

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

Expression des intégrines de type RGD dans les cellules cardiaques

par
Sandrine JOLY

Programme de Biologie Moléculaire

Faculté des études supérieures

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

Mars 2001



QH
506
154
2001
v. 015

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Expression des intégrines de type RGD dans les cellules
cardiaques

présenté par Sandrine Joly

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Deschepper Christian, *président rapporteur*

Thibault Gaétan, *directeur de recherche*

Gutkowska Jolanta, *membre du jury*

Mémoire accepté le : 22 août 2001

A toi, Vincent, qui m'a aidée, encouragée et soutenue pendant ces trois années de travail.

A toute ma famille, mon père et ma grand-mère.

Sommaire

Le cœur permet l'oxygénation des organes en maintenant une circulation sanguine continue. Les parois des différentes chambres cardiaques sont ainsi soumises à des pressions de par les quantités importantes de sang qu'elles doivent éjecter constamment. Le ventricule gauche est sûrement le plus touché car il assure l'expulsion du sang oxygéné dans tout l'organisme. Des pathologies cardiaques comme l'hypertrophie ventriculaire gauche peuvent survenir.

L'hypertrophie cardiaque résulte en une surcharge de travail (dont l'hypertension) et elle s'accompagne de modifications cellulaires comme une hypertrophie des cardiocytes, une prolifération et une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Ces changements morphologiques nécessitent l'intervention de molécules d'adhésion permettant les interactions cellule/cellule et cellule/protéine de la matrice extracellulaire. Les intégrines sont des protéines hétérodimériques transmembranaires qui interviennent aussi bien dans des processus physiologiques cellulaires (migration, survie, différenciation, cicatrisation, prolifération) qu'au niveau de certaines pathologies (athérosclérose, angiogénèse, migration des cellules cancéreuses, ostéoporose) s'accompagnant de la modification de l'expression de certaines intégrines.

Il est possible que les intégrines soient étroitement impliquées dans les mécanismes de changements morphologiques des cellules cardiaques.

Plus particulièrement, les intégrines de type RGD (Arg-Gly-Asp) possèdent un site de reconnaissance pour ce tripeptide, lui-même porté par les protéines de la matrice extracellulaire comme la vitronectine, la fibronectine, l'ostéopontine, la tenascine,...

Par des méthodes d'immunobuvardage, nous avons caractérisé les intégrines de type RGD à la surface des cellules néonatales. Ainsi, les fibroblastes cardiaques portent les intégrines $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$

alors que les cardiocytes ventriculaires présentent les intégrines $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$. La localisation des différentes intégrines et des foyers d'adhésion a été rendue possible par des expériences d'immunocytochimie.

Pour comprendre la régulation de l'expression des intégrines, nous avons stimulé les cellules néonatales avec différents facteurs de croissance tels l'angiotensine II (All, 10^{-8} M) et l'endothéline-1 (ET-1, 10^{-8} M). Les principaux résultats montrent une hyperplasie (augmentation de la synthèse d'ADN) et une hypertrophie (augmentation de la synthèse des protéines) chez les cardiocytes et les fibroblastes stimulés avec l'All. Cependant, il est apparu évident que les cardiocytes étaient contaminés par les fibroblastes lors de la préparation des cultures cellulaires. Cette contamination, vérifiée par immunocytochimie, a été limitée partiellement par l'emploi d'un agent anti-prolifératif des fibroblastes, l'ara-C. Les cardiocytes traités puis stimulés avec l'ET-1 montrent une hyperplasie et une hypertrophie cellulaires. Nous avons ensuite réalisé des stimulations avec des concentrations croissantes d'All ou d'ET-1 (10^{-11} à 10^{-7} M) respectivement sur les fibroblastes et les cardiocytes néonatales. Les fibroblastes ont également été stimulés avec un mélange d'All (10^{-8} M) et de PD123319 (10^{-5} M), un bloqueur des récepteurs AT_2 pour déterminer l'impact de la présence de ces récepteurs dans les cellules néonatales.

Parallèlement, après chaque stimulation, nous avons regardé l'évolution de l'expression de chaque complexe d'intégrine en quantifiant et normalisant les bandes de radioactivité des gels SDS-PAGE. Nous avons observé l'expression de la fibronectine et de l'ANF synthétisés respectivement par les fibroblastes et par les cardiocytes nouveau-nés.

Finalement, nous avons regardé l'expression des ARNm de certaines sous-unités des intégrines (α_3 , α_v , β_3 et β_1) par des techniques de buvardage northern pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus par immunobuvardage.

