>21</sup>

### 1.5.3. Ligand de Thy-1

Jusqu'à ce jour, peu de ligands à Thy-1 ont été formellement identifiés en plus de la protéine elle-même.<sup>91</sup> Il était connu depuis un certain temps déjà qu'un ligand de Thy-1 était exprimé sur les leucocytes polymorphonucléaires et les monocytes, mais pas sur les lymphocytes.<sup>92</sup> Ce ligand inconnu permettait en effet la liaison de ces leucocytes aux fibroblastes et aux cellules endothéliales

HDMEC (pour *human dermal microvascular endothelial cells*) activées par des médiateurs de l'inflammation et exprimant Thy-1. Or, la séquence RLD de Thy-1 mentionnée précédemment a incité plusieurs laboratoires à investiguer du côté des intégrines en ce qui a trait à la recherche de son ou de ses ligands. Il est à noter que certaines sous-unités  $\alpha$  des intégrines possèdent un domaine I d'environ 200 acides aminés qui servirait de site de liaison principal des intégrines à leurs ligands, en coopération avec des ions métalliques via le site MIDAS (pour *metal ion dependent adhesion site*).<sup>91</sup> Il s'est avéré que trois intégrines de type  $\beta_2$  ou  $\beta_3$  liaient effectivement Thy-1 via leur domaine I. Par exemple, l'interaction entre Thy-1 et l'intégrine  $\alpha_V\beta_3$  (CD51/CD61) exprimée sur les cellules de mélanomes humains faciliterait l'apparition de métastases en augmentant l'adhésion des cellules cancéreuses à l'endothélium des vaisseaux sanguins ainsi que leur extravasation.<sup>93</sup> Ce phénomène trouve d'ailleurs sa réplique parfaite lors du recrutement de cellules inflammatoires, auquel participent les deux autres intégrines liant Thy-1.

Exprimée uniquement sur les monocytes, les macrophages et les cellules dendritique CD8<sup>-</sup>, l'intégrine  $\alpha_X\beta_2$  (CD11c/CD18), par exemple, est capable de lier le collagène de type 1, le fibrinogène, ICAM-1 ainsi qu'une molécule du complément, soit iC3b.<sup>91</sup> Grâce à son domaine I,  $\alpha_X\beta_2$  interagit avec le Thy-1 exprimé sur les cellules endothéliales et cette liaison participerait à l'extravasation des leucocytes. De plus, il est possible que la liaison de Thy-1 avec cette intégrine exprimée sur les cellules dendritiques stimule la prolifération des cellules T et la production d'interleukine 12, mais ces hypothèses doivent encore être étayées.

Enfin, la seconde intégrine jouant un rôle dans le recrutement des leucocytes de types myéloïdes (monocytes et cellules PMN) via une interaction avec Thy-1 est l'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  (Mac-1; CD11b/CD18).<sup>94</sup> Elle est en effet en partie responsable de l'adhésion cellulaire de ces leucocytes et de leur extravasation via entre autres ICAM 1 et 2, de même que de phénomènes

dépendants de l'adhésion cellulaire comme la phagocytose de particules opsonisées et la chimiotaxie. Sa capacité de liaison avec une multitude d'autres protéines de surfaces très diversifiées en fait un initiateur et un régulateur important des processus inflammatoires. Or, il a été démontré que l'intégrine  $\alpha_M\beta_2$  se lie à Thy-1 afin d'augmenter l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales et ainsi faciliter leur extravasation dans les zones d'inflammation.<sup>94</sup>

#### 1.5.4. Localisation de Thy-1 dans les radeaux lipidiques

Bien que les connaissances sur Thy-1 soient encore incomplètes, il est connu depuis un certain temps déjà qu'elle se situe au niveau des radeaux lipidiques de la membrane plasmique.<sup>95</sup> Ces microdomaines de la membrane cellulaire sont formés par l'association de glycosphingolipides et de cholestérol en microaggrégats.<sup>72</sup> En raison des longues chaînes d'acides gras des sphingolipides et de leur niveau de saturation, les radeaux lipides sont plus épais que la membrane environnante et peuvent donc mieux accommoder certaines protéines à long domaine transmembranaire ou à ancre GPI comme Thy-1, de même que des protéines liant les carbohydrates comme les lectines, ces dernières stabilisant par ailleurs la membrane à l'intérieur des radeaux lipidiques.

Les radeaux lipidiques ne sont pas des structures stables puisque les protéines qui s'y rassemblent sont en mouvement. Le rassemblement de celles-ci facilite certaines voies de signalisation et augmente l'adhérence cellulaire par la multiplication des points de contact.<sup>96</sup> Par exemple, la liaison des intégrines à leurs ligands provoque leur rassemblement dans les radeaux lipidiques (desquels elles sont chassées lorsque inactives) de façon à augmenter leur avidité. Ce mouvement des intégrines semble par ailleurs être en partie régulé par le cytosquelette. À l'inverse, celui-ci peut aussi être affecté par les protéines des radeaux lipidiques. En effet, le Thy-1 des fibroblastes pulmonaires interagit directement ou indirectement avec la tyrosine kinase SFK (pour *src-family*

*protein tyrosine kinase*) présente dans les radeaux lipidiques afin d'empêcher son activation et ainsi promouvoir la formation des foyers d'adhésion et des fibres de stress, visant ainsi à inhiber la migration des fibroblastes.<sup>97</sup> Il est important de noter que la nature des protéines contenues dans les radeaux lipidiques diffère d'un microdomaine à un autre. Ainsi, le Thy-1 des fibroblastes pulmonaires se retrouverait dans des radeaux lipidiques ne présentant pas de cavéoline,<sup>97</sup> une protéine importante pour la formation des caveolae impliquée dans l'internalisation des récepteurs membranaires.<sup>98</sup> Les protéines de mammifères à ancre GPI sont en effet généralement présentes dans des radeaux lipidiques déficients en cavéoline<sup>99</sup> et ne pouvant être bien solubilisées que dans des détergents possédant une concentration micellaire critique comme l'octyl glucoside.<sup>100</sup> Ces propriétés peuvent heureusement être utilisées afin d'isoler et d'analyser les différents types de radeaux lipidiques.

## **2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS**

La fibrose cardiaque étant un phénomène étroitement associé à l'insuffisance cardiaque, il est essentiel d'en comprendre avec précision les mécanismes de régulation. Or, les fibroblastes présents dans le myocarde sont responsables de cette réponse pathologique pouvant mener à des maladies cardiaques graves. La compréhension de la fibrose cardiaque passe par conséquent par celle de ces fibroblastes cardiaques, qu'il est alors primordial de pouvoir identifier formellement parmi les nombreuses cellules formant le tissu complexe qu'est le myocarde. Plusieurs études ont déjà démontré la présence de la protéine Thy-1 sur des fibroblastes de diverses provenances comme les poumons ou le myomètre.<sup>86,88</sup> Cette protéine semble en outre être un marqueur de différenciation entre les types distincts de fibroblastes exposant différentes morphologies et fonctions incluant l'expression du collagène.<sup>21,101</sup>

Cette caractéristique de Thy-1 nous a menés à formuler l'hypothèse que la protéine Thy-1 pouvait aussi être exprimée sur les fibroblastes cardiaques et ainsi jouer un rôle important lors de la fibrose cardiaque. Thy-1 pourrait alors servir de marqueur cellulaire spécifique lors de l'étude de la fibrose cardiaque. De plus, la présence d'intégrines parmi les ligands déjà identifiés de Thy-1 indiquait une implication possible de cette protéine dans le recrutement de cellules inflammatoires accompagnant généralement la fibrose. Notre seconde hypothèse supposait que le recrutement de ces cellules résultait d'une interaction entre le Thy-1 des fibroblastes cardiaques et un ligand présent sur ces leucocytes.

Afin de confirmer ces hypothèses, des objectifs spécifiques ont été établis comme étant 1) la confirmation de l'expression de Thy-1 sur les fibroblastes cardiaques spécifiquement et sa localisation cellulaire, 2) l'investigation sur l'implication de Thy-1 dans les phénomènes fibrotiques ou associés à la fibrose dans des modèles de rats hypertendus DOCA-sel et 3) l'approfondissement de l'effet du changement de phénotype des fibroblastes

cardiaques sur l'expression de Thy-1. Un quatrième objectif visait à 4) confirmer la liaison de Thy-1 aux granulocytes et monocytes. Enfin, un objectif secondaire mais non négligeable consistait à 5) construire les bases d'un modèle d'étude in vivo de la fibrose cardiaque, à l'aide de rats déficients en fibroblastes cardiaques.

### 3. CONTRIBUTION ORIGINALE : ARTICLE

Sujet de l'article scientifique :

**Expression de la protéine Thy-1 sur les**  
**fibroblastes cardiaques :**  
**Absence d'association avec les marqueurs**  
**contractiles des myofibroblastes**



Submitted to: Journal of Molecular and Cellular Cardiology

**Expression of Thy-1 by Cardiac Fibroblasts: Lack of  
Association with Myofibroblast Contractile Markers**

Authors:

François Hudon-David\*

Fatiha Bouzeghrane\*

Patrick Couture\*

Gaétan Thibault\*

Unité de biologie cellulaire de l'hypertension  
Institut de recherches cliniques de Montréal  
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

**Correspondance:**

Gaétan Thibault, PhD

Institut de recherches cliniques de Montréal

110, avenue des Pins ouest

Montréal, Québec, Canada

H2W 1R7

Tel: (514) 987-5613

Fax: (514) 987-5585

E-mail: [REDACTED]

**Running head:** Thy-1 Expression by Cardiac Fibroblasts

## Abstract

The objective of this study was to investigate the presence of Thy-1 in the myocardium and on cardiac fibroblasts. Thy-1 expression was examined by immunohistology of ventricular sections from normal and deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive rats. Thy-1 immunostaining was detected in connective tissue on  $\alpha 8$  integrin-positive fibroblasts. Enhanced Thy-1 staining was observed in the hearts of DOCA-salt rats particularly in areas of interstitial fibrosis. Quantitative polymerase chain reaction of cardiac mRNA confirmed the increased Thy-1 expression. On cultured cardiac fibroblasts, flow cytometry showed that all cells were double-positive for Thy-1 and  $\alpha 8$  integrin. Analysis of isolated lipid rafts by detergent-free sucrose gradient indicated that Thy-1 protein was probably located in these structures. However, further analysis by immunocytochemistry and detergent solubilization of lipid rafts suggested that Thy-1 may be located on a membrane microdomain slightly different from those of caveolin-1 and flotillin-1. Differentiation of fibroblasts into myofibroblasts being a characteristic of cardiac fibrosis and scarring, cardiac fibroblasts were stimulated in the presence of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ). While the expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin and  $\alpha 8$  integrin doubled, Thy-1 level, measured by Western blotting and flow cytometry, was not influenced by TGF- $\beta$ . These results indicate that cardiac fibroblasts form an homogeneous population in terms of Thy-1 expression. In addition, its expression appears to be independent of fibroblast differentiation. Thy-1 represents a new marker of cardiac fibroblasts.

**Keywords:** Fibrosis, deoxycorticosterone acetate-salt hypertension,  $\alpha 8\beta 1$  integrin, smooth muscle  $\alpha$ -actin, transforming growth factor-beta, lipid rafts

## 1. Introduction

Fibroblasts that populate the connective tissue of the myocardium are cells that are responsible for the cardiac structure. By synthesizing and secreting several extracellular matrix (ECM) proteins (collagen I and III, fibronectin, etc.), matrix metalloproteinases, and growth factors, cardiac fibroblasts are able to maintain an intact structure surrounding contractile myocytes. Consequently, the ECM possesses biophysical properties that allow enough rigidity and elasticity to avoid wall rupture, but also permit myocytes to exert their contractile function. Under normal physiological conditions, equilibrium between synthesis and degradation is maintained, and the ECM displays the best properties for effective contraction. However, the situation worsens when the heart sustains a haemodynamic overload or is faced with an abnormal hormonal stimulus. As recently reviewed by Camelliti et al. [1], cardiac fibroblasts are pleiomorphic and pleiotrophic cells that are affected by several factors, including mechanical stretch, transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ), angiotensin II, endothelin-1, and tumor necrosis factor alpha. Cardiac fibroblasts respond to either mechanical or growth factor stimuli by changing their nature. The expression of several cytoskeletal proteins is increased. Cardiac fibroblasts, exhibiting contractile characteristics, are called myofibroblasts. In addition, the compositions as well as the secreted amounts of ECM proteins are greatly affected. ECM protein accumulation between myocytes results in tissue fibrosis, which affects the dynamic contractile properties of the heart.

Accordingly, it is imperative to better understand the exact nature of cardiac fibroblasts: what are the factors that can drive them and the consequences these may have on their behaviour. A prerequisite to these studies is the appropriate identification of cardiac fibroblasts in the myocardium. Cardiac fibroblasts, being rather undifferentiated cells, do not exhibit identifiable (evident) characteristics that can help to visualize them. The intermediate filament protein, vimentin, has served as a marker, but vimentin is

also expressed in endothelial cells of capillaries that are often located very close to fibroblasts. More recently, discoidin domain receptor 2 has been described to be exclusively present on cardiac fibroblasts [2]. We also observed that  $\alpha 8\beta 1$  integrin, a cell adhesion receptor that links actin myofilaments to ECM proteins, was present not only on cardiac fibroblasts, but on vascular smooth muscle cells (VSMC) as well [3]. An interesting feature of cardiac fibroblasts is their ability to transform into myofibroblasts; the appearance of smooth muscle (SM)  $\alpha$ -actin-positive cytoplasmic myofilaments is often used to detect them, and, as such, SM  $\alpha$ -actin is now recognized as a reliable marker of the myofibroblast phenotype. Myofibroblasts also express a larger quantity of  $\alpha 8\beta 1$  integrin [3,4].

In the present study, deploying immunohistological and cytochemical methods and mRNA analysis, we detected and identified Thy-1 protein as being predominantly expressed on cardiac fibroblasts of normal and deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt-treated rats. We also showed that Thy-1 expression was not influenced by cardiac fibroblast differentiation.

## 2. Material and Methods

### 2.1 DOCA-salt hypertension

DOCA-salt hypertension was induced as described previously [5]. Briefly, male Sprague-Dawley rats (200 g, Charles River, St. Constant, QC) were anaesthetized with 3% of isoflurane at a O<sub>2</sub> flow rate of 1 l/min and were right unilaterally nephrectomized. Silicone pellets releasing 200 mg of DOCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were introduced subcutaneously by an incision in the right flank of rats maintained anaesthetized by 1% isoflurane (n=7). Control rats (n=6) received the same treatment, except that the implant did not contain DOCA. Both groups were given an isotonic solution of 0.9% NaCl in tap water *ad libitum*. During the treatment, the rats were weighed and their blood pressure was measured by the tail cuff technique. After 21 days, DOCA-salt rats presented hypertension of  $178 \pm 16$  mm Hg compared to  $126 \pm 5$  mm Hg ( $p < 0.001$ ) for the control group. Also, heart-to-body weight and heart weight-to-tibia length ratios were increased from  $3.4 \pm 0.2$  to  $4.1 \pm 0.3$  mg/g ( $p < 0.001$ ) and from  $2.9 \pm 0.3$  to  $3.2 \pm 0.2$  g/mm ( $p < 0.05$ ), respectively. Animal housing and experimentation in accordance with Canadian Council on Animal Care and NIH guidelines were approved by the local animal care committee.

### 2.2 Immunohistochemistry

Hearts from treated and control rats anaesthetized with 75 mg/kg Ketamine and 10 mg/kg Xylazine were removed and cut into 3 parts. The upper and the middle parts were frozen in Tissue-Tek OCT (Somagen Diagnostics, Edmonton, AL) on dry ice-cooled methanol, while the apex was cut into 2 parts for protein and mRNA analysis. Five-micron frozen sections were cut with a Cryostat apparatus (Jung CM3000, Leica Microsystems, Richmond Hills, ON) and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used.

After tissue fixation for 5 min in cold acetone and endogenous quenching of peroxidase by 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 15 min, non-specific

binding was blocked by 30-min incubation with 10% normal goat serum (NGS) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, and 0.3% Tween 20 (TBT). The same buffer was used to dilute the primary and secondary antibodies while TBT without NGS served to rinse the slides between each step. Serial sections were incubated overnight at 4°C with primary antibody. Thy-1 was detected with an antibody purified from the hybridoma OX7 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK),  $\alpha$ 8 integrin, with an antibody (A8-2) from our laboratory [3], and ED1 (CD68), with an antibody from Serotec (Raleigh, NC). Binding of the primary antibodies was revealed either with peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG or an alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (Chemicon International Inc., Temecula, CA). Peroxidase activity was detected by 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Pierce Biotechnology, Rockford, IL), and counterstained by haematoxylin solution (Vector, Burlingame, ON). Alkaline phosphatase activity was disclosed by a combination of 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt and nitro-blue tetrazolium chloride (Pierce Biotechnology). Slides were mounted with Permount (Fisher Scientific, Montreal, QC) and observed on a Zeiss Axiophot microscope. Some slides were also stained with picosirius red to look for the presence of collagen fibres [6].