En conclusion, les intégrines de type RGD sont présentes à la surface des cardiocytes ventriculaires et des fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés. Du fait de la régulation différentielle de leur expression en présence des facteurs de croissance, nous avons donc démontré que les intégrines sont étroitement associées aux processus de changements morphologiques des cellules cardiaques.

Table des matières

Sommaire	ii
Table des matières	v
Liste des figures	viii
Liste des tableaux	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Chapitre I	1
1- Introduction.	1
1.1- Le myocarde. Généralités.	1
1.1.1- Cycle cardiaque.	1
1.1.2- Physiologie cardiaque.	4
1.1.2.1- Les fibroblastes cardiaques.	5
1.1.2.2- Les cardiocytes ventriculaires.	6
1.2- Influence de la matrice extracellulaire.	8
1.2.1- Le réseau de la MEC.	8
1.2.2- Composantes de la MEC.	9
1.2.3- Description et fonction de chaque composante de la MEC.	9
1.2.3.1- Le collagène.	10
1.2.3.2- La laminine.	15
1.2.4- Rôle privilégié de la fibronectine.	16
2- Interaction entre la matrice extracellulaire et les molécules d'adhésion cellulaire.	18

2.1- Les intégrines.	18
2.1.1- Structure générale.	18
2.1.1.1- La spécificité des ligands des intégrines.	22
2.1.1.2- Les cations divalents.	23
2.1.2- Implication des intégrines dans les maladies.	25
2.1.3- Rôle des différents complexes d'intégrines dans le système cardiovasculaire.	26
2.1.3.1- La sous-unité β_1 .	26
2.1.3.2- Le complexe $\alpha_3\beta_1$.	28
2.1.3.3- Le complexe $\alpha_v\beta_3$.	29
2.1.3.4- Le complexe $\alpha_8\beta_1$.	30
2.1.3.5- Le complexe $\alpha_5\beta_1$.	30
2.1.3.6- Les complexes $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_1\beta_1$.	31
2.2- Signalisation intracellulaire passant par les intégrines.	32
2.2.1- Signalisation "inside-out".	32
2.2.2- Signalisation "outside-in".	33
2.2.3- Signalisation intracellulaire.	34
2.2.3.1- Formations des foyers d'adhésion.	34
2.2.3.2- Signalisation consécutive.	35
2.3- Les désintégrines. Définition et généralités.	37
3- Hypertrophie ventriculaire gauche et facteurs de croissance.	39
3.1- Définition.	39
3.2- Changements survenant lors de l'hypertrophie cardiaque.	40
3.2.1- Les caractéristiques générales.	40
3.2.2- Les caractéristiques cellulaires et moléculaires.	41
Les changements ultrastructuraux.	

3.3- Facteurs influençant l'apparition de l'hypertrophie ventriculaire.	44
3.4- Les facteurs de croissance.	44
3.4.1- Le système rénine-angiotensine.	44
3.4.1.1- L'angiotensine II.	48
3.4.1.1.1- Les effets de l'angiotensine II sur les fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés.	49
3.4.1.1.2- Les effets de l'angiotensine II sur les cardiocytes ventriculaires néonataux.	50
3.4.2- L'endothéline-1.	52
3.4.3- Le TGF- β_1 .	53
3.4.4- L'IGF-1.	53
3.4.5- L'ANP.	54
4- Hypothèse de travail	56
Chapitre II- Méthodologie	58
Chapitre III- Résultats	79
Chapitre IV- Discussion	117
Conclusion	130
Bibliographie	131
Remerciements	xiii

Liste des figures

1- Représentation du cycle cardiaque	3
2- Schématisation de la structure des intégrines	21
3- Représentation schématique des foyers d'adhésion	35
4- Modèle de la phosphorylation des tyrosines stimulée par les intégrines et les voies de signalisation	37
5- Représentation de l'échistatine	38
6- Système rénine-angiotensine	47
 <u>Figures des résultats.</u>	
1- Identification des intégrines présentes sur les fibroblastes cardiaques néonataux	80
2- Identification des intégrines présentes sur les cardiocytes ventriculaires néonataux	81
3- Stimulations des fibroblastes cardiaques néonataux par différents facteurs de croissance	83
4- Profil des intégrines présentes sur les fibroblastes cardiaques néonataux	84
5- Stimulations des cardiocytes ventriculaires néonataux par différents facteurs de croissance	87
6- Stimulations des cardiocytes ventriculaires néonataux traités par l'ara-C avec différents facteurs de croissance	88
7- Profil des intégrines présentes sur les cardiocytes ventriculaires néonataux non traités par l'ara-C	89
8- Profil des intégrines présentes sur les cardiocytes ventriculaires néonataux traités par l'ara-C	90
9- Courbe dose-réponse d'angiotensine II chez les fibroblastes cardiaques néonataux	92
10- Profil des intégrines présentes sur les fibroblastes	93