### ***2.3 Immunocytochemistry***

Fibroblasts from the heart ventricles of 200-250 g male Sprague-Dawley rats were prepared as described previously [7]. The cells were used between passages 1 and 4. They were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 0.2% bovine serum albumin and 10% foetal bovine serum (FBS) until they reached confluence. They were then trypsinized and seeded in fibronectin-coated Lab-Tek chamber slides (Nalge Nunc Int., Rochester, NY) and grown until 70-80% confluence. They were then fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, plus 0.15 M NaCl, (PBS) and next solubilized in 0.2% Triton X-100 in PBS. After blocking non-specific

binding with PBS supplemented with 10% NGS, incubation with the primary antibodies (anti-Thy-1 and anti-caveolin-1 (PharMingen, San Diego, CA)) and with TRITC-phalloidine (Sigma-Aldrich) proceeded for 90 min in the same buffer. Secondary antibodies coupled to AlexaFluor 488 or to rhodamine (Molecular Probes, Eugene, OR) were used to detect the primary antibodies. Fluorescent images were obtained on a Zeiss laser confocal microscope (Axiovert 100M) and the Lasersharp software LSM 510 (Carl Zeiss Int., Germany).

#### ***2.4 Flow cytofluorometry***

Cardiac fibroblasts were trypsinized and incubated for 30 min with the primary antibodies (anti-Thy-1, anti- $\alpha$ 8, or isotype control IgG for non-specific binding) diluted in PBS. After washing and centrifugation, the cells were incubated for 30 min with the secondary antibodies labelled with AlexaFluor 488 or Cy5. Analysis was performed on a FACScalibur cytofluorometer (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

#### ***2.5 TGF- $\beta$ stimulation of cultured cardiac fibroblasts and Western blotting***

Cultured cardiac fibroblasts were trypsinized and plated in 6-well plates in culture medium for 24 h, after which the cells were fasted without FBS for 24 h. They were then stimulated with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml) for 24 and 48 h in culture medium without FBS. After stimulation, the cells were washed with PBS and harvested in 1mL TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) for quantitative real-time polymerase chain reaction (Q-PCR), in 100  $\mu$ l sodium dodecyl sulphate (SDS)-sample buffer, or trypsinized for flow cytometry.

For Western blotting, 15  $\mu$ l of each sample were separated on 4-12% Bis-Tris Criterion gel with XT MOPS buffer (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), then transferred onto nitrocellulose. Non-specific binding on membranes was blocked by TBT with 4% calf serum (CS) for 1 h. The membranes were

then incubated for 90 min in TBT and 2% CS in the presence of primary antibodies (1:200 for Thy-1, 1:2,000 for  $\alpha 8$  integrin, 1:1,000 for SM  $\alpha$ -actin (Sigma-Aldrich), and 1:400 for GAPDH (Abcam, Cambridge, MA)). After washing, the membranes were incubated for 1 h with the secondary antibodies (for Thy-1, SM  $\alpha$ -actin, and GAPDH: IRDye800- conjugated anti-mouse IgG (Rockland, Gilbertsville, PA); for  $\alpha 8$  integrin: peroxidase-coupled goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad Laboratories)). Thy-1, actin and GAPDH were visualized by the Odyssey system (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE), while  $\alpha 8$  integrin was detected by SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce Biotechnology).

### ***2.6 Q-PCR Thy-1 mRNA analysis***

Reverse transcription of mRNA and real-time PCR were carried out in a 2-step manner. First, total RNA was extracted from DOCA-salt and control rat cardiac tissue or from cardiac fibroblasts in culture, according to the TRIzol reagent protocol. About 5  $\mu$ g of mRNA were reverse transcribed in a final volume of 20  $\mu$ l containing 0.5  $\mu$ l oligo-(dT)12-18 primer (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l, Invitrogen), 1  $\mu$ l of 10 mM dNTP, 4  $\mu$ l FSB 5X buffer, 2  $\mu$ l of 0.1 M DTT and 1  $\mu$ l of 200 U/ $\mu$ l Maloney Murin Leukemia Virus reverse transcriptase (all from Invitrogen) for 1 h at 37°C. The reaction began by a denaturation step of 3 min at 65°C, and was stopped by heating at 95°C for 5 min. The gene expression of specific mRNA was then quantified by real-time PCR with the QuantiTect SYBR Green PCR kit (Qiagen, Mississauga, ON), where control groups served as calibrator and 16S rRNA as a normalizer. Single strand cDNA (4  $\mu$ l) was used for real-time PCR to amplify a 640-bp fragment of Thy-1 cDNA with the complementary antisense primer 5'-TTATGCCACCACACTTGACC-3' and the sense primer 5'-GACCCGAGAGAAGAAGAAGC-3'. The anti-sense primer for a 109-bp fragment of  $\alpha 8$  integrin was 5'-GGGACAGTAGTAGACAGC-3', and the sense primer was 5'-



GGACTTCTACATACCTGAT-3', as described previously [5]. For a 107-bp fragment of housekeeping gene ribosomal protein 16S cDNA, the antisense primer was 5'-GCTACCAGGGCCTTTGAGATG-3', and the sense primer was 5'-AGGAGCGATTTGCTGGTGTGG-3'.

### ***2.7 Lipid raft isolation***

A conventional detergent-free method was followed to isolate lipid rafts on a discontinuous sucrose gradient [8]. Cardiac fibroblasts from 2 15-cm dishes were collected in 1 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 11, with protease inhibitors, by scraping with a rubber policeman. The pooled cells were then sonicated 3 times for 30 s and mixed in a 14 x 89-mm Ultra-Clear centrifuge tube (Seton Scientific, Los Gatos, CA) with 2 ml of 85% sucrose in morpholine ethanesulfonic acid (MES)-buffered saline (25 mM MES, pH 6.5, 0.15 M NaCl). After 2-h rest on ice, successive layers of 6 ml of 30% sucrose and 2 ml of 5% sucrose in MES buffer were added. The tubes were then centrifuged for 18 h at 35,000 rpm in a Beckman SW-40 swinging bucket at 4°C. Finally, 1-ml fractions were collected from the bottom of the tubes with a peristaltic pump, assayed for protein quantification by the Micro Protein BCA Assay kit (Pierce Biotechnology) and analyzed by Western blotting.

Fractions containing lipid raft proteins were pooled and separated in 4 centrifugation tubes with 2 volumes of 0.5M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer. After 1-h centrifugation at 30,000 g, the pellets were mixed in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer containing different detergents (1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich), 60 mM n-octyl-β-D-glucopyranoside (Calbiochem, San Diego, CA), or 1% SDS, then centrifuged for 1 h at 30,000 g. The remaining pellets were finally mixed in 100 μl of SDS-sample buffer and boiled. The supernatant and pellets were analyzed by Western blotting with Thy-1, caveolin-1, and flotillin-1 (Pharmingen) antibodies.

### 3. Results

#### *3.1 Immunohistochemistry of rat hearts*

Thy-1 protein has already been described on fibroblasts originating from the lungs or and other tissues [9]. We wondered whether or not Thy-1 protein could also be present on cardiac fibroblasts. We first examined the distribution of Thy-1 on rat ventricular tissue slices by immunohistology with the OX7 monoclonal antibody. As seen in Fig. 1C, E, and H, immunostaining appeared on cells distributed between cardiac myocytes close to collagen fibrils (Fig. 1A). These cells were positive for  $\alpha 8\beta 1$  integrin (Fig. 1B, D, and G) and, thus, correspond to fibroblasts. However unlike  $\alpha 8$  integrin, Thy-1 was not expressed on VSMC, as illustrated in Fig. 1F and I.

We reported previously that the heart of DOCA-salt hypertensive rats is characterized by the presence of myofibroblasts, as detected by SM  $\alpha$ -actin and  $\alpha 8\beta 1$  integrin overexpression [5]. To determine whether Thy-1 is also a characteristic of differentiated fibroblasts, we examined, by immunohistochemistry of myocardial tissue sections, Thy-1 in fibrotic regions of the heart that were identified by accumulation of picosirius-stained collagen (Fig. 2A and F). Thy-1 protein was observed exactly in the same regions as  $\alpha 8\beta 1$  integrin (Fig. 2B and C), indicating either an increased number of cardiac fibroblasts or heightened expression of  $\alpha 8$  integrin in these portions of the heart. At higher magnification (Fig. 2D and E), the myocardial tissue was disorganized and filled with  $\alpha 8$  integrin-positive fibroblasts. All these cells were also Thy-1-positive. Further examination of the myocardial tissue revealed that collagen- and Thy-1-positive areas were also associated with inflammation, as detected by ED1 (CD68) macrophage marker.

These results indicate that  $\alpha 8$  integrin-positive interstitial fibroblasts in ventricular sections from control and DOCA-salt treated rats also expressed Thy-1 protein. In addition, enhanced staining intensity was detected in the heart of DOCA-salt animals, suggesting either increased synthesis or proliferation of fibroblasts.

### ***3.2 Q-PCR of Thy-1***

To determine whether the presence of Thy-1 in the hypertrophied heart was due to gene overtranscription or to a decrease of mRNA degradation, the gene expression of specific mRNA was then quantified by Q-PCR with a QuantiTect SYBR Green PCR kit. Thy-1 expression in both control and DOCA-salt rat ventricles was examined. DOCA-salt hearts were found to express 6- to 7-fold more Thy-1 than the control group, as depicted in Fig. 3.  $\alpha 8$  integrin sub-unit expression was also quantified. It was 3-fold more elevated in the treated group than in the control group. This means that Thy-1 expression is regulated at the level of gene expression and is more elevated in hypertensive than in normotensive animals.

### ***3.3 Thy-1 expression on cultured cardiac fibroblasts***

We also evaluated whether or not Thy-1 protein was detectable on cultured cardiac fibroblasts. For this purpose, we used flow cytometry and immunocytochemistry. Flow cytometry of cardiac fibroblasts revealed that the cells were positive for  $\alpha 8$  integrin and Thy-1 (Fig. 4A). The cardiac fibroblast population appeared to be homogeneous, the majority of cells expressing high levels of both antigens, as observed in the double fluorescence plot.

Thy-1 on cardiac fibroblasts was also visualized by immunocytochemistry (Fig. 4B and C). Thy-1 appeared as diffused small dots distributed at the surface of most cells. It did not co-localize with actin filaments or with caveolin-1.

### ***3.4 Lipid raft localization of Thy-1***

Previous studies have demonstrated Thy-1 localization in lipid rafts of rat lung fibroblasts [10]. Lipid rafts are cholesterol-rich domains in cellular membranes and contain many signaling and adhesion proteins. We wondered whether or not Thy-1 protein was also present in the lipid rafts of cardiac

fibroblasts. Consequently, lipid rafts were isolated by sucrose gradient, and the collected fractions were analyzed by Western blotting for caveolin-1, a known lipid raft marker, and Thy-1. As illustrated in Fig. 5A, the lightest fractions were enriched in caveolin-1 and Thy-1.

Lipid rafts are usually partially resistant to detergent solubilization [11]. Thy-1-positive fractions (fractions 9 to 11) of the sucrose gradient were pooled and centrifuged to sediment the rafts. The pellet was then submitted to different detergents for 30 min at room temperature and centrifuged again to estimate the percentage of solubilization by Western blotting (Fig. 5B). Compared to caveolin-1 and flotillin-1, another lipid raft marker, Thy-1 manifested a different pattern of solubilization in the presence of 1% Triton X-100 and 60 mM octyl-glucopyranoside.

These data, as well as the immunocytochemistry results (Fig. 4C), suggest that Thy-1 may be localized in lipid rafts, but on different membrane microdomains than those containing caveolin-1 and flotillin-1.

### ***3.5 TGF- $\beta$ stimulation of cardiac fibroblasts***

A major characteristic of cardiac fibroblasts is their ability to differentiate into myofibroblasts [1]. Myofibroblasts being a major determinant of cardiac fibrosis, and Thy-1 expression being increased in the myocardium of DOCA-salt-treated rats, we wondered which signal could lead to that overexpression. Cultured cardiac fibroblasts were thus stimulated in the presence of 10 ng/ml TGF- $\beta$ , this cytokine being recognized as a potent fibroblast differentiation agent [4,12]. After 48-h incubation, the differentiation process was examined by Western blot analysis of SM  $\alpha$ -actin and  $\alpha$ 8 integrin subunit (Fig. 6A). As expected, TGF- $\beta$  doubled the expression of the  $\alpha$ 8 subunit and SM  $\alpha$ -actin. However, no difference was observed for Thy-1.

To further confirm the lack of effect of TGF- $\beta$  on Thy-1 expression, the cells were submitted to the cytokine for 24 and 48 h, and Thy-1 expression was quantified by cytofluorometry as mean peak fluorescence (see Fig. 4A).

As shown in Fig. 6B, no difference between control and TGF- $\beta$ -stimulated fibroblasts was observed for both periods of incubation.

These results indicate that Thy-1 expression was independent of the expression of the contractile phenotype of myofibroblasts. Furthermore, this means that the increased Thy-1 staining in the heart of the experimental animals may not correspond to the presence of myofibroblasts but rather to enhanced fibroblast proliferation.

#### 4. Discussion

In this study, we found that Thy-1 protein was expressed in the ventricular myocardium. Its presence was associated with  $\alpha 8$  integrin-positive cells, indicating its localization on cardiac fibroblasts. In addition, Thy-1 was also detected by flow cytometry, immunocytochemistry, and Western blotting on cultured cardiac fibroblasts. To our knowledge, this report is the first one to document the presence of Thy-1 on cardiac fibroblasts. Thy-1 (or CD90) is a small glycoprotein ( $\approx 25$ -30 kDa) localized at the surface of cells [13]. Thy-1 is expressed on several cell types: thymocytes, T-lymphocytes, bone marrow stem cells, neuronal cells, glomerular mesangial cells as well as fibroblasts of different origins. Thy-1 expression on fibroblasts appears to be variable and seems to reflect the heterogeneity of this cell population [14]. Indeed, several groups have been able to isolate Thy-1-positive (Thy-1<sup>+</sup>) and Thy-1-negative (Thy-1<sup>-</sup>) fibroblasts principally from the lungs [9,14], and this heterogeneity seems to differently affect their morphological, proliferative, and synthetic characteristics [15]. Interestingly, the Thy-1<sup>+</sup> lung fibroblast phenotype exhibits profibrogenic properties with enhanced collagen deposition [16]. Our attempts to segregate cardiac fibroblasts by cell sorting into Thy-1<sup>+</sup> and Thy-1<sup>-</sup> cells failed. Every cardiac fibroblast was Thy-1<sup>+</sup>, although at diverse degrees (see Fig. 4A where Thy-1 labeling was spread over a 2-log scale), and we were unable to isolate Thy-1<sup>-</sup> cells. Unlike lung fibroblasts, cardiac fibroblasts form an homogeneous population with only Thy-1<sup>+</sup> cells.

In an experimental model of cardiac fibrosis, DOCA-salt hypertensive rats, we examined the intensity of Thy-1 staining in the myocardium and compared it with  $\alpha 8$  integrin and collagen. Thy-1 staining was increased throughout the tissue, but more particularly in areas of fibrosis, in close association with  $\alpha 8$  integrin expression and cardiac fibroblasts. Thy-1 synthesis was upregulated, as confirmed by Q-PCR expression. Differentiation of fibroblasts into myofibroblasts being a hallmark of cardiac fibrosis [17], Thy-1 may thus reflect the presence of myofibroblasts in fibrotic areas. However, this

in contradiction with some of our results showing that cardiac fibroblast stimulation by TGF- $\beta$ , a factor responsible for the fibrotic process [18], did not alter the level of Thy-1 expression. Thy-1 appears to be a relatively stable protein independent of phenotype differentiation into myofibroblasts by TGF- $\beta$ . A recent report by Zhou et al. disclosed that Thy-1<sup>+</sup> lung fibroblasts are resistant to cytokine stimulation [19]. Increased staining intensity, as observed in the heart of hypertensive rats, may rather reflect fibroblast proliferation. Proliferation of fibroblasts during cardiac hypertrophy is a major mechanism contributing to the development of fibrosis, and fibroblasts accumulate in fibrotic and scarred areas [20]. However, it is still possible that microenvironment conditions prevailing inside the tissue, which cannot be reproduced *in vitro*, locally affect Thy-1 expression. Another possibility is the clear association of inflammation with reactive fibrosis, as observed in Fig. 2H. Although a macrophage antibody (ED1) was used to detect leukocyte infiltration, this area may also contain other leukocytes or bone marrow-derived fibroblasts that are Thy-1<sup>+</sup> [21,22].