cardiaques néonataux stimulés par différentes concentrations d'angiotensine II	
11- Courbe dose-réponse d'endothéline-1 chez les cardiocytes ventriculaires néonataux traités par l'ara-C	95
12- Profil des intégrines présentes sur les cardiocytes ventriculaires néonataux, traités par l'ara-C, stimulés par différentes concentrations d'endothéline-1	96
13- Effets des facteurs de croissance chez les fibroblastes cardiaques néonataux	98
14- Profil des intégrines présentes sur les fibroblastes cardiaques néonataux	99
15- Dosage de la fibronectine par méthode ELISA après stimulations des fibroblastes cardiaques néonataux par différents facteurs de croissance	102
16- Dosage de la quantité d'ANF par dosage radioimmunologique chez des cardiocytes néonataux non traités (A) et traités par l'ara-C (B) après stimulations par différents facteurs de croissance	104
17- Double immunocytochimie sur les fibroblastes cardiaques néonataux	108
18- Double immunocytochimie sur les fibroblastes cardiaques néonataux	109
19- Double immunocytochimie sur les cardiocytes ventriculaires sans ara-C et traités à l'ara-C	110
20- Double immunocytochimie sur les cardiocytes ventriculaires néonataux traités par l'ara-C	111
21- Double immunocytochimie sur les cardiocytes ventriculaires néonataux	112
22- Photo du gel d'agarose 1%	115
23- Buvardages northern obtenus après exposition des membranes de nylon au phosphor-imager	116

Liste des tableaux

1- Spécificité des ligands des intégrines	24
2- Changements survenant au niveau des protéines composant le cytosquelette lors de l'hypertrophie	43

Liste des sigles et des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

a-FGF : "Acidic Fibroblast Growth Factor".

Ang II : Angiotensine II.

AMP_c : Adénosine monophosphate cyclique.

ANP ou ANF : "Atrial Natriuretic Peptide".

ARN : Acide ribonucléique.

ARNm : ARN messenger.

ARNr : ARN ribosomal.

β -MHC : " β - myosin heavy chain".

b-FGF : "Basic Fibroblast Growth Factor".

BNP : "Brain Natriuretic Peptide".

BSA : "Bovine Serum Albumin".

CNP : "C-type Natriuretic Peptide".

DMEM : "Dubelcco's Modified Eagle Medium".

ECG : Electrocardiogramme.

EDTA : Acide éthylènediaminetétraactétique.

E.T. : Ecart-type.

ET-1 : Endothéline-1.

FAK : "Focal Adhesion Kinase".

FBS : Sérum foetal de bovin.

FN : Fibronectine.

HRP : "Horseradish Peroxidase".

IGF-1 : "Insulin-like growth factor-1".

JNK : "Jun N-terminal Kinase".

K_d : Constante de dissociation.

kDa : Kilodalton.

MAPK : "Mitogen Activated Protein Kinase".

MEC : Matrice extracellulaire.

MVG : Masse du ventricule gauche.
NGS : "Normal Growth Serum".
NMDGF : "Non-Myocyte Derived Growth Factor".
OD : Oreillette droite.
OG : Oreillette gauche.
PBS : "Phosphate buffer saline".
PDGF : "Platelet Derived Growth Factor".
PMSF : Phenylmethylsulfonylfluoride.
RIA : Dosage radio-immunologique.
SDS : Sodium dodécyl sulfate.
TCA : Acide trichloroacétique.
TEMED : N, N, N', N'-tétraméthyléthylènediamine.
TGF- β_1 : "Transforming Growth Factor- β_1 ".
TNF- α : "Tumor Necrosis Factor- α ".
VD : Ventricule droit.
VG : Ventricule gauche.

Chapitre I.

1- Introduction.

1.1- Le myocarde. Généralités.

Le cœur est une pompe musculaire qui peut envoyer le sang continuellement dans tout le corps (Katz, 1977). La double fonction du cœur se manifeste grâce à l'activité contractile de ses parois musculaires : propulser le sang à travers le corps pour délivrer les nutriments et éliminer les déchets de chaque organe. Il permet également le transport d'hormones et d'autres substances de régulation (Katz, 1977) .

1.1.1- Cycle cardiaque.

Chez l'embryon, le cœur est un organe tubulaire qui initialise et maintient la circulation du sang.

Le cœur adulte est constitué de quatre chambres de pompage : les oreillettes et les ventricules droits et gauches. Les deux ventricules sont séparés par un septum interventriculaire (Katz, 1977). Des valvules atrioventriculaires permettent d'empêcher le reflux sanguin des ventricules vers les oreillettes (la valvule tricuspide se trouve à droite et la valvule mitrale ou bicuspidie est située à gauche) (Katz, 1977).