Thy-1 is a membrane protein that is anchored through a glycosylphosphatidylinositol (GPI) tail [13]. A previous study has shown that Thy-1 was localized in lipid rafts of T-lymphocytes [23]. We pondered whether Thy-1 on cardiac fibroblasts was also present in the same structure. By using a conventional sucrose gradient to isolate lipid rafts, we observed that Thy-1 was fractionated with caveolin-1, a typical lipid raft protein. However, further treatment of these fractions with different detergents revealed that Thy-1 solubilization did not behave exactly like caveolin-1 and flotillin-1, suggesting that they may not co-exist in a close environment. Indeed, this was also confirmed by immunocytochemistry (see Fig. 4C). Recent results, reviewed by Pike [24], indicate that rafts are heterogeneous and may differ in lipid and protein composition. Caveolin-1 is an important component for the formation and stabilization of caveolae [25], whereas flotillin-1 is detected in reggie clusters [26]. But this does not mean that both proteins are present in all lipid

microdomains [27]. Clearly, further studies are needed to define exactly where Thy-1 is located at the cell surface.

Although Thy-1 appears to be highly expressed in cardiac fibroblasts, its cellular function remains elusive. Its amino acid structure, which is made up of a single Ig-like variable domain, suggests that Thy-1 acts as a cell adhesion molecule. Some results indicate that Thy-1 can interact with certain integrins, namely  $\alpha M\beta 2$ ,  $\alpha X\beta 2$ , and  $\alpha v\beta 3$  [28-30], but so far, no definitive ligand or counterreceptor has been identified. Thy-1 activation with antibodies is linked to several kinases and phospholipases as well as to the TCR/CD3 complex, and results in T-lymphocyte stimulation [21]. In addition, lipids rafts, in which are embedded GPI-anchored proteins, like Thy-1, are often the sites of formation of receptor-adhesion complexes [31]. The fact that Thy-1<sup>+</sup> and Thy-1<sup>-</sup> lung fibroblasts behave differently suggests that this protein may have a functional role. Whether or not Thy-1 can demonstrate a specific action in cardiac fibroblasts remains to be elucidated.

In summary our results demonstrate that Thy-1 is a marker of cardiac fibroblasts, irrespective of their specific phenotype. Its stronger expression at sites that are ED1-positive and its possible interactions with integrins, like  $\alpha M\beta 2$  and  $\alpha X\beta 2$ , that are expressed on several leukocyte types, suggest that Thy-1 may participate in the local inflammatory process.



## **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research, the Heart and Stroke Foundation of Canada, and the Natural Sciences and Engineering Research Council to G.T.

## Figure Legends

**Figure 1.** Immunohistochemical analysis of Thy-1 in control rat heart. Serial ventricular tissue sections were stained for collagen (A),  $\alpha 8$  integrin subunit (B, D, F, and G), and Thy-1 (C, E H, and I). The same scale bar applies for A, B, and C; for D, E, G, and H; and for F and I.

**Figure 2.** Immunohistochemical analysis of Thy-1 in DOCA-salt rat heart. Serial ventricular tissue sections were stained for collagen (A, F),  $\alpha 8$  integrin subunit (B, D), Thy-1 (C, E, and G), and ED1 (H). D and E are higher magnification of the insets in B and C respectively. The same scale bar applies for A, B, C, F, G, and H; and for D and E.

**Figure 3.** Q-PCR of Thy-1 and  $\alpha 8$  integrin mRNA. Specific mRNAs were quantitated by Q-PCR. The results are standardized to 16S rRNA. n=6-7.\* p<0.05 by Student's t-test.

**Figure 4.** Analysis of Thy-1 on cultured cardiac fibroblasts. Cardiac fibroblasts were incubated with anti-Thy-1 and anti- $\alpha 8$  integrin and analyzed by flow cytometry (A). Blue curves indicate non-specific binding. Cardiac fibroblasts were also examined by immunocytochemistry with anti-Thy-1 (green) and TRITC-phalloidine (red) (B) and with anti-Thy-1 (green) and anti-caveolin-1 (red) (C). The same scale bar applies for B and C.

**Figure 5.** Lipid rafts and Thy-1 localization. Lipid rafts were isolated by a discontinuous sucrose gradient, and fractions, numbered from the bottom of the tube, were analyzed by Western blotting for Thy-1 and caveolin-1 (A). Isolated lipid rafts were sedimented and solubilized without detergent (none) or with 1% Triton X-100 (Triton), 1% SDS (SDS), and 60 mM octylglucopyranoside (OctGluc). Protein solubilization was assessed by Western blotting (B).

**Figure 6.** TGF- $\beta$  stimulation of cardiac fibroblasts. Cultured cardiac fibroblasts were stimulated for 48 h with 10 ng/ml TGF- $\beta$  and Thy-1,  $\alpha 8$  integrin subunit, SM  $\alpha$ -actin, and GAPDH were analyzed by Western blotting. n=4-5. \* p<0.05 by Student's t-test. (A) Alternatively, samples from 24 and 48 h after TGF- $\beta$  stimulation were analyzed by flow cytometry for Thy-1 (B).

## References

- [1] Camelliti P, Borg TK, Kohl P. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 2005;65:40-51.
- [2] Goldsmith EC, Hoffman A, Morales MO, Potts JD, Price RL, McFadden A, et al. Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn* 2004;230:787-94.
- [3] Bouzeghrane F, Mercure C, Reudelhuber TL, Thibault G.  $\alpha_8\beta_1$  integrin is upregulated in myofibroblasts of fibrotic and scarring myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:343-53.
- [4] Thibault G, Lacombe MJ, Schnapp LM, Lacasse A, Bouzeghrane F, Lapalme G. Upregulation of  $\alpha_8\beta_1$ -integrin in cardiac fibroblasts by angiotensin II and transforming growth factor- $\beta_1$ . *Am J Physiol* 2001;281:C1457-C1467.
- [5] Bouzeghrane F, Reinhardt DP, Reudelhuber T, Thibault G. Enhanced expression of fibrillin-1, a constituent of the myocardial extracellular matrix, in fibrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H982-H991.
- [6] Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 1979;11:447-55.

- [7] Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G. Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  modulation. *Circ Res* 1996;78:302-11.
- [8] Song KS, Li S, Okamoto T, Quilliam LA, Sargiacomo M, Lisanti MP. Co-purification and direct interaction of Ras with caveolin, an integral membrane protein of caveolae microdomains. Detergent-free purification of caveolae microdomains. *J Biol Chem* 1996;271:9690-7.
- [9] Phipps RP, Borrello MA, Blieden TM. Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodontal Res* 1997;32:159-65.
- [10] Barker TH, Pallero MA, MacEwen MW, Tilden SG, Woods A, Murphy-Ullrich JE, et al. Thrombospondin-1-induced focal adhesion disassembly in fibroblasts requires Thy-1 surface expression, lipid raft integrity, and src activation. *J Biol Chem* 2004;279:23510-6.
- [11] Lichtenberg D, Goni FM, Heerklotz H. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem Sci* 2005;30:430-6.
- [12] Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor- $\beta_1$  during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension* 2002;39:258-63.
- [13] Zucchini A, Del Zotto G, Brando B, Canonico B. CD90. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001;15:82-5.

- [14] Fries KM, Blieden T, Looney RJ, Sempowski GD, Silvera MR, Willis RA, et al. Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994;72:283-92.
- [15] Kaufman J, Graf BA, Leung EC, Pollock SJ, Koumas L, Reddy SY, et al. Fibroblasts as sentinel cells: role of the CD40-CD40 ligand system in fibroblast activation and lung inflammation and fibrosis. *Chest* 2001;120:53S-5S.
- [16] Derdak S, Penney DP, Keng P, Felch ME, Brown D, Phipps RP. Differential collagen and fibronectin production by Thy 1+ and Thy 1- lung fibroblast subpopulations. *Am J Physiol* 1992;263:L283-L290.
- [17] Baudino T, Carver W, Giles WR, Borg TK. Cardiac Fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;In Press.
- [18] Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor- $\beta$ 1. *Mol Gen Metab* 2000;71:418-35.
- [19] Zhou Y, Hagoood JS, Murphy-Ullrich JE. Thy-1 expression regulates the ability of rat lung fibroblasts to activate transforming growth factor-beta in response to fibrogenic stimuli. *Am J Pathol* 2004;165:659-69.
- [20] deBlois D, Tea BS, Beaudry D, Hamet P. Regulation of therapeutic apoptosis: a potential target in controlling hypertensive organ damage. *Can J Physiol Pharmacol* 2005;83:29-41.

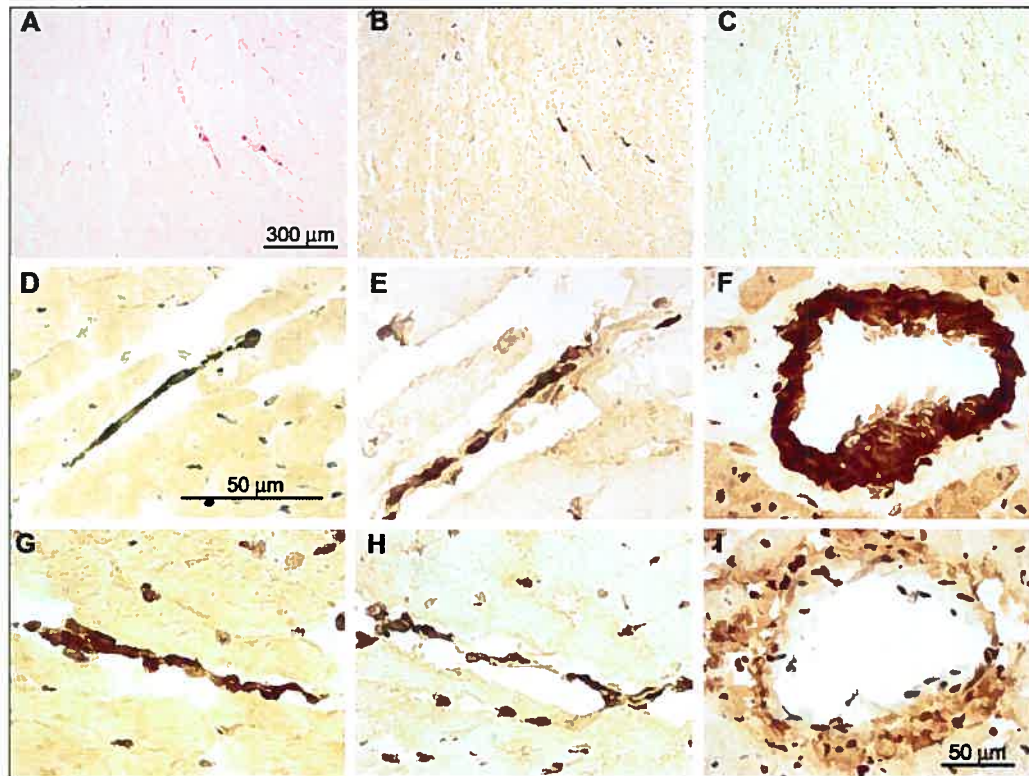
- [21] Haeryfar SM, Hoskin DW. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J Immunol* 2004;173:3581-8.
- [22] Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, et al. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells* 2005;23:699-706.
- [23] Drevot P, Langlet C, Guo XJ, Bernard AM, Colard O, Chauvin JP, et al. TCR signal initiation machinery is pre-assembled and activated in a subset of membrane rafts. *EMBO J* 2002;21:1899-908.
- [24] Pike LJ. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* 2004;378:281-92.
- [25] Parton RG, Richards AA. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic* 2003;4:724-38.
- [26] Langhorst MF, Reuter A, Stuermer CA. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:2228-40.
- [27] Li XA, Everson WV, Smart EJ. Caveolae, lipid rafts, and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15:92-6.
- [28] Leyton L, Schneider P, Labra CV, Ruegg C, Hetz CA, Quest AF, et al. Thy-1 binds to integrin beta(3) on astrocytes and triggers formation of focal contact sites. *Curr Biol* 2001;11:1028-38.

- [29] Choi J, Leyton L, Nham SU. Characterization of alphaX I-domain binding to Thy-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:557-61.
- [30] Wetzel A, Chavakis T, Preissner KT, Sticherling M, Haustein UF, Anderegg U, et al. Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Immunol* 2004;172:3850-9.
- [31] Harris TJ, Siu CH. Reciprocal raft-receptor interactions and the assembly of adhesion complexes. *Bioessays* 2002;24:996-1003.