Les deux oreillettes sont des chambres musculaires aux fines parois, signe d'une faible pression développée par les cavités auriculaires. Au contraire, les ventricules (surtout le gauche) ont des parois musculaires épaisses pour permettre une activité musculaire très importante, notamment pendant la systole cardiaque (Katz, 1977).

La figure 1 permet de résumer le déroulement du cycle cardiaque (Katz, 1977).

Lorsque les pressions sont égales dans les oreillettes et les ventricules, le sang non oxygéné arrive des veines caves et se déverse dans l'OD tandis que le sang oxygéné des veines pulmonaires se déverse dans l'OG. La pression augmente progressivement dans les oreillettes. La contraction des oreillettes (systole auriculaire) provoque l'ouverture des valvules et le déversement du sang dans les deux ventricules. Les ventricules remplis se contractent à leur tour (systole ventriculaire), les valvules auriculo-ventriculaires se ferment, le sang est éjecté dans les artères aortiques (VG) et pulmonaires (VD). Dans le même temps, le sang afflue à nouveau des veines dans les oreillettes. Le ventricule revient à son état initial de relaxation (diastole ventriculaire). Un nouveau cycle recommence.

Sur un électrocardiogramme, ces phases sont visualisées par un complexe PQRST. Le complexe PR correspond à la dépolarisation auriculaire conduisant à la systole auriculaire, la phase allant de R à P correspond à la diastole auriculaire. Le complexe QRST correspond à la dépolarisation ventriculaire menant à la systole ventriculaire (cette phase masque la repolarisation auriculaire entre Q et R) alors que la diastole ventriculaire va de T à P.

La systole cardiaque peut être définie comme étant l'éjection du sang dans les artères par contraction ventriculaire alors que la diastole cardiaque correspond à la phase où le sang quitte les artères et gagne le ventricule.

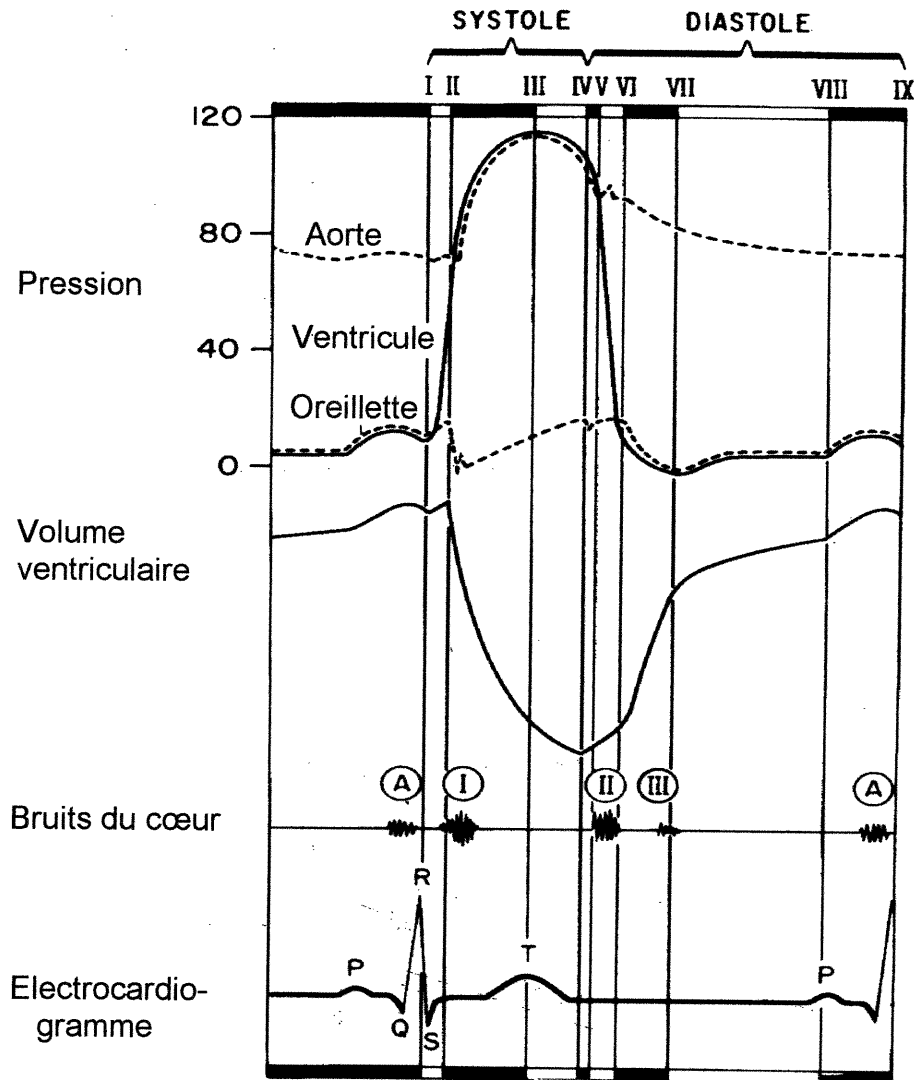


Figure 1 : Représentation du cycle cardiaque (tiré du livre *Physiology of the Heart* de Arnold M. Katz (1977)).

Légende pour les bruits du cœur : A : bruit auriculaire ; I : premier bruit cardiaque ; II : deuxième bruit cardiaque ; III : troisième bruit cardiaque.

1.1.2- Physiologie cardiaque.

Bien que le cœur soit un muscle, sa fonction et sa structure sont bien plus complexes que celles du muscle squelettique (Katz, 1977). Quand elles reçoivent une stimulation du système nerveux central, les fibres musculaires squelettiques se contractent de manière stéréotypée alors que pour le cœur, il existe des éléments contractiles qui modulent l'action cardiaque pour une adaptation constante aux éventuelles demandes de l'organisme (Katz, 1977). Le potentiel d'action cardiaque est initié par des cellules musculaires spécialisées (les cellules "pacemaker" situées dans l'OD).

Le cœur est innervé par des fibres sympathiques (qui sécrètent l'adrénaline) et parasympathiques (comme le nerf X, responsable de la synthèse de l'acétylcholine). Ces fibres modulent à la hausse ou à la baisse certains paramètres de la fonction cardiaque tels que la fréquence cardiaque, la force de contraction, etc (Katz, 1977).

Dans le myocarde, on trouve toute une population de cellules. Certaines cellules sont appelées "cellules de travail". Elles sont spécialisées dans la contraction et elles forment deux réseaux fondamentaux : le réseau des fibres de Purkinje (Katz, 1977), qui conduit rapidement l'influx nerveux à travers le cœur, et les fibres de Tawara (Katz, 1977) constitué par les cellules du nœud sinoatrial et atrioventriculaire (responsables de l'activité pacemaker et de la conduction de l'influx atrioventriculaire, respectivement) (Weber et al., 1991). Le cœur contient également d'autres types de cellules :

- Les cardiocytes ou myocytes cardiaques qui sont les cellules les plus grosses. Elles occupent à elles seules 75% de l'espace structural et représentent un tiers de la population cellulaire totale (Weber et al., 1991 ; Weber, 1989 ; Ju et al., 1996 ; Weber, 1992). Ce sont les éléments contractiles du cœur.

L'interstitium cardiaque est l'espace extracellulaire ne contenant pas les cardiocytes mais rempli par les capillaires, la substance intercellulaire, le

collagène fibrillaire, et l'élastine, les vaisseaux lymphatiques, les artères coronaires intramyocardiales, les artérioles et les veinules, les fibres adrénergiques et d'autres types de cellules spécialisées comme (Weber, 1992) :

- Les cellules endothéliales sont rencontrées dans les vaisseaux lymphatiques, les coronaires et aussi l'endocarde. Ces cellules ont une influence sur la réactivité vasomotrice des vaisseaux sanguins (Weber et al., 1991 ; Ju et al., 1996).
- Les cellules vasculaires du muscle lisse, localisées au niveau des artères coronaires de l'épicarde et intramyocardiques, dans les artérioles. Elles influencent les capacités vasodilatatrices et la réactivité de ces vaisseaux (Weber et al., 1991 ; Ju et al., 1996).
- Les fibroblastes cardiaques, cellules multipotentes, libres dans l'espace interstitiel. Elles sont responsables de la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire notamment de la production et de la dégradation du collagène de type I et III (Weber et al., 1991 ; Ju et al., 1996).
- Les macrophages et les cellules souches, qui défendent l'organisme contre une éventuelle invasion par des corps étrangers (Weber et al., 1991).

1.1.2.1- Les fibroblastes cardiaques (Eghbali, 1992 ; McKenna et al., 2000).

Présents dans l'interstitium, les fibroblastes cardiaques constituent la majorité (plus de 90%) des cellules non contractiles (Eghbali, 1992 ; McKenna et al., 2000). Ils jouent un très grand rôle dans le développement musculaire et la différenciation des myoblastes. Les fibroblastes produisent une matrice hautement organisée servant à interconnecter les cardiocytes entre eux et également à connecter les cardiocytes aux capillaires voisins (Eghbali, 1992 ; McKenna et al., 2000).