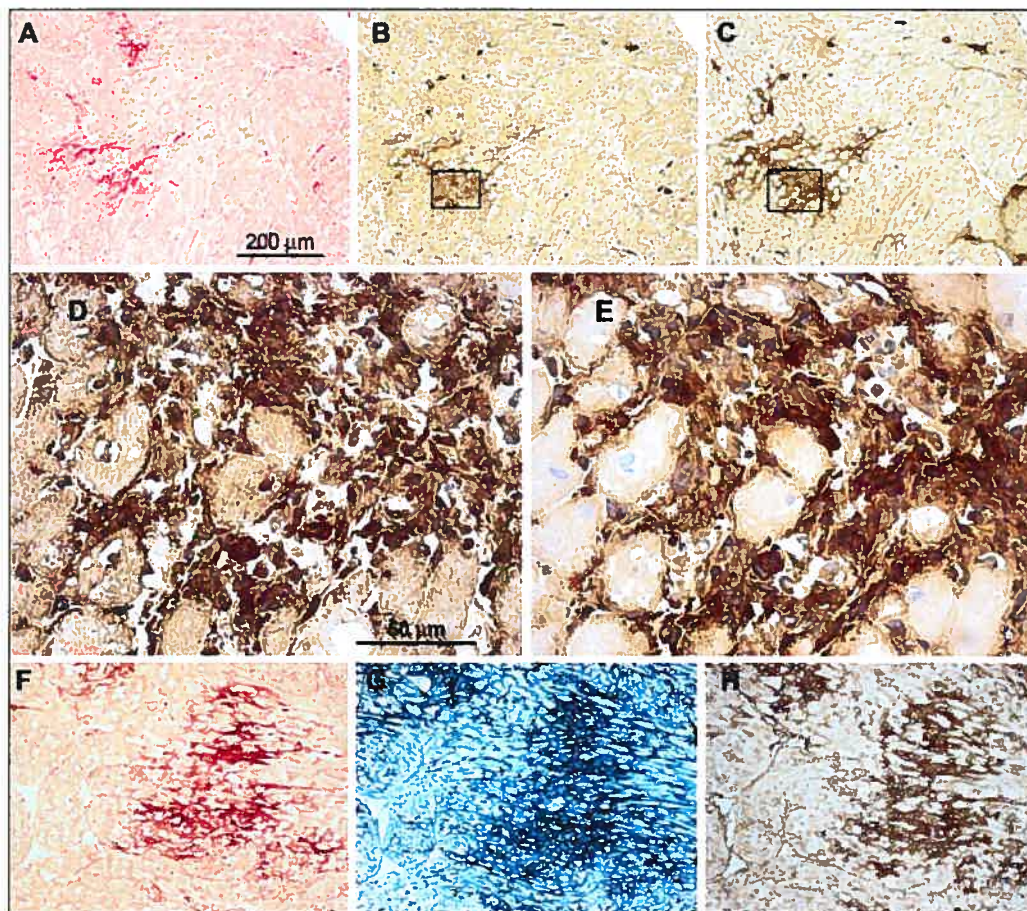


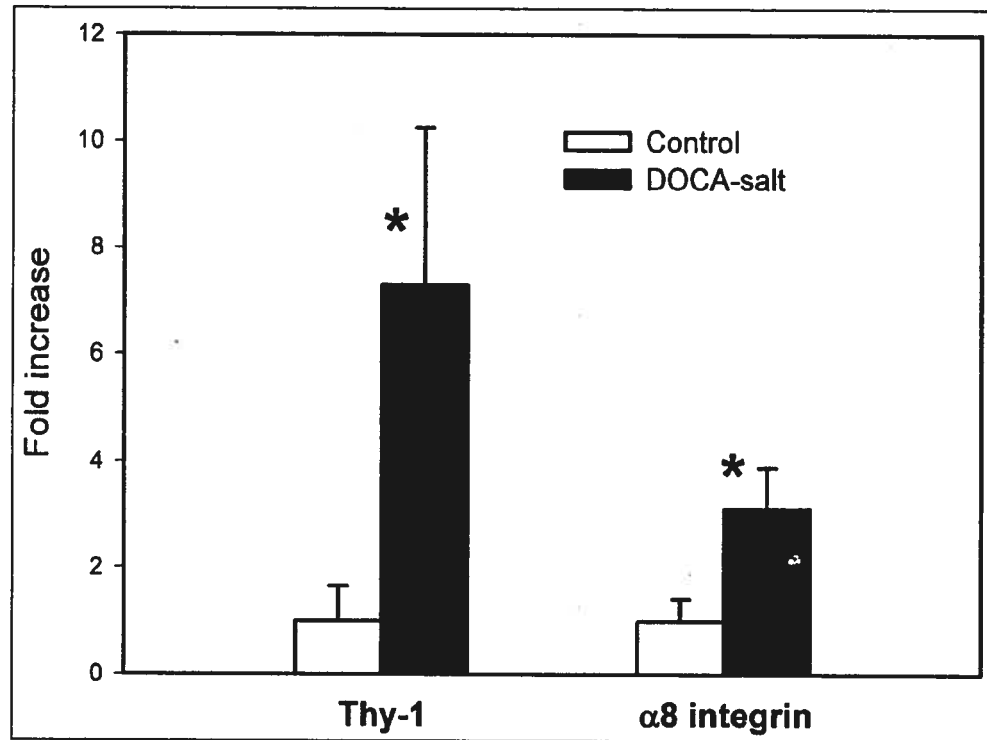
## Figures

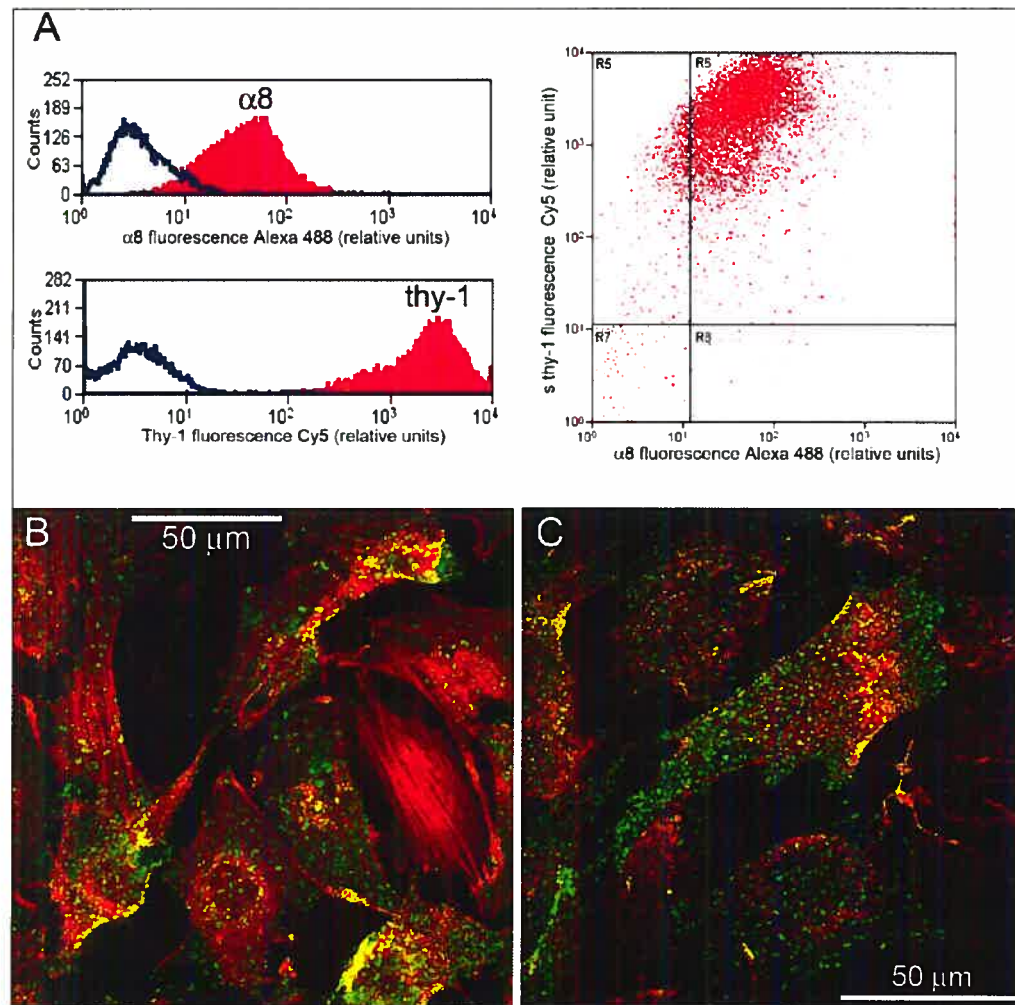
**Figure 1:** Immunohistochemical analysis of Thy-1 in control rat heart

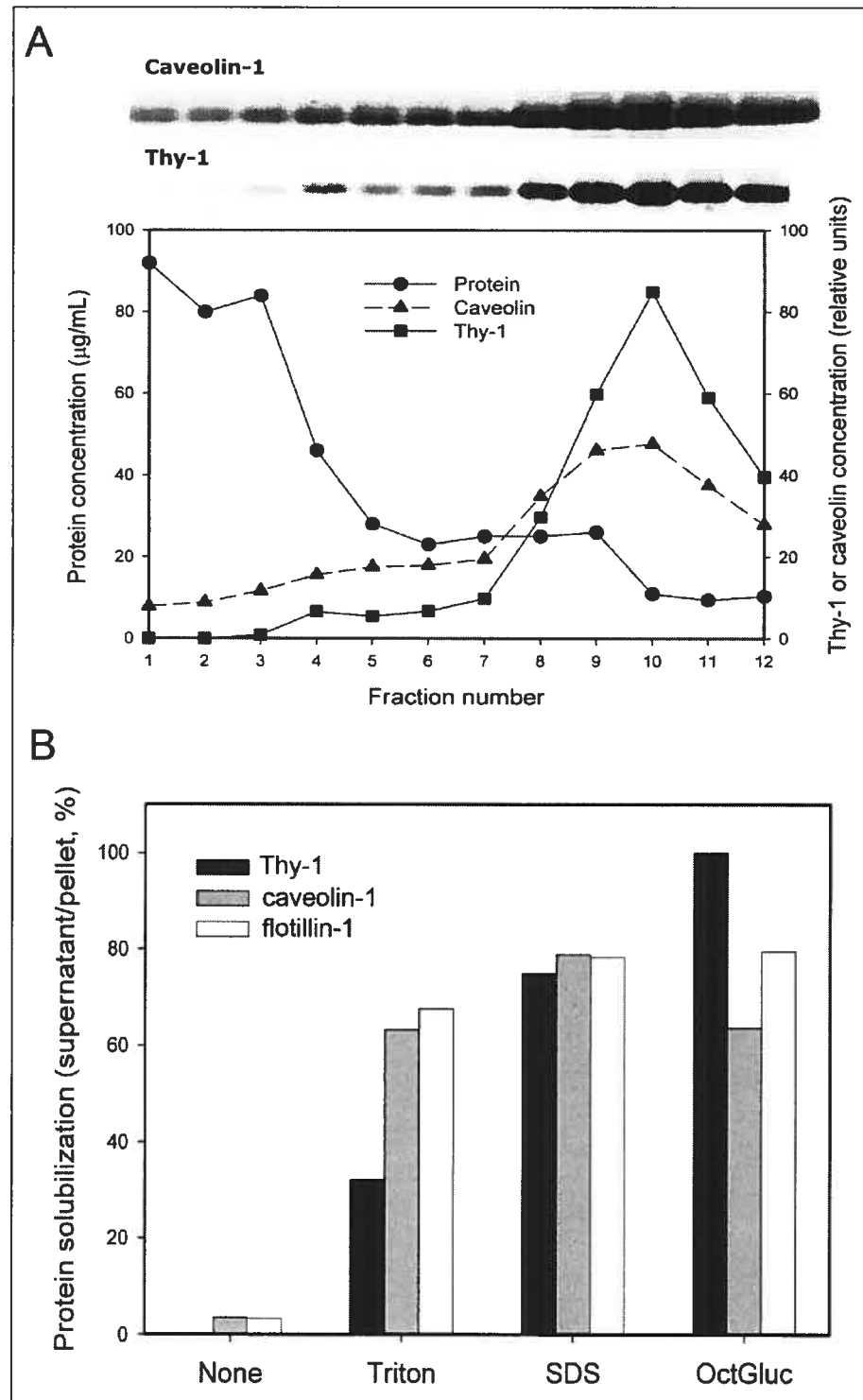


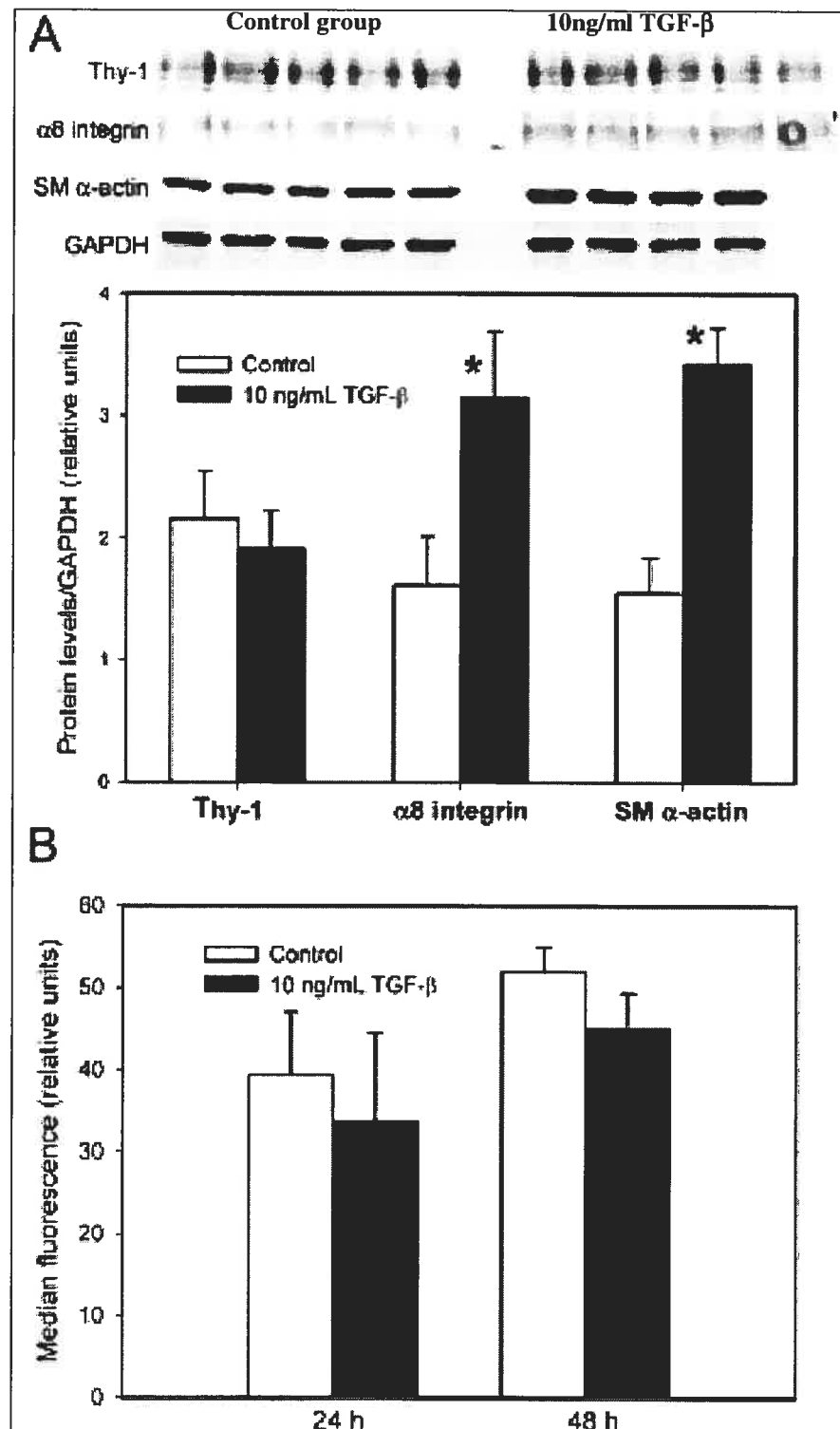
**Figure 2:** Immunohistochemical analysis of Thy-1 in DOCA-salt rat heart



**Figure 3: Q-PCR of Thy-1 and  $\alpha 8$  integrin mRNA**

**Figure 4:** Analysis of Thy-1 on cultured cardiac fibroblasts

**Figure 5: Lipid rafts and Thy-1 localization**

**Figure 6: TGF- $\beta$  stimulation of cardiac fibroblasts**

## **4. RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES**

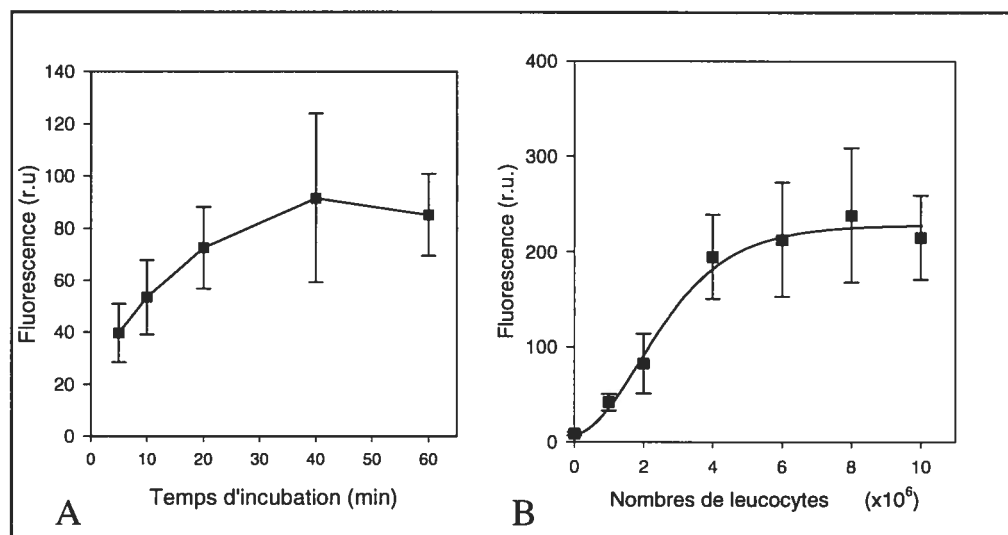
### **4.1. Implication potentielle de Thy-1 dans le recrutement de cellules inflammatoires**

Notre hypothèse de départ étant que la protéine Thy-1 agissait en tant que molécule d'adhésion lors du recrutement de cellules inflammatoires, nous avons aussi poursuivi une étude parallèle visant à explorer cette éventualité. De plus, cette hypothèse supposait une interaction de Thy-1 avec un ligand potentiel présent sur les diverses cellules inflammatoires. Les résultats obtenus jusqu'à présent n'ont malheureusement pas permis de conclure avec certitude que Thy-1 était effectivement impliquée lors de l'inflammation, bien qu'ils n'excluent pas non plus cette possibilité. Plusieurs essais d'adhésion cellulaire et de compétition dans l'adhésion ont donc été effectués entre des fibroblastes cardiaques en culture et des cellules mononuclées ou granulocytes de rat fraîchement récoltés, de même que la cytométrie en flux a été utilisée afin d'évaluer la liaison de GST-Thy-1 à la surface des leucocytes.

Suite à une incubation des leucocytes avec de la calcéine-AM et à un lavage subséquent, il est possible d'évaluer le nombre de cellules adhérant à une monocouche de fibroblastes cardiaques en culture. La molécule de calcéine-AM, non fluorescente, est capable de traverser les membranes plasmiques et de pénétrer dans le cytoplasme cellulaire où les estérases peuvent cliver la portion AM.<sup>102</sup> Ce clivage libère la calcéine, un fluorochrome incapable de traverser les membranes et émettant une fluorescence verte en réponse à une excitation par un laser. L'intensité de cette fluorescence est alors proportionnelle à la quantité de leucocytes adhérents aux fibroblastes cardiaques et peut être mesurée par un fluorimètre à la suite d'une lyse cellulaire par ajout de SDS. La figure 1, par exemple, illustre l'adhésion des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs pour *peripheral blood mononuclear cells*). Le panneau de gauche (figure 1A) montre clairement une augmentation de la fluorescence, et donc de l'adhésion cellulaire, en fonction du temps

d'incubation des PBMC avec les fibroblastes. De son côté, le panneau de droite (figure 1B) montre que cette adhésion augmente aussi avec le nombre de PBMCs utilisées. L'adhésion cellulaire entre ces leucocytes particuliers et les fibroblastes cardiaques en culture est donc dépendante du temps et du nombre de cellules.