Les fibroblastes cardiaques sont capables de synthétiser et de rejeter, dans le milieu extérieur, de nombreuses hormones (l'endothéline-1,

l'angiotensine II) (McKenna et al., 2000), une grande variété de facteurs de croissance (le TNF- α , le TGF- β , le b-FGF) (McKenna et al., 2000), et des protéines de la MEC comme la fibronectine, les collagènes type I, III et V, la laminine,...(Eghbali, 1992 ; McKenna et al., 2000).

La fonction des fibroblastes (prolifération cellulaire, expression des gènes de la MEC, activité de la collagénase, excrétion des facteurs de croissance) peut être modulée par des facteurs de croissance libérés de manière autocrine ou paracrine (McKenna et al., 2000). Des expériences ont montré que ce sont des voies de transduction comme la voie des MAPK qui sont impliquées dans cette régulation (McKenna et al., 2000).

De plus, des cellules du mésenchyme ventriculaire (ou fibroblastes) de rats nouveau-nés âgés d'un jour possèdent, en culture, les récepteurs pour les peptides natriurétiques suivants : ANP, BNP et CNP (Cao et al., 1995).

1.1.2.2- Les cardiocytes ventriculaires.

Les cardiocytes représentent seulement 1/3 du nombre total des cellules mais leur volume occupe plus des 2/3 du cœur (Weber, 1989). Leur forme ovoïde et les myofibrilles distribuées aléatoirement dans le sarcoplasme pendant la période embryonnaire font place, au fur et à mesure que le développement se produit, à des cellules allongées en forme de bâtonnets. Les myofibrilles se redistribuent en réseaux. Les cellules acquièrent le phénotype contractile (Simpson et al., 1994). Cependant, elles perdent leur capacité de division cellulaire trois semaines après la naissance (Itoh et al., 1991). La polyploïdie existe chez les cardiocytes ventriculaires néonataux qui peuvent alors contenir deux noyaux. La matrice extracellulaire joue encore un grand rôle dans la régulation de la forme de cette cellule cardiaque (Simpson et al., 1994).

La croissance des cardiocytes ventriculaires ne peut se faire que par une hypertrophie cellulaire (Weber et al., 1991) vue l'incapacité des cellules à se diviser. Ce grossissement cellulaire peut être causé par de nombreux facteurs de croissance comme a-FGF, b-FGF, PDGF, TNF- α , TGF- β (Long et al., 1991).

En 1985, de Bold a démontré que les cardiocytes auriculaires sécrètent de l'ANP (facteur diurétique et vasorelaxant des artères) à partir de granules de sécrétion. Depuis, il a été montré que les cardiocytes ventriculaires contiennent également le gène de l'ANP (Nemer et al., 1986 ; Urbain et al., 1989). Cependant, les granules de sécrétion dans les cardiocytes ventriculaires étant moins nombreux que dans les cardiocytes auriculaires, l'ANP est présent en moins grande quantité (Nemer et al., 1986). Il joue néanmoins un rôle physiologique significatif. Après la naissance, la concentration d'ARNm du gène de l'ANP diminue précipitamment dans les ventricules, pour atteindre, dans le cœur adulte, des niveaux 100 fois inférieurs à ce que l'on trouve dans l'oreillette (Thibault et al., 1989). En effet, chez l'adulte, plus de 95% de l'ANP se situe au niveau des oreillettes. Ce peptide est exprimé de nouveau dans les ventricules pendant l'hypertrophie cardiaque : on parle de gène marqueur de l'hypertrophie (Urbain et al., 1989).

Il faut toutefois noter qu'il existe une interaction entre cardiocytes ventriculaires et fibroblastes cardiaques (Long et al., 1991 ; Harada et al., 1998 ; Simpson et al., 1982 ; Harada et al. 1997a). En effet, il a été montré que, sous l'influence des fibroblastes cardiaques, les cardiocytes peuvent se différencier (Simpson et al., 1982), s'hypertrophier (Long et al., 1991 ; Harada et al., 1998 ; Harada et al., 1997a). La taille des cardiocytes en co-culture avec des fibroblastes augmente par interaction directe cardiocytes/fibroblastes ou par l'existence de facteur(s) paracrine(s) (Long et al., 1991 ; Harada et al., 1998).

L'Angiotensin II serait impliquée dans l'interaction cardiocytes/fibroblastes lors de la réponse hypertrophique des cardiocytes (Harada et al., 1998 ; Harada et al., 1997b ; Gray et al., 1998).

De nombreuses équipes (Harada et al., 1998 ; Harada et al., 1997b ; Fujisaki et al., 1995) ont montré que les fibroblastes régulent l'hypertrophie des cardiocytes par sécrétion d'ET-1. Pour d'autres chercheurs, l'ET-1 ne serait pas responsable de l'augmentation de la synthèse des protéines menant à l'hypertrophie des cardiocytes (Booz et al., 1999).

De ce fait, en 1991, Long et ses collaborateurs identifient un nouveau facteur, le NMDGF ("Non-Myocyte Derived Growth Factor"), produit par les fibroblastes, qui agirait sur les cardiocytes. Depuis, des chercheurs ont confirmé l'existence d'un tel facteur. En 1997, Sen isole et caractérise un facteur d'environ 65 kDa issu des fibroblastes, qui agit spécifiquement et exclusivement sur les cardiocytes. En 1999, Booz et son équipe montrent l'existence d'un facteur, produit par les fibroblastes, qui active rapidement la croissance des cardiocytes à travers un récepteur membranaire.

1.2- Influence de la matrice extracellulaire.

1.2.1- Le réseau de la MEC.

La matrice extracellulaire, réseau complexe de composants moléculaires différents (Pelouch et al., 1994), établit des connexions physiques parmi les cellules constitutives du cœur (Ju et al., 1996). Elle est importante pour le maintien de la structure et de la fonction cardiaque et des tissus vasculaires (Ju et al., 1996).

L'adhésion au substrat constitue un ancrage pour les cellules et son absence empêche la prolifération cellulaire (Dalton et al., 1995). C'est donc un facteur essentiel à la prolifération, requis pour une réponse efficace des cellules face aux facteurs de croissance et pour l'activation des voies de

signalisation intracellulaire ; elle est nécessaire pour la régulation du cycle cellulaire (Dalton et al., 1995).

La matrice extracellulaire est soumise à de fréquents changements (fibrose cardiaque, variations dans les proportions du collagène) comme ceux qui se produisent lors du développement « ontogénique », du vieillissement post-natal, lorsque la nutrition est anormale ou qu'il y a une hypoxie intermittente (Pelouch et al., 1994). C'est une entité dynamique et son altération traduit le plus souvent un dysfonctionnement cardiaque (Pelouch et al., 1994) comme l'hypertension, l'hypertrophie cardiaque ou même le diabète (Pelouch et al., 1994 ; Ju et al., 1996). Ainsi, un déséquilibre entre les protéines de la MEC et les protéines contractiles caractérise l'hypertrophie cardiaque (Pelouch et al., 1994) avec apparition de fibrose, accumulation de collagène et de fibronectine (Ju et al., 1996).

1.2.2- Composantes de la MEC.

D'après ce que nous avons vu au paragraphe précédent, la matrice extracellulaire est un réseau complexe de molécules assemblées les unes aux autres, formant un échafaudage solide pour la structure cardiaque.

Les principaux composants de la MEC peuvent être soit des protéines fibreuses (collagène structural et élastine) soit des molécules adhésives ou non comme la fibronectine, la vitronectine, la laminine et les protéoglycans (Ju et al., 1996 ; Borg et al., 1996 ; Yurchenco et al., 1990; Swynghedauw, 1999).

1.2.3- Description et fonction de chaque composante de la MEC.

1.2.3.1- Le collagène.

Le collagène est l'élément élastique majeur du myocarde et il forme un réseau membranaire continu tridimensionnel stable (Weber, 1989 ; Yurchenco

et al., 1990). Birk et Trelstad (1984) ont démontré que ce sont les fibroblastes qui orientent les fibres de collagène (Weber, 1989) tandis qu'Eghbali et ses collaborateurs (1988 et 1989) montrent que le collagène et son enzyme de dégradation, la collagénase, sont synthétisés par les fibroblastes cardiaques (Weber, 1989 ; Weber et al., 1994). La biosynthèse du collagène est régulée pendant la croissance et le vieillissement (Eghbali et al., 1988).

La synthèse de collagène se fait par un ensemble de modifications post-traductionnelles (hydroxylation, glycosylation et formations de ponts disulfures) où une chaîne α de pro-collagène donne naissance à la fibrille de collagène (Bishop et al., 1995). La synthèse de collagène est mesurée par dosage de la proline ou de l'hydroxyproline (Bishop et al., 1995), acides aminés très abondants qui assurent la stabilité de la fibre de collagène (Bishop et al., 1995). La demi-vie du collagène est de 80 à 120 jours (Weber, 1989) et, journalièrement, son taux de synthèse est variable d'une espèce à l'autre: par exemple, il est de 0,88% chez le jeune coq, de 0,56% dans les ventricules du chien et de 0,6% chez l'homme.