**Figure 1 :** Adhésion des PBMCs sur des fibroblastes cardiaques en culture



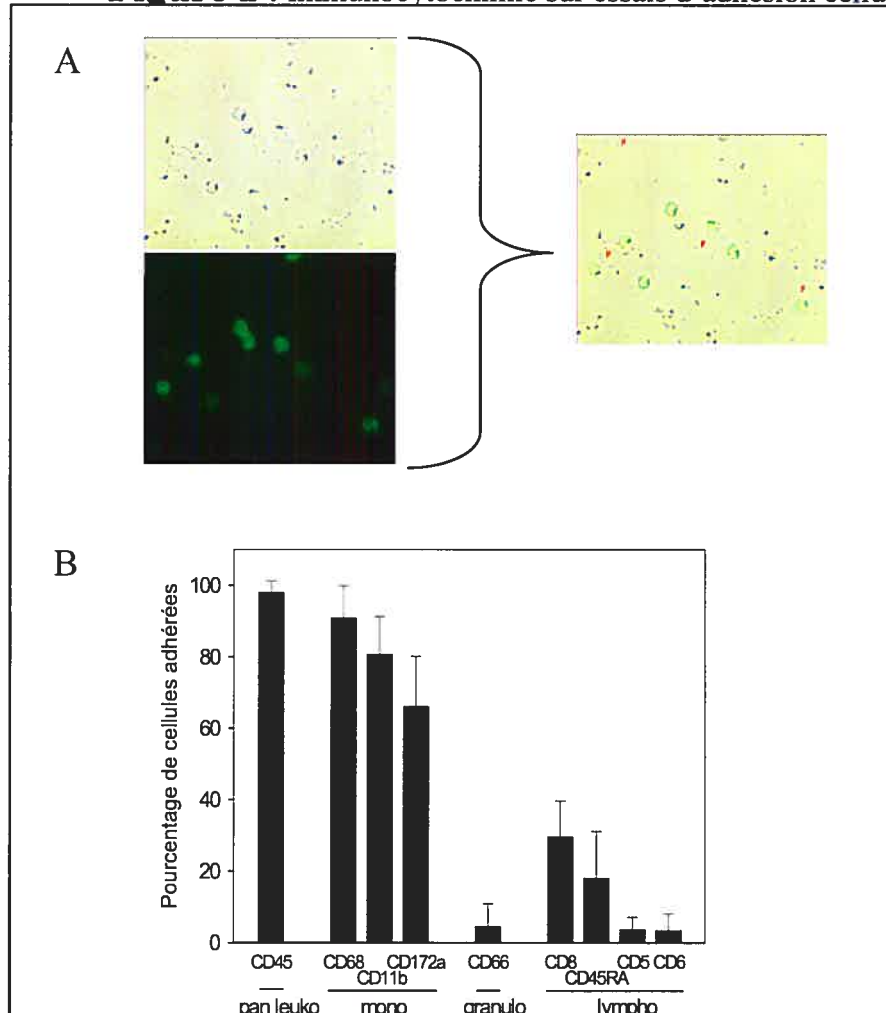
A → Adhésion des PBMCs sur des fibroblastes cardiaques en culture en fonction du temps d'incubation;

B → Adhésion des PBMCs sur des fibroblastes cardiaques en culture en fonction du nombre de PBMCs.

La fraction de PBMCs récoltée dans le sang de rat étant constituée de monocytes et de lymphocytes, il était nécessaire de déterminer quels types cellulaires adhéraient ainsi aux fibroblastes cardiaques. Par conséquent, les mêmes essais d'adhésion cellulaire ont été pratiqués sur des lames de microscope enduites de fibronectine (afin de permettre l'adhésion des fibroblastes cardiaques au verre des lames), dans des chambres de types Lab-Tek. Ces lames étaient ensuite utilisées en immunocytochimie selon un



protocole semblable à celui exposé dans la contribution originale. Les anticorps primaires utilisés ont été choisis pour leur spécificité à des marqueurs des différents leucocytes : CD45 pour tous les leucocytes; CD68, CD11b et CD172a pour les monocytes; CD66 et CD11b pour les granulocytes; CD8, CD5, CD6 et CD45RA pour les lymphocytes. Les anticorps secondaires, fluorescents puisque couplés à l'AlexaFluor 488, étaient de type anti-lapin ou anti-souris. La figure 2A expose à gauche les images prises en microscopie par contraste de phase (en haut) et en fluorescence (en bas), ainsi que la superposition des deux (à droite). Le comptage méthodique des cellules marquées ou non a alors été effectué et les résultats sont résumés à la figure 2B. On y remarque que les monocytes constituent la très grande majorité des cellules adhérentes contenues dans la fraction des PBMCs. Celle-ci ne contenant pratiquement pas de granulocytes, il est normal d'en trouver très peu adhérents aux fibroblastes cardiaques. L'immunocytochimie a aussi démontré l'adhésion des granulocytes aux fibroblastes cardiaques en culture (résultats non inclus).

**Figure 2 : Immunocytochimie sur essais d'adhésion cellulaire**

**A** → Images prises au microscope à contraste de phase (en haut) et à fluorescence (en bas), de même que leur superposition (à droite);

**B** → Pourcentage des cellules contenues dans la fraction des PBMCs et adhérant aux fibroblastes cardiaques en culture.

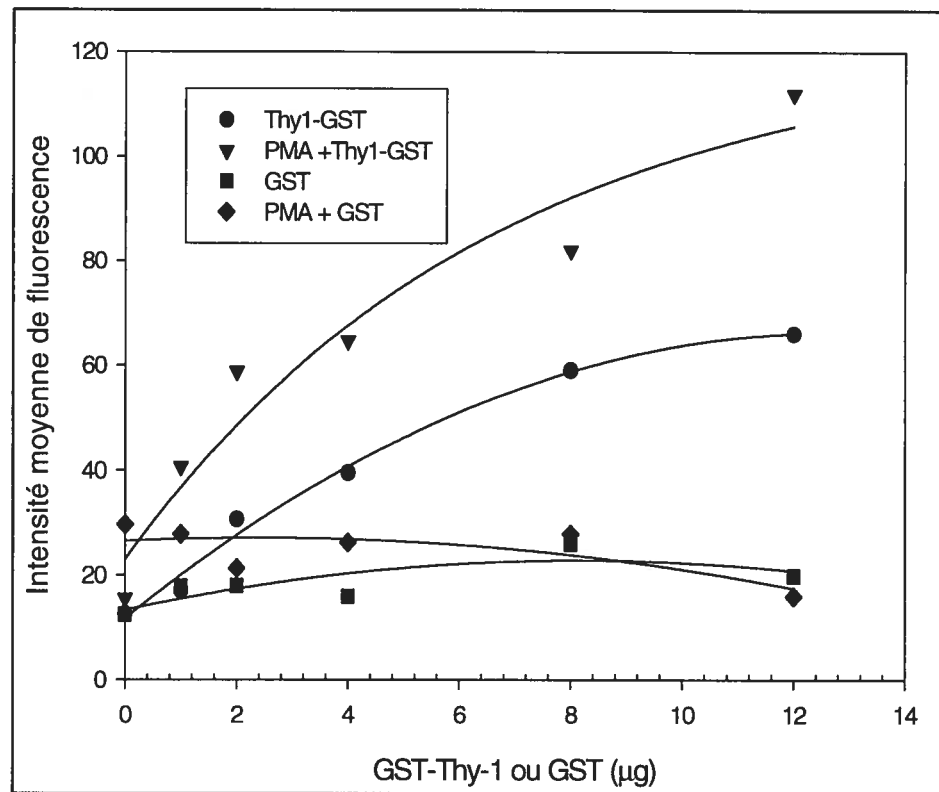
Abréviations : Pan leuko pour tous les leucocytes, mono pour monocytes, granulo pour granulocytes et lympho pour lymphocytes.

Des essais de liaison de Thy-1 sur les granulocytes ont aussi été réalisés afin de confirmer ou non son implication dans le recrutement de certains leucocytes. Pour ce faire, du GST-Thy-1 recombinant (GST pour *glutathione S-*

*transferase*) a par conséquent été produit par la transformation de bactéries *E. coli* de type BL21 avec un vecteur pGEX contenant le gène de Thy-1 de rat. La protéine recombinante résultante a été obtenue par une sonication des culots bactériens dans un tampon de PBS (0.5% triton, 50µg/ml RNaseA, 25µg/ml DNase I, 5mM MgCl<sub>2</sub> et 200µg/ml de lysozyme), suivie d'une centrifugation. Les surnageants récoltés étaient ensuite incubés 12 heures à 4°C dans une colonne de sépharose couplé à du glutathione afin d'en extraire et d'en purifier le GST-Thy-1. Celui-ci était alors incubé en présence de granulocytes stimulés ou non au PMA (pour *phorbol 12-myristate 13-acetate*). La stimulation des granulocytes au PMA servait à mimer l'activation cellulaire associée à l'inflammation, via la stimulation de la protéine kinase C (PKC).<sup>103</sup> Un contrôle négatif composé d'un segment GST seulement a été utilisé dans le but de s'assurer que la liaison de la protéine recombinante n'était pas due à sa portion GST.

Suite à l'incubation des cellules avec le GST-Thy-1 ou le GST ainsi que le PMA (pour certains groupes), les cellules étaient lavées et incubées en présence d'un anticorps primaire anti-GST, relavées et incubées enfin avec un anticorps secondaire de type AlexaFluor 488. La cytométrie en flux des cellules ainsi traitées nous a permis de constater que la liaison de Thy-1 aux granulocytes était proportionnelle à la quantité de GST-Thy-1 incubée avec les cellules (voir la figure 3). De plus, cette liaison augmente de 30 à 50% avec la stimulation des granulocytes au PMA. Une fois encore, des résultats semblables ont été obtenus avec les cellules mononuclées.

**Figure 3** : Liaison de GST-Thy-1 aux granulocytes



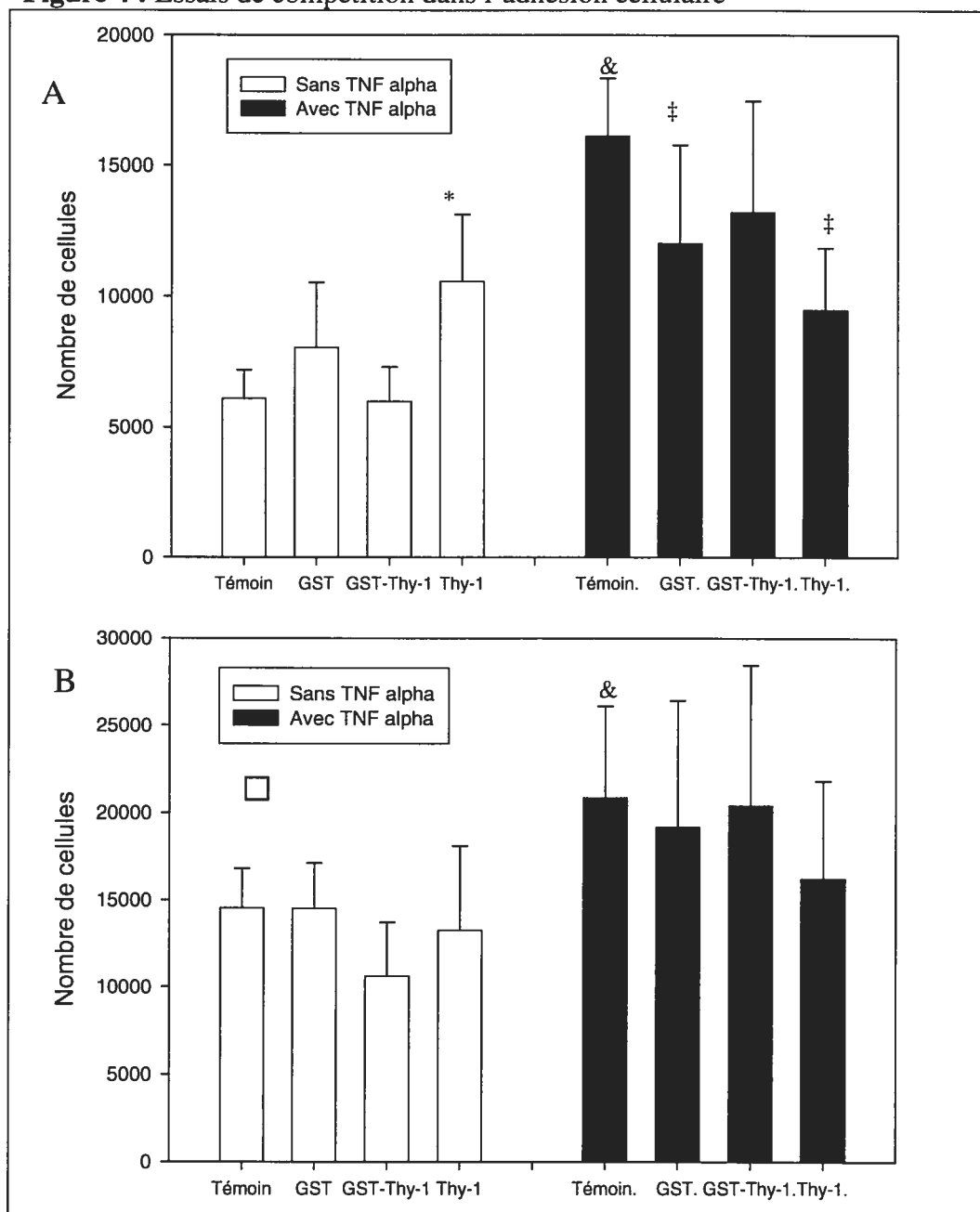
Liaison de la protéine GST-Thy-1 sur des granulocytes en fonction de sa concentration et de la présence de PMA. Du GST seul est utilisé comme contrôle négatif.

Enfin, nous avons tenté de bloquer l'adhésion cellulaire entre des granulocytes et des fibroblastes cardiaques en culture, à l'aide de la protéine recombinante GST-Thy-1 et de la protéine Thy-1 purifiée directement de cellules Rat1. Cette dernière a été obtenue par la méthode modifiée de Saalbach (1998)<sup>104</sup> : des cellules Rat1 sont soniquées dans un tampon de PBS (25mM EDTA et anti-protéases), avant d'être centrifugées, puis le surnageant résultant est incubé 12 heures à 4°C dans une colonne de sépharose couplée à l'anticorps OX7 anti-Thy-1. Le Thy-1 qui y est lié est ensuite élué par du triéthanolamine 0.2M avant d'être concentré par ultracentrifugation à l'aide d'Amicon Ultra retenant les protéines de plus de 10 000 daltons (Millipore, Mississauga, Ontario). En utilisant 5µg de GST-Thy-1 et de GST (comme contrôle négatif),

de même que l'équivalent du Thy-1 de 30 000 cellules, nous avons alors pu faire des essais de compétition dans l'adhésion cellulaire entre des granulocytes stimulés ou non au PMA et des fibroblastes cardiaques en culture stimulés ou non au TNF- $\alpha$ . Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire capable d'induire une prolifération modérée des fibroblastes pulmonaires lorsqu'elle est présente en faible concentration.<sup>105</sup> De plus, elle stimule la production de protéines de la MEC comme le collagène I et la fibronectine, ce qui en fait par conséquent un stimulus pro-fibrotique de référence pour l'étude de l'inflammation associée à la fibrose cardiaque.

Grâce au traitement des leucocytes à la calcéine-AM, nous avons donc pu effectuer des essais de compétition dans l'adhésion cellulaire entre les fibroblastes cardiaques en culture et les granulocytes. On remarque d'abord, dans la figure 4, que l'ajout de PMA ou de TNF- $\alpha$  augmente fortement l'adhésion entre ces deux types cellulaires. Étonnamment, dans l'essai sans PMA (figure 4A), nous avons constaté une augmentation significative de l'adhésion cellulaire en présence du Thy-1 de cellules Rat1. Cette augmentation, que l'on ne retrouve pas dans l'essai avec PMA (figure 4B), ne possède aucun fondement logique et est due probablement à une variation de l'adhésion cellulaire ponctuelle mais prononcée lors des essais. Cette protéine aurait dû, de même que le GST-Thy-1, diminuer l'adhésion cellulaire ou, du moins, ne pas avoir d'effet du tout si elle n'est pas impliquée dans ce phénomène. Parallèlement, uniquement dans l'essai sans PMA mais avec TNF- $\alpha$ , nous avons observé une diminution significative de l'adhésion cellulaire lors de l'ajout de Thy-1 ou de GST mais pas de la protéine recombinante GST-Thy-1. Ces résultats, contradictoires, démontrent clairement la nécessité de poursuivre les recherches au niveau de l'implication de Thy-1 dans l'adhésion des granulocytes aux fibroblastes cardiaques. Étant donné la possibilité que les quantités de GST-Thy-1 et de Thy-1 de cellules Rat1 aient été insuffisantes pour bloquer l'adhésion cellulaire, les prochains essais pourront entre autres être effectués avec de plus fortes concentrations d'agents bloqueurs. De plus, le

Thy-1 purifié à partir des cellules Rat1 pourraient être utilisé comme bloqueur de l'adhésion entre le GST-Thy-1 et les leucocytes, de manière à caractériser son activité ou du moins sa capacité à se lier aux leucocytes par rapport au GST-Thy-1. Cependant, sa production devra être accrue et améliorée avant de pouvoir faire de tels essais.

**Figure 4 : Essais de compétition dans l'adhésion cellulaire**

Adhésion entre des granulocytes non stimulés (A) ou stimulés au PMA (B) et des fibroblastes cardiaques en culture stimulés ou non au TNF- $\alpha$ . Dans les deux cas, 5 $\mu$ g de GST-Thy-1 ou de GST ont été utilisés. L'équivalent du Thy-1 de 30 000 cellules Rat1 a été utilisé pour le dernier groupe. (N = 4-6)

\* PC < 0.05 versus témoin sans TNF- $\alpha$

& PC  $\leq$  0.05 versus témoin sans TNF- $\alpha$

‡ PC < 0.05 versus témoin avec TNF- $\alpha$

La présente étude a donc pu confirmer que les fibroblastes cardiaques en culture étaient capables de lier certains types de leucocytes, soit les monocytes et les granulocytes, d'une manière dépendante du temps et du nombre de cellules. Pour leur part, les lymphocytes se lieraient beaucoup moins dans les conditions actuelles d'expérimentation. D'un autre côté, l'activation des granulocytes et des monocytes par le PMA mène à une augmentation de la liaison de GST-Thy-1 à la surface de ces cellules inflammatoires. Cependant, les essais de compétition dans l'adhésion cellulaire entre les granulocytes et les fibroblastes cardiaques en culture n'ont pas été en mesure de démontrer la participation de Thy-1 à ce phénomène inflammatoire, sans pour autant en écarter la possibilité.

#### **4.2. Mise au point d'un modèle de rat déficient en fibroblastes**

Dans le but de faciliter les prochaines études portant sur les mécanismes liés à la fibrose cardiaque et à l'inflammation associée, nous avons décidé de mettre au point un modèle de rats déficients en fibroblastes. Un tel modèle est basé sur l'injection dans le cœur des rats d'une immunotoxine capable de cibler et de provoquer la mort d'un ou de plusieurs types cellulaires précis via un marqueur membranaire. La conjugaison d'un anticorps à une cytotoxine permet en effet de la faire pénétrer dans une cellule exprimant le marqueur ciblé, ce dont elle serait incapable sans la conjugaison.<sup>106</sup> Le modèle de rats déficients en fibroblastes cardiaques permettrait donc d'observer *in vivo* l'importance de ces cellules particulières dans les phénomènes fibrotiques. Pour ce faire, l'immunotoxine qui a été choisie est formée de la conjugaison de l'anticorps OX7 anti-Thy-1 à du saporin (SAP), une toxine intracellulaire puissante capable d'inhiber la synthèse protéique<sup>107</sup> en interférant avec la sous-unité 28s du ribosome.<sup>108</sup> L'expérimentation *in vivo* devant nécessairement être précédée d'une certaine mise au point, nous nous sommes consacrés jusqu'à présent à l'expérimentation avec des fibroblastes cardiaques en culture ainsi qu'avec des cellules Rat1, une lignée stable de fibroblastes. Des essais préliminaires de



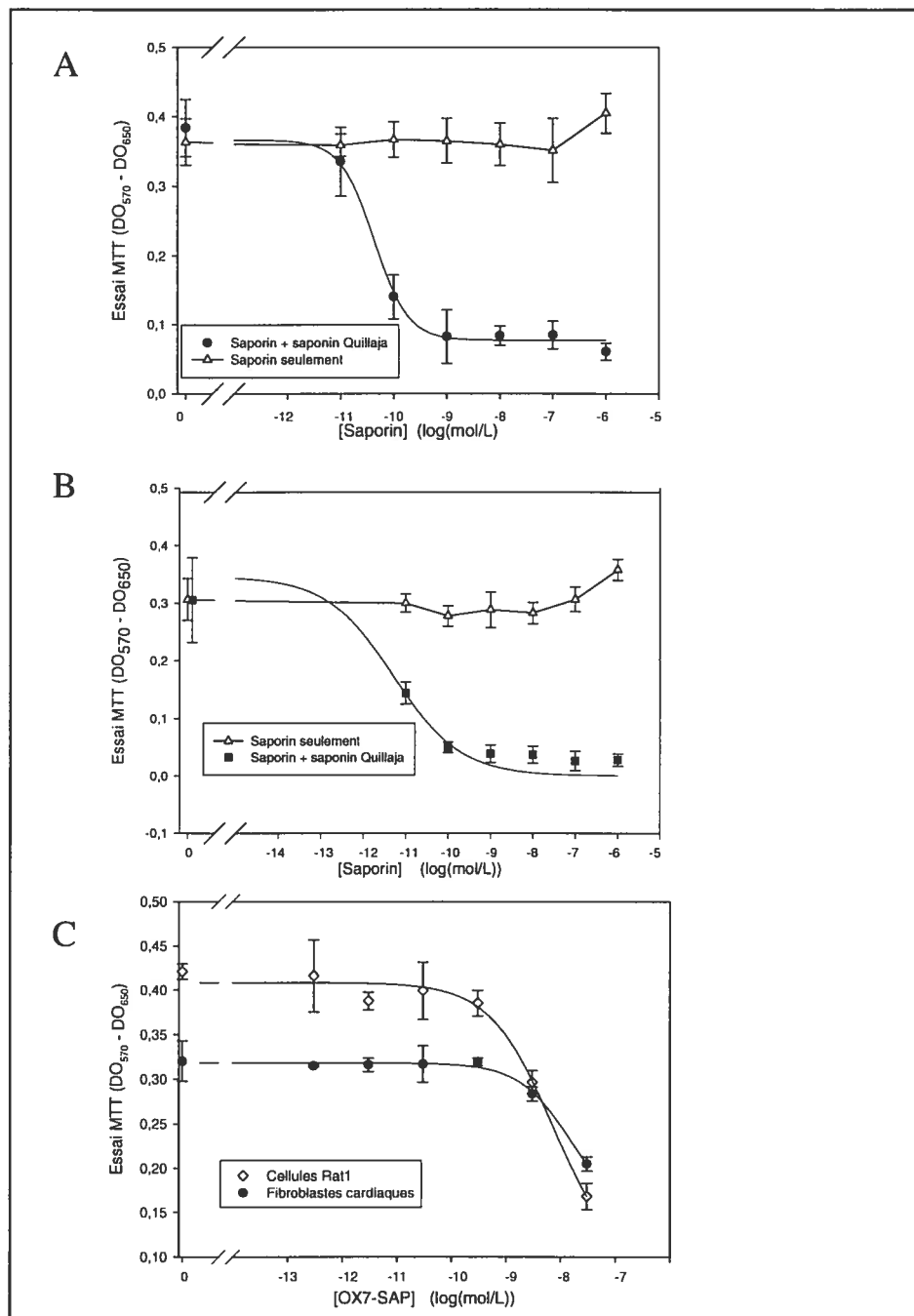
cytotoxicité cellulaire ont donc été effectués en présence de SAP ou du conjugué OX7-SAP. La cytotoxicité cellulaire a été évaluée à l'aide d'un essai colorimétrique de type MTT (Chemicon International) mesurant la survie cellulaire.

Comme le montre la figure 5, le SAP lui-même ne provoque pas la mort des cellules Rat1 (figure 5A) ou des fibroblastes cardiaques en culture (figure 5B) avec lesquels il est incubé, probablement en raison d'une trop faible capacité de pénétration intracellulaire. Cette explication est corroborée par la cytotoxicité améliorée du SAP lorsque les cellules sont incubées conjointement avec du SAP et du saponin. Extrait de l'écorce d'un arbre de l'espèce *Quillaja saponaria* Molina, ce composé déstabilise la membrane plasmique et y provoque la formation de pores facilitant le passage du SAP.<sup>109</sup> Par ailleurs, l'utilisation d'une immunotoxine est généralement un moyen efficace de faciliter l'entrée d'une toxine dans le cytoplasme puisqu'elle cible spécifiquement un type cellulaire donné et permet à la toxine de s'accoler à la membrane plasmique. Par exemple, l'étude de Thorpe (1985)<sup>107</sup> a démontré une toxicité de 8 à 17 fois supérieure du SAP sur les reins, la rate et le foie de souris lorsqu'il est couplé respectivement aux anticorps R10 (LD<sub>50</sub> de 25µg/25g de masse corporelle) et F(ab')<sub>2</sub> OX7 (LD<sub>50</sub> de 10µg/25g de masse corporelle) que lorsqu'il est présent sous sa forme libre (LD<sub>50</sub> de 170µg/25g de masse corporelle). Cette étude souligne aussi l'effet anti-tumoral potentiel d'une telle immunotoxine, de même que l'inhibition de la réponse des cellules de rate au stimulus mitogénique du Con A par une concentration de 10<sup>-8</sup>M de OX7-SAP. Une seconde étude s'est aussi servie du OX7-SAP afin d'examiner les rôles des cellules de Purkinje (neuronales) chez les rats, en les détruisant par infusion de 15µg de OX7-SAP dans le ventricule latéral droit des rats traités<sup>110</sup>.

De notre côté, nous avons étonnamment constaté que le conjugué OX7-SAP (Advanced Targeting Systems, via Cedarlane) devait être présent en forte concentration avant d'atteindre un niveau de toxicité suffisant pour être détecté, autant dans le cas des cellules Rat1 (EC50 de 10<sup>-8</sup>M) que pour celui des

fibroblastes cardiaques en culture (voir figure 5C). Ces derniers semblent même être un peu moins sensibles à la cytotoxicité du OX7-SAP. La courbe de la figure 5C, quoique incomplète, est en effet légèrement décalée vers la droite pour ce qui est des fibroblastes cardiaques, dont le EC50 approcherait plus de  $10^{-7}$ M. Cette réponse plus faible pourrait s'expliquer par une internalisation moins facile et moins importante de l'immunotoxine dans ces cellules particulières. Il sera donc nécessaire de produire de grandes quantités de conjugué avant d'entreprendre les essais *in vivo*. Cependant, une concentration de conjugué aussi faible que  $10^{-7}$ M reste amplement suffisante pour provoquer la mort cellulaire, alors qu'une concentration 10 fois plus importante de SAP non-conjugué et sans saponin en demeure incapable.

**Figure 5 : Cytotoxicité du saporin et du conjugué OX7-SAP**



A et B → Cytotoxicité du SAP sur les cellules Rat1 (A) et sur les fibroblastes cardiaques en culture (B) en présence ou non de saponin;  
C → Cytotoxicité du conjugué OX7-SAP sur les cellules Rat1 et les fibroblastes cardiaques en culture.

## **5. DISCUSSION**

La présente étude avait pour but l'approfondissement des connaissances sur la fibrose cardiaque et les fibroblastes du myocarde qui en sont responsables, de même que sur l'inflammation associée généralement aux processus fibrotiques. Le centre d'intérêt particulier de cette étude portait sur l'expression de la protéine membranaire Thy-1 sur ces fibroblastes spécifiques ainsi que sur son implication dans les phénomènes mentionnés. Il était d'abord nécessaire de confirmer la présence de Thy-1 sur les fibroblastes cardiaques avant de pouvoir déterminer sa localisation cellulaire et d'en observer l'expression dans les zones de fibrose et sur les différents phénotypes de fibroblastes. Parallèlement, des essais de liaison de Thy-1 avec certains leucocytes recrutés aux sites de fibrose permettaient d'étudier son rôle dans le recrutement de cellules inflammatoires. Enfin, les bases d'un modèle de rats déficients en fibroblastes cardiaques ont été jetées afin de faciliter l'étude future des mécanismes de régulation de la fibrose cardiaque.

Il a donc été démontré que les fibroblastes cardiaques en culture et *in vivo* exprimaient effectivement Thy-1, à l'intérieur de radeaux lipidiques distincts de ceux contenant de la cavéoline-1 et de la flotilline-1, et que Thy-1 pouvait donc être utilisé comme marqueur de ces cellules. Il reste encore à déterminer la présence ou l'absence de Thy-1 sur les différentes cellules infiltrantes potentielles comme les fibrocytes et les leucocytes en utilisant des marqueurs qui seraient spécifiques à chaque type cellulaire. Des expériences ultérieures de double marquage devront par ailleurs être effectuées sur les coupes de cœur de rat DOCA-sel, afin de détecter simultanément Thy-1 et des marqueurs de macrophages comme ED1 ou des marqueurs de cellules progénitrices. Alors que son expression est augmentée dans les zones de fibrose, l'expression de Thy-1 reste stable lors du changement phénotypique des fibroblastes en myofibroblastes. De plus, des résultats préliminaires semblent indiquer la participation non exclusive d'une interaction impliquant Thy-1 dans le recrutement des granulocytes et monocytes vers les régions de

fibrose. Enfin, une immunotoxine formée de la conjugaison de saporin (SAP) avec un anticorps anti-Thy-1 pourrait être utilisée afin de créer un modèle de rats déficients en fibroblastes cardiaques.

L'immunohistochimie de tissus ventriculaires de rats normaux a d'abord permis de confirmer l'expression de la protéine Thy-1 sur un grand nombre de cellules à l'intérieur du myocarde. Ces cellules particulières ont été identifiées comme étant des fibroblastes cardiaques grâce à différents moyens. D'abord, elles étaient très petites, de forme plutôt allongée, et intercalées entre les cardiomyocytes, des cellules beaucoup plus grosses, de forme sphérique en coupe transversale et présentant des myofilaments visibles en coupe longitudinale. Ensuite, elles colocalisaient parfaitement avec les zones de fibrose, à l'intérieur desquelles s'accumulent de grandes quantités de collagène. Enfin, elles exprimaient l'intégrine  $\alpha 8$ , qui est connue pour être exprimée en général par les fibroblastes cardiaques<sup>71</sup> et les VSMCs, ces dernières exprimant cependant peu Thy-1 et étant entourées de fibroblastes cardiaques (voir figure 1I, page 74). Il est à noter que, bien que présent sur les cellules de muscle lisse chez les humains, Thy-1 ne semble pas être exprimé sur ces cellules chez la souris, un parent proche du rat.<sup>82</sup> Tous ces indices nous ont menés à conclure que les cellules exprimant Thy-1 étaient bel et bien des fibroblastes. De plus, nous avons constaté une homogénéité de la population des fibroblastes cardiaques, qui présentent tous Thy-1 à leur surface à différents degrés allant d'une expression prononcée à une expression faible (jusqu'à un facteur de 100). Il est par ailleurs possible que l'origine des fibroblastes cardiaques (cellules résidentes, fibrocytes, etc.) explique les variations observées dans l'expression de Thy-1 par ces fibroblastes, mais cela reste à confirmer.

Les techniques immunohistochimiques sur les rats traités au DOCA-sel n'ont pas permis d'évaluer l'augmentation de l'expression de Thy-1 par les fibroblastes individuels. Cependant, nous avons vu une forte accumulation de fibroblastes cardiaques exprimant Thy-1 et l'intégrine  $\alpha 8$  dans des régions circonscrites. Ces régions ont été identifiées comme étant fibrotiques en raison

de l'accumulation importante de collagène, coloré sur les lames grâce au rouge Sirius. Conformément aux prévisions, ces zones présentaient de surcroît une désorganisation prononcée de la structure cellulaire étant donnée l'accumulation de fibroblastes et de protéines de la MEC entre les cardiomyocytes, selon un processus détruisant leur couplage électrique et biochimique. Certaines régions, pour lesquelles on ne peut plus parler de fibrose interstitielle, montrent même une diminution du nombre de cardiomyocytes, probablement par des mécanismes apoptotiques. On peut alors soulever la possibilité de micro-infarctus, généralement causés par des micro-embolies et associés à l'infiltration de leucocytes et à la mort des cardiomyocytes.<sup>111</sup> Des résultats semblables ont par ailleurs été obtenus précédemment dans notre laboratoire (données non incluses) sur des coupes de cœur de rats traités à l'angiotensine II selon un modèle déjà décrit.<sup>71</sup> La fonction cardiaque est ainsi grandement affectée en raison non seulement de la disparition du couplage entre les cardiomyocytes, mais aussi de la modification des propriétés élastiques et contractiles du cœur.

L'expression de Thy-1 dans les cœurs de rats a aussi été évaluée par PCR quantitatif en temps réel. La quantification de l'ARNm donne une bonne idée de la transcription d'un gène cible, mais elle ne peut servir à quantifier directement la protéine Thy-1 en raison des mécanismes de régulation post-transcriptionnels de l'expression protéique. Avant d'être traduit, l'ARNm peut en effet être dégradé, de même que les protéines nouvellement produites, afin de maintenir l'expression protéique au niveau désiré. En utilisant de petites portions des cœurs de rats traités ou non au DOCA-sel, nous avons pu constater une transcription accrue de Thy-1 et de l'intégrine  $\alpha 8$  dans les cœurs de rats traités. En effet, ces rats contenaient six à sept fois plus de transcrits d'ARNm pour Thy-1 et trois fois plus de transcrits d'ARNm pour  $\alpha 8$  que les rats non traités. Il est à noter que l'hyperplasie de la vasculature du myocarde observée en immunohistochimie contribue possiblement à cette augmentation des transcrits d'ARNm pour l'intégrine  $\alpha 8$ , selon un pourcentage inconnu et

probablement faible. Donc, si l'on considère l'expression de l'intégrine  $\alpha 8$  comme étant proportionnelle au nombre de fibroblastes cardiaques, on peut conclure à l'augmentation du nombre de fibroblastes dans les cœurs fibrotiques des rats traités, se traduisant par une augmentation des transcrits de Thy-1 par la même occasion. Cependant, l'augmentation supplémentaire observée pour Thy-1 (par rapport à l'intégrine  $\alpha 8$ ) pourrait aussi dépendre en plus d'une infiltration de lymphocytes T, de cellules progénitrices et/ou de fibrocytes exprimant chacune Thy-1 (voir la section 1.5.1). La quantité accrue de transcrits d'ARNm de Thy-1 dans nos échantillons découle donc probablement d'une élévation du nombre de cellules exprimant Thy-1 dans les cœurs des rats DOCA-sel ainsi que d'une expression exacerbée de Thy-1 par les cellules déjà présentes.

La population de fibroblastes pulmonaires présente une hétérogénéité dans l'expression de Thy-1<sup>21</sup> puisqu'on y retrouve des cellules positives et des négatives, dans des proportions variant selon les espèces. Bien que 28 à 49% des fibroblastes pulmonaires normaux de souris expriment cette protéine<sup>89</sup>, il semblerait que cette proportion soit de  $91,7 \pm 8\%$  (n=6) sur les fibroblastes pulmonaires normaux humains, proportion qui diminuerait sous l'influence de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques jusqu'à résulter en une population à majorité Thy-1<sup>-</sup>.<sup>114</sup> Au contraire, il a été déterminé par cytométrie en flux que les fibroblastes cardiaques formaient une population homogène de cellules exprimant toutes Thy-1 et l'intégrine  $\alpha 8$ . Alors qu'une étude précédente concluait à une expression accrue de collagène par les fibroblastes pulmonaires Thy-1 positifs<sup>21</sup>, une seconde étude montrait étonnamment un effet anti-fibrotique potentiel de Thy-1 sur les fibroblastes pulmonaires.<sup>86</sup> La présence de fibroblastes cardiaques Thy-1 positifs dans des zones de fibrose cardiaque prouve bien que des fibroblastes provenant de différents tissus possèdent différentes fonctions, indépendamment de l'expression de Thy-1. Cependant, l'homogénéité de la population de fibroblastes cardiaques peut faciliter l'étude de leur implication dans la fibrose cardiaque. De plus, la culture des fibroblastes cardiaques primaires a démontré que plus de 90% exprimaient

Thy-1 au passage 0 et que cette proportion passait à plus de 98% pour les passages suivants (de un à quatre), suggérant la présence de cellules contaminantes autres que fibroblastes et Thy-1<sup>-</sup> lors du premier passage.

À l'instar du Thy-1 exprimé sur les fibroblastes pulmonaires<sup>95</sup>, Thy-1 semble n'être présent que dans les radeaux lipidiques des fibroblastes cardiaques. La séparation des domaines membranaires par gradient de sucrose et l'analyse par immunobuvardage des fractions obtenues ont en effet prouvé la présence de Thy-1 dans des fractions contenant les radeaux lipidiques, c'est-à-dire des régions membranaires riches en cholestérol. La présence de Thy-1 dans ces radeaux lipidiques indique sa possible participation à la signalisation intracellulaire en raison de la présence accrue dans ces régions de protéines d'adhésion et/ou de signalisation comme la SFK, avec laquelle Thy-1 semblerait interagir.<sup>97</sup> Ces interactions pourraient être essentielles entre autres pour la migration cellulaire impliquée dans la cicatrisation, via l'activation de la GTPase Rho agissant sur l'assemblage des foyers d'adhésion.<sup>95</sup>

La solubilisation différentielle des fractions contenant les radeaux lipidiques ainsi que l'immunocytochimie de fibroblastes cardiaques ont de plus permis de distinguer différents types de radeaux lipidiques. En effet, Thy-1 est présent dans des radeaux lipidiques distincts de ceux contenant de la cavéoline-1 ou de la flotilline-1. La cavéoline-1 est une protéine essentielle à la formation et la stabilisation des vésicules d'endocytose appelées caveolae.<sup>112</sup> La flotilline-1, aussi appelée reggie-2, est présente dans des amas stables à la membrane (ou *reggie clusters*), ainsi que dans des compartiments vésiculaires intracellulaires, et peut être transloquée au noyau.<sup>113</sup> Étant absente des radeaux lipidiques contenant de la cavéoline-1 ou de la flotilline-1, on peut donc supposer que la protéine Thy-1 demeure à la membrane et n'est pas internalisée. Bien que la seconde immunocytochimie de fibroblastes cardiaques montre clairement l'absence de colocalisation entre la F-actine intracellulaire et le Thy-1 extracellulaire, des expériences supplémentaires devront être effectuées afin de confirmer cette hypothèse. Des fibroblastes cardiaques pourraient effectivement



être observés au microscope confocal après avoir été marqués pour Thy-1, de façon à déterminer si cette protéine est présente dans le cytoplasme ou dans certaines vésicules intracellulaires en plus d'être exprimée à l'intérieur des radeaux lipidiques. De plus, le traitement des cellules au chlorure d'ammonium, qui empêche l'acidification des endosomes, en bloque l'internalisation et pourrait servir d'outil pour l'étude de l'internalisation de Thy-1.

Contrairement aux cardiomyocytes, les fibroblastes cardiaques ne sont pas terminalement différenciés puisqu'ils peuvent se modifier en MyoFb afin d'afficher un phénotype contractile. Les stimuli comme le TGF- $\beta$  et la tension mécanique peuvent induire ce changement menant à une expression accrue de protéines de la MEC, de fibres de stress, de protéines d'adhésion focale et de SM  $\alpha$ -actine.<sup>19</sup> Afin d'évaluer l'effet de ce changement phénotypique sur l'expression de Thy-1, des fibroblastes cardiaques en culture ont été stimulés 24 et 48 heures au TGF- $\beta$  avant d'être analysés par cytométrie en flux et immunobuvardage. Comme prévu, une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha 8$  et de la SM  $\alpha$ -actine a été observée, indiquant un changement effectif de phénotype. Il est à noter que cette augmentation d'expression entre les fibroblastes et les MyoFb est probablement plus importante *in vivo* qu'en culture étant donné l'état intermédiaire (proto-MyoFb) qu'adoptent les fibroblastes lorsqu'ils sont cultivés en pétri. À l'inverse de celle de l'intégrine  $\alpha 8$  et de la SM  $\alpha$ -actine, l'expression de Thy-1 n'a pas été modifiée par le changement phénotypique. Une faible diminution, non significative, a même été observée. Conséquemment, l'expression de Thy-1 est indépendante de la différenciation de fibroblastes en MyoFb. Il est important de mentionner que la différence entre les signaux d'immunobuvardage observés dans les figures 5 et 6 du manuscrit est probablement due à la différence dans la préparation des échantillons, les premiers étant partiellement purifiés (via une séparation des domaines membranaires par gradient de sucrose) et les seconds étant des lysats cellulaires totaux.

Nous pouvons maintenant confirmer que Thy-1 est un bon marqueur des fibroblastes cardiaques, peu importe leur phénotype spécifique. Cependant, sa fonction exacte demeure inconnue, bien que plusieurs hypothèses aient été formulées. Outre son utilisation comme marqueur de différenciation des fibroblastes pulmonaires<sup>88</sup>, Thy-1 serait aussi impliqué dans la signalisation intracellulaire via SFK<sup>95</sup>. De plus, la protéine Thy-1 semble posséder un rôle important dans l'activation des lymphocytes T puisqu'elle pourrait se substituer, du moins en partie, à la signalisation via le TCR et pourrait de surcroît agir comme co-stimulateur de l'activation des lymphocytes T via une association avec le complexe TCR/CD3.<sup>82</sup> Sa liaison avec les cellules T de souris induirait par ailleurs la production de cytokines comme IL-2 (voir la revue de Haeryfar et al, 2004).

La structure d'acides aminés de Thy-1, un domaine variable de type immunoglobuline (*immunoglobulin-like*), indiquerait une participation active dans l'adhésion cellulaire et l'inflammation. Cette adhésion pourrait se faire via le motif RLD de Thy-1, un motif capable de lier les intégrines.<sup>83</sup> En fait, un ligand de Thy-1 a été découvert sur les leucocytes PMN et les monocytes, mais non sur les lymphocytes.<sup>92</sup> En effet, Thy-1 est déjà connue pour lier au moins deux intégrines exprimées sur certains leucocytes, soit  $\alpha_x\beta_2$ <sup>91</sup> (monocytes, macrophages et cellules dendritiques) et  $\alpha_M\beta_2$ <sup>94</sup> (monocytes et leucocytes PMN). L'existence d'une interaction entre  $\alpha_M\beta_2$  et Thy-1 nous a menés à supposer une participation de Thy-1 dans le recrutement de cellules inflammatoires vers les sites de fibrose cardiaque. La présence d'inflammation dans les zones fibrotiques a d'abord été confirmée par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps spécifique à ED1 (CD68), un marqueur des monocytes et des macrophages. Cette inflammation survient généralement dans ces zones suite à l'activation des fibroblastes cardiaques par la tension mécanique et les cytokines comme le TGF- $\beta$ . Cette activation mène à la production de cytokines supplémentaires qui amplifient la réponse inflammatoire. Cependant, la colocalisation parfaite de Thy-1 et ED1 dans les régions de fibrose ne suffisait

pas à prouver la participation de Thy-1 dans le recrutement cellulaire. Par conséquent, d'autres expériences ont été effectuées à ce propos.

Des essais d'adhésion cellulaire ont d'abord confirmé que les PBMCs, qui comprennent les lymphocytes et les monocytes, pouvaient adhérer à une monocouche de fibroblastes cardiaques en culture, de façon dépendante du temps d'incubation et du nombre de PBMCs utilisées. Comme il a été établi par immunocytochimie, les monocytes sont les seules PBMCs adhérant fortement aux fibroblastes cardiaques, au même titre que les granulocytes (PMN). Parallèlement, des essais avec la protéine recombinante GST-Thy-1 ont démontré que Thy-1 pouvait se lier aux granulocytes et aux monocytes et que cette liaison augmentait avec la stimulation des leucocytes au PMA, un composé capable de mimer leur activation par les stimuli pro-inflammatoires. Cependant, ni le GST-Thy-1 ni le Thy-1 de cellules Rat1 n'ont été capables de bloquer l'adhésion entre des granulocytes et des fibroblastes cardiaques en culture. L'absence d'effet du GST-Thy-1 aurait pu s'expliquer par une conformation non fonctionnelle de la protéine, produite chez des bactéries et ne comportant donc pas une glycosylation physiologique. Néanmoins, le Thy-1 de cellules Rat1 a été produit par des cellules eucaryotes et aurait dû être fonctionnel. Par conséquent, ces résultats préliminaires semblent indiquer que Thy-1 n'est pas impliqué du tout dans l'adhésion des granulocytes aux fibroblastes cardiaques ou que trop peu d'agents bloqueurs a été utilisé lors des essais. Les données recueillies étant très contradictoires, il demeure toutefois encore impossible d'écarter définitivement cette possibilité d'une participation active mais non exclusive de Thy-1 dans le recrutement de cellules inflammatoires vers les zones de fibrose cardiaque. La liaison du GST-Thy-1 aux leucocytes milite par ailleurs pour soutenir cette hypothèse. De nouvelles études devront donc être menées afin d'obtenir des résultats plus fiables et d'identifier sans aucun doute possible le ligand auquel Thy-1 se lierait sur les granulocytes et monocytes.

Ces études pourront par ailleurs utiliser le modèle de rat déficient en fibroblastes cardiaques dont nous avons posé les bases. En effet, des expériences de cytotoxicité cellulaire sur des fibroblastes cardiaques en culture et des cellules Rat1 ont été effectuées, à l'aide de la conjugaison de l'anticorps OX7 anti-Thy-1 avec du saporin (SAP). Le SAP est une toxine capable d'inhiber la synthèse protéique en interférant avec la sous-unité 28s du ribosome. Cependant, sa capacité de pénétration cellulaire est si faible que cette toxine est pratiquement inoffensive à moins d'être utilisée en combinaison avec un surfactant comme le saponin, capable de déstabiliser des membranes plasmiques. Ainsi seulement, le SAP devient toxique et possède alors un EC50 de  $10^{-10}$ M pour les cellules Rat1 et  $10^{-11}$ M pour les fibroblastes cardiaques. L'immunotoxine (OX7-SAP), pour sa part, est toxique à de plus fortes concentrations et son EC50 de  $10^{-7}$ M démontre sa capacité à cibler les cellules exprimant Thy-1 comme les fibroblastes cardiaques ou les cellules Rat1 afin d'y faire pénétrer le SAP. Une fois ce fait établi, des expériences in vivo peuvent désormais être réalisées afin de vérifier si l'injection d'OX7-SAP dans le cœur de rats provoque la mort des fibroblastes cardiaques, avant d'examiner l'effet de cette mort cellulaire sur les processus fibrotiques et inflammatoires.

## **6. CONCLUSION**

Bien qu'il soit désormais confirmé que Thy-1 est exprimé sur la plupart, sinon tous les fibroblastes cardiaques de rat et que cette protéine membranaire peut par conséquent être utilisée comme marqueur cellulaire spécifique, sa fonction particulière demeure obscure. Située dans des radeaux lipidiques à part, ne contenant pas de cavéoline-1 ni de flotilline-1, Thy-1 semble être associée aux phénomènes de fibrose cardiaque. De plus, des résultats préliminaires soulignent la possibilité que Thy-1 participe de façon active mais non exclusive au recrutement de cellules inflammatoires comme les granulocytes et les monocytes vers les zones de fibrose cardiaque. Les résultats préliminaires étant contradictoires, des études subséquentes devront cependant être menées afin de confirmer cette hypothèse, à l'aide entre autres du modèle de rats déficients en fibroblastes cardiaques dont les bases ont été ici jetées.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

1. Décès, 2003. 2005. Rapport # de catalogue: 84F0211XIF. Page 8. Statistique Canada. [www.statcan.ca](http://www.statcan.ca).
2. Caron,A. Implication de la GPIIb/IIIa et de la P-sélectine dans l'activation et l'agrégation plaquettaire. Mémoire de maîtrise. Page 1. 2000. Université de Montréal.
3. Izzo,J.L., Black,H.R., Goodfriend,T.L. & Council for High Blood Pressure Research (American Heart Association). Hypertension primer: The essentials of high blood pressure. Pages 1 à 532. 3e édition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore (2003).
4. Marieb,E.N. Anatomie et physiologie humaines. Pages 1 à 1194. 2<sup>e</sup> édition. Éd. du Renouveau pédagogique, Saint-Laurent, Qué (1999).
5. Stephen Nussey & Saffron Whitehead. Endocrinology: An Integrated Approach. NCBI, Bookshelf. 1<sup>ère</sup> édition. 2001. BIOS Scientific Publishers Ltd.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=endocrin>
6. Masuda,S., Murakami,M., Ishikawa,Y., Ishii,T. & Kudo,I. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A2 enzymes in several human tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1736, 200-210 (2005).
7. Reese,D.E., Mikawa,T. & Bader,D.M. Development of the coronary vessel system. *Circ. Res.* 91, 761-768 (2002).
8. Jenkins,S.J., Hutson,D.R. & Kubalak,S.W. Analysis of the proepicardium-epicardium transition during the malformation of the RXRalpha-/- epicardium. *Dev. Dyn.* 233, 1091-1101 (2005).
9. Leite-Moreira,A.F. & Castro-Chaves,P. Heart failure. Statins for all? *Heart* (2006).
10. Kohl,P., Camelliti,P., Burton,F.L. & Smith,G.L. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *J. Electrocardiol.* 38, 45-50 (2005).
11. Baudino,T., Carver,W., Giles,W.R. & Borg,T.K. Cardiac Fibroblasts: friend or foe? *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* (2006).

12. Woodcock,E.A. & Matkovich,S.J. Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1746-1751 (2005).
13. Brette,F., Leroy,J., Le Guennec,J.Y. & Salle,L. Ca<sup>2+</sup> currents in cardiac myocytes: Old story, new insights. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 91, 1-82 (2006).
14. Vinogradova,T.M., Maltsev,V.A., Bogdanov,K.Y., Lyashkov,A.E. & Lakatta,E.G. Rhythmic Ca<sup>2+</sup> oscillations drive sinoatrial nodal cell pacemaker function to make the heart tick. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1047, 138-156 (2005).
15. Camelliti,P., Green,C.R. & Kohl,P. Structural and functional coupling of cardiac myocytes and fibroblasts. *Adv. Cardiol.* 42, 132-149 (2006).
16. Weber,K.T. Fibrosis and hypertensive heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.* 15, 264-272 (2000).
17. Manabe,I., Shindo,T. & Nagai,R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 91, 1103-1113 (2002).
18. Kukacka,J., Prusa,R., Kotaska,K. & Pelouch,V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* 149, 225-236 (2005).
19. Tomasek,J.J., Gabbiani,G., Hinz,B., Chaponnier,C. & Brown,R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 349-363 (2002).
20. Lovelock,J.D. *et al.* Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 288, H461-H468 (2005).
21. Phan,S.H. Fibroblast phenotypes in pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29, S87-S92 (2003).
22. Weber,K.T. Fibrosis in hypertensive heart disease: focus on cardiac fibroblasts. *J. Hypertens.* 22, 47-50 (2004).
23. Bucala,R., Spiegel,L.A., Chesney,J., Hogan,M. & Cerami,A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol. Med.* 1, 71-81 (1994).

24. Herpel,E. *et al.* Interstitial fibrosis in the heart: differences in extracellular matrix proteins and matrix metalloproteinases in end-stage dilated, ischaemic and valvular cardiomyopathy. *Histopathology* 48, 736-747 (2006).
25. Jane-Lise,S., Corda,S., Chassagne,C. & Rappaport,L. The extracellular matrix and the cytoskeleton in heart hypertrophy and failure. *Heart Fail. Rev.* 5, 239-250 (2000).
26. Kyriakides,T.R. & Bornstein,P. Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response. *Thromb. Haemost.* 90, 986-992 (2003).
27. Hood,J.D. & Cheresch,D.A. Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat. Rev. Cancer* 2, 91-100 (2002).
28. Bouzeghrane,F., Reinhardt,D.P., Reudelhuber,T.L. & Thibault,G. Enhanced expression of fibrillin-1, a constituent of the myocardial extracellular matrix in fibrosis. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 289, H982-H991 (2005).
29. Katz,A.M. Heart failure: Pathophysiology, molecular biology and clinical management. Pages 1 à 381. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2000).
30. Olson,E.N. & Schneider,M.D. Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Dev.* 17, 1937-1956 (2003).
31. Messina,E. *et al.* Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* 95, 911-921 (2004).
32. Nadal-Ginard,B., Kajstura,J., Leri,A. & Anversa,P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ. Res.* 92, 139-150 (2003).
33. Anversa,P. & Kajstura,J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ. Res.* 83, 1-14 (1998).
34. Sugden,P.H. & Clerk,A. Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *J. Mol. Med.* 76, 725-746 (1998).
35. Vasan,R.S. & Levy,D. The role of hypertension in the pathogenesis of heart failure. A clinical mechanistic overview. *Arch. Intern. Med.* 156, 1789-1796 (1996).



36. Komuro, I. *et al.* Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. *FASEB J.* 10, 631-636 (1996).
37. Ito, H. *et al.* Mild hypoxia induces hypertrophy of cultured neonatal rat cardiomyocytes: a possible endogenous endothelin-1-mediated mechanism. *J. Mol. Cell Cardiol.* 28, 1271-1277 (1996).
38. Bouzeghrane, F. & Thibault, G. Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovasc. Res.* 53, 304-312 (2002).
39. Lopez, B. *et al.* Biochemical assessment of myocardial fibrosis in hypertensive heart disease. *Hypertension* 38, 1222-1226 (2001).
40. Moncrieff, J., Lindsay, M.M. & Dunn, F.G. Hypertensive heart disease and fibrosis. *Curr. Opin. Cardiol.* 19, 326-331 (2004).
41. Asbun, J. & Villarreal, F.J. The pathogenesis of myocardial fibrosis in the setting of diabetic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 47, 693-700 (2006).
42. Hahn, A.W. *et al.* Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul.* 1, 649-659 (1990).
43. Weber, K.T. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation* 96, 4065-4082 (1997).
44. Dustan, H.P. Physiologic regulation of arterial pressure. An overview. *Hypertension* 4, III62-III67 (1982).
45. Saha, S. Role of the central nucleus of the amygdala in the control of blood pressure: descending pathways to medullary cardiovascular nuclei. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* 32, 450-456 (2005).
46. Persson, P.B. Renin: origin, secretion and synthesis. *J. Physiol* 552, 667-671 (2003).
47. Peral, D.B. *et al.* The novel serine protease PreR-Co promotes endothelium-independent vasorelaxation in rabbit aortic rings. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 284, H704-H710 (2003).
48. Lavoie, J.L. & Sigmund, C.D. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 144, 2179-2183 (2003).

49. Losel,R.M., Feuring,M., Falkenstein,E. & Wehling,M. Nongenomic effects of aldosterone: cellular aspects and clinical implications. *Steroids* 67, 493-498 (2002).
50. Fuller,P.J. & Young,M.J. Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension* 46, 1227-1235 (2005).
51. MacLean,C. L'Hypertension Artérielle - Comment réduire la haute pression. Collège des médecins de famille du Canada. 4-30-2003. 6-12-0060. Consulté à l'été 2006.  
<http://www.cfpc.ca/French/cfpc/programs/patient%20education/high%20blood/default.asp?s=1>
52. Manceau,V., Mantha,M. & Lépine,P. Hypotension. PasseportSanté.net: La santé sans frontières. 4-15-2004. 6-12-0060. Consulté à l'été 2006.  
[http://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=hypotension\\_pm](http://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=hypotension_pm)
53. Haynes,R.B. & Leenen,F.H.H. À bas l'hypertension! Recherches, traitement et maîtrise. Éditions Grosvenor, Montréal (1990).
54. Kaplan,N. Le traitement de l'hypertension. Pages 1 à 213. Édité par Pavel Hamet. (1986).
55. Marteau,J.B., Zaiou,M., Siest,G. & Visvikis-Siest,S. Genetic determinants of blood pressure regulation. *J. Hypertens.* 23, 2127-2143 (2005).
56. Binder,A. Identification of genes for a complex trait: examples from hypertension. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7, 1-13 (2006).
57. Lerman,L.O., Chade,A.R., Sica,V. & Napoli,C. Animal models of hypertension: an overview. *J. Lab Clin. Med.* 146, 160-173 (2005).
58. Karam,H. *et al.* Respective role of humoral factors and blood pressure in cardiac remodeling of DOCA hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 31, 287-295 (1996).
59. Yu,M., Gopalakrishnan,V. & McNeill,J.R. Role of endothelin and vasopressin in DOCA-salt hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1447-1454 (2001).
60. Sun,Z.J. & Zhang,Z.E. Historic perspectives and recent advances in major animal models of hypertension. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 295-301 (2005).

61. Benjamini,E., Sunshine,G. & Leskowitz,S. Immunology: A short course. Pages 1 à 484. 3e édition. Wiley-Liss, New York (1996).
62. Taqueti,V.R., Mitchell,R.N. & Lichtman,A.H. Protecting the pump: controlling myocardial inflammatory responses. *Annu. Rev. Physiol* 68, 67-95 (2006).
63. Kai,H., Kuwahara,F., Tokuda,K. & Imaizumi,T. Diastolic dysfunction in hypertensive hearts: roles of perivascular inflammation and reactive myocardial fibrosis. *Hypertens. Res.* 28, 483-490 (2005).
64. Nian,M., Lee,P., Khaper,N. & Liu,P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ. Res.* 94, 1543-1553 (2004).
65. Frangogiannis,N.G., Smith,C.W. & Entman,M.L. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 53, 31-47 (2002).
66. Khan,R. & Sheppard,R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology* 118, 10-24 (2006).
67. Rankin,J.A. Biological mediators of acute inflammation. *AACN. Clin. Issues* 15, 3-17 (2004).
68. Marshall,D. & Haskard,D.O. Clinical overview of leukocyte adhesion and migration: where are we now? *Semin. Immunol.* 14, 133-140 (2002).
69. Thibault,G. Sodium dodecyl sulfate-stable complexes of echistatin and RGD-dependent integrins: a novel approach to study integrins. *Mol. Pharmacol.* 58, 1137-1145 (2000).
70. Shattil,S.J. & Ginsberg,M.H. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Integrin signaling in vascular biology. *J. Clin. Invest* 100, 1-5 (1997).
71. Bouzeghrane,F., Mercure,C., Reudelhuber,T.L. & Thibault,G. Alpha8beta1 integrin is upregulated in myofibroblasts of fibrotic and scarring myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 36, 343-353 (2004).
72. Alberts,B. Molecular biology of the cell. Pages 1 à 1463. 4e édition. Garland Science, New York (2002).
73. Nicoletti,A., Mandet,C., Challah,M., Bariety,J. & Michel,J.B. Mediators of perivascular inflammation in the left ventricle of renovascular hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 31, 585-595 (1996).

74. Janeway,C.A., Travers,P., Walport,M. & Shlomchik,M. Immunobiology. NCBI, Bookshelf. 5e édition. 2001. Garland Publishing.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=janus+kinase+AND+imm%5Bbook%5D+AND+125341%5Buid%5D&rid=imm.section.711#716>
75. Suzuki,Y. *et al.* Inflammation and angiotensin II. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 881-900 (2003).
76. Neves,M.F., Amiri,F., Viridis,A., Diep,Q.N. & Schiffrin,E.L. Role of aldosterone in angiotensin II-induced cardiac and aortic inflammation, fibrosis, and hypertrophy. *Can. J. Physiol Pharmacol.* 83, 999-1006 (2005).
77. Ammarguella,F.Z., Gannon,P.O., Amiri,F. & Schiffrin,E.L. Fibrosis, matrix metalloproteinases, and inflammation in the heart of DOCA-salt hypertensive rats: role of ET(A) receptors. *Hypertension* 39, 679-684 (2002).
78. Pu,Q., Amiri,F., Gannon,P. & Schiffrin,E.L. Dual angiotensin-converting enzyme/neutral endopeptidase inhibition on cardiac and renal fibrosis and inflammation in DOCA-salt hypertensive rats. *J. Hypertens.* 23, 401-409 (2005).
79. Savoia,C. & Schiffrin,E.L. Inflammation in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 15, 152-158 (2006).
80. Nicoletti,A. *et al.* Inflammatory cells and myocardial fibrosis: spatial and temporal distribution in renovascular hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 32, 1096-1107 (1996).
81. Zucchini,A., Del,Z.G., Brando,B. & Canonico,B. CD90. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 15, 82-85 (2001).
82. Haeryfar,S.M. & Hoskin,D.W. Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *J. Immunol.* 173, 3581-3588 (2004).
83. Morioka,T., Yao,J., Suzuki,Y. & Oite,T. The characterization of a specific Thy-1 molecular epitope expressed on rat mesangial cells. *Kidney Int.* 66, 2214-2223 (2004).
84. Bagchus,W.M., Hoedemaeker,P.J., Rozing,J. & Bakker,W.W. Glomerulonephritis induced by monoclonal anti-Thy 1.1 antibodies. A

- sequential histological and ultrastructural study in the rat. *Lab Invest* 55, 680-687 (1986).
85. Jefferson, J.A. & Johnson, R.J. Experimental mesangial proliferative glomerulonephritis (the anti-Thy-1.1 model). *J. Nephrol.* 12, 297-307 (1999).
  86. Zhou, Y., Hagood, J.S. & Murphy-Ullrich, J.E. Thy-1 expression regulates the ability of rat lung fibroblasts to activate transforming growth factor-beta in response to fibrogenic stimuli. *Am. J. Pathol.* 165, 659-669 (2004).
  87. Koumas, L., King, A.E., Critchley, H.O., Kelly, R.W. & Phipps, R.P. Fibroblast heterogeneity: existence of functionally distinct Thy 1(+) and Thy 1(-) human female reproductive tract fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 159, 925-935 (2001).
  88. Koumas, L., Smith, T.J., Feldon, S., Blumberg, N. & Phipps, R.P. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *Am. J. Pathol.* 163, 1291-1300 (2003).
  89. Phipps, R.P. *et al.* Characterization of two major populations of lung fibroblasts: distinguishing morphology and discordant display of Thy 1 and class II MHC. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1, 65-74 (1989).
  90. Fries, K.M. *et al.* Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 72, 283-292 (1994).
  91. Choi, J., Leyton, L. & Nham, S.U. Characterization of alphaX I-domain binding to Thy-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 557-561 (2005).
  92. Saalbach, A., Hausteiner, U.F. & Andereg, U. A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J. Invest Dermatol.* 115, 882-888 (2000).
  93. Saalbach, A. *et al.* Interaction of human Thy-1 (CD 90) with the integrin alpha5beta3 (CD51/CD61): an important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium. *Oncogene* 24, 4710-4720 (2005).

94. Wetzel,A. *et al.* Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* 172, 3850-3859 (2004).
95. Barker,T.H. *et al.* Thrombospondin-1-induced focal adhesion disassembly in fibroblasts requires Thy-1 surface expression, lipid raft integrity, and Src activation. *J. Biol. Chem.* 279, 23510-23516 (2004).
96. Leitinger,B. & Hogg,N. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J. Cell Sci.* 115, 963-972 (2002).
97. Barker,T.H. *et al.* Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity. *Exp. Cell Res.* 295, 488-496 (2004).
98. Lamaze,C. & Schmid,S.L. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 573-580 (1995).
99. Parkin,E.T., Turner,A.J. & Hooper,N.M. Differential effects of glycosphingolipids on the detergent-insolubility of the glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase. *Biochem. J.* 358, 209-216 (2001).
100. Hooper,N.M. Determination of glycosyl-phosphatidylinositol membrane protein anchorage. *Proteomics.* 1, 748-755 (2001).
101. Breen,E., Falco,V.M., Absher,M. & Cutroneo,K.R. Subpopulations of rat lung fibroblasts with different amounts of type I and type III collagen mRNAs. *J. Biol. Chem.* 265, 6286-6290 (1990).
102. Bischof,J.C. *et al.* Dynamics of cell membrane permeability changes at supraphysiological temperatures. *Biophys. J.* 68, 2608-2614 (1995).
103. Lyapina,M., Zhelezova,G., Petrova,E. & Boev,M. Flow cytometric determination of neutrophil respiratory burst activity in workers exposed to formaldehyde. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 77, 335-340 (2004).
104. Saalbach,A., Kraft,R., Herrmann,K., Haustein,U.F. & Anderegg,U. The monoclonal antibody AS02 recognizes a protein on human fibroblasts being highly homologous to Thy-1. *Arch. Dermatol. Res.* 290, 360-366 (1998).
105. Hetzel,M., Bachem,M., Anders,D., Trischler,G. & Faehling,M. Different effects of growth factors on proliferation and matrix

- production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung* 183, 225-237 (2005).
106. Letvin, N.L. *et al.* In vivo administration of lymphocyte-specific monoclonal antibodies in nonhuman primates. In vivo stability of disulfide-linked immunotoxin conjugates. *J. Clin. Invest* 77, 977-984 (1986).
  107. Thorpe, P.E., Brown, A.N., Bremner, J.A., Jr., Foxwell, B.M. & Stirpe, F. An immunotoxin composed of monoclonal anti-Thy 1.1 antibody and a ribosome-inactivating protein from *Saponaria officinalis*: potent antitumor effects in vitro and in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.* 75, 151-159 (1985).
  108. Iglesias, R. *et al.* Molecular action of the type 1 ribosome-inactivating protein saporin 5 on *Vicia sativa* ribosomes. *FEBS Lett.* 325, 291-294 (1993).
  109. Hebestreit, P., Weng, A., Bachran, C., Fuchs, H. & Melzig, M.F. Enhancement of cytotoxicity of lectins by Saponinum album. *Toxicon* 47, 330-335 (2006).
  110. Nolan, B.C. & Freeman, J.H., Jr. Purkinje cell loss by OX7-saporin impairs excitatory and inhibitory eyeblink conditioning. *Behav. Neurosci.* 119, 190-201 (2005).
  111. Heusch, G., Schulz, R., Haude, M. & Erbel, R. Coronary microembolization. *J. Mol. Cell Cardiol.* 37, 23-31 (2004).
  112. Parton, R.G. & Richards, A.A. Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. *Traffic.* 4, 724-738 (2003).
  113. Langhorst, M.F., Reuter, A. & Stuermer, C.A. Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 2228-2240 (2005).
  114. Hagood, J.S. *et al.* Loss of fibroblast Thy-1 expression correlates with lung fibrogenesis. *Am. J. Pathol.* 167, 365-379 (2005).

## **7. REMERCIEMENTS**

J'aimerais d'abord remercier mon directeur de recherche, le Dr Gaétan Thibault, de même que Patrick Couture et Fatiha Bouzeghrane, pour leur joie de vivre, leur soutien et leur enseignement tout au long de ma maîtrise. Toujours prêts à donner un coup de main et à me guider durant mon apprentissage, ils m'ont été d'une grande aide pour la réalisation de ce projet de recherche. Je tiens à souligner l'apport important de Patrick Couture, qui a effectué plusieurs des expériences présentées à la section des résultats complémentaires.

De plus, j'aimerais attribuer un merci spécial aux employés des services offerts par l'Institut de recherche clinique de Montréal. Ils constituent un support inappréciable pour la recherche. Par conséquent, je souligne ici l'aide qui m'a été apportée par Dominic Fillion, en microscopie, Annie Vallée en histologie, Jacques Lavigne en biologie moléculaire, Claudia Jones, Martine Lauzier et Nicole Campeau à la documentation ainsi que Anne Haché aux affaires académiques.

Enfin, il m'est impossible de passer outre au support acharné et aux encouragements permanents de mes parents, ma sœur et mon conjoint. Ils m'ont soutenu financièrement et moralement tout au long de mes longues années d'étude, qui furent souvent mouvementées. Merci.

Merci à vous tous!