Le développement du collagène peut être stoppé par certaines molécules comme le β -aminopropionitrile (BAPN) ou certains oligoéléments (cuivre) (Bishop et al., 1995) alors que plusieurs facteurs de croissance peuvent stimuler sa synthèse ; c'est par exemple le cas pour le PDGF (mitogène impliqué dans l'athérosclérose, la cicatrisation, le développement des cellules mésenchymateuses) ou le b-FGF.

Dans le tissu cardiaque, il existe cinq isoformes du collagène : type I, III, IV, V et VI (Ju et al., 1996).

Le type IV est produit par les cellules endothéliales et les cardiocytes dans les membranes basales (Bishop et al., 1995 ; Ju et al., 1996 ; Weber, 1989 ; Weber et al., 1991); il permet une régulation du transport membranaire et intervient également dans l'adhésion cellulaire.

Le type V, particulièrement abondant dans le tissu vasculaire, (Bishop et al., 1995 ; Ju et al., 1996) coexiste avec le type IV et s'intercale entre les types I et III dans l'interstitium. On le trouve au niveau du muscle lisse et des cellules endothéliales où il jouerait un rôle dans la forme des cellules en constituant un exocytosquelette. Il a aussi un rôle au niveau de l'adhésion cellulaire (Bishop et al., 1995 ; Ju et al., 1996).

Le type VI (Bishop et al., 1995 ; Ju et al., 1996), présent dans l'interstitium, est associé aux autres collagènes fibrillaires et il participe probablement à la régulation du diamètre des fibres, il a un rôle structural. Les deux types de collagène les plus rencontrés dans l'interstitium cardiaque sont les types I et III (Weber, 1989 ; Ju et al., 1996). Ils ont un rôle structural très important car les propriétés physiques du tissu sont influencées par la proportion relative des collagènes de type I et III (Bishop et al., 1995). Par exemple, une diminution du rapport entre les types I et III se produit pendant la cicatrisation (Weber et al., 1991); de même, la quantité du type III augmente de la première semaine jusqu'à 6 mois de développement (Bishop et al., 1995).

Les valvules, le "chordae tendineae" et la matrice de collagène du myocarde sont principalement constitués de collagène de type I et III (Weber, 1989). Les ARNm du collagène fibrillaire de type I et III sont présents dans les fibroblastes qui constituent leur lieu de synthèse et de dégradation privilégié (Eghbali et al., 1988).

Il a été démontré que le type I est plus rigide que le type III (Weber, 1989 ; Ju et al., 1996). Chacun de ces deux types a des caractéristiques bien précises :

Type I	Type III
- présent dans le cœur de rat et celui des grands singes.	- présent dans le cœur de rat et celui des grands singes.
- représente 85% de la matrice totale (Weber et al., 1991 ; Weber, 1989)	- représente 1/3 du collagène total pendant la période néonatale ; puis seulement 11% chez l'adulte dont 20% contenu dans les valvules (Weber et al., 1991 ; Weber, 1989)
- agrégation dominante en fibres épaisses (Weber, 1989)	- Formations de fibres fines (Weber, 1989)
- Composante majeure de la fibrose (Weber et al., 1991 ; Weber, 1989 ; Weber et al., 1994).	- Réponse précoce à la cicatrisation (Weber et al., 1991)

On attribue plusieurs fonctions au collagène (Weber, 1989): il permet la réalisation d'un échafaudage qui supporte les cellules musculaires et les vaisseaux sanguins; il établit des connexions latérales entre les cellules et les faisceaux musculaires de manière à gouverner l'architecture. Les collagènes de type I et III sont essentiels au maintien structural du myocarde et à la fonction des battements cardiaques (Weber et al., 1994). Ils permettent au myocarde de résister aux déformations : ainsi en maintenant force et épaisseur de la paroi, ils empêchent la rupture ventriculaire. De ce fait, on parle d'un réseau de collagène constitué de trois composantes (Borg et al., 1996 ; Weber, 1989 ; Weber, 1992 ; Eghbali et al., 1988).

Les méthodes de microscopie ont permis de les mettre en évidence: l'épimysium qui donne naissance au périmysium, qui, à son tour, génère l'endomysium. Chacune de ces trois structures est spécifique :

✓ L'endomysium : il connecte les cardiocytes adjacents entre eux et également aux capillaires lymphatiques et vasculaires voisins (Weber, 1992 ;

Eghbali et al., 1988). Borg et Caulfield (Weber, 1989) ont démontré que les fibres endomysiales servent de support. Leur rôle est d'influer sur les propriétés élastiques des cardiocytes (Weber, 1989), de préserver l'architecture et l'épaisseur du myocarde (Weber, 1992), de coordonner la synergie des contractions grâce à l'alignement des cardiocytes (Weber, 1989 ; Weber, 1992).

✓ Le pérимыsium : ce sont des extensions permettant le rassemblement des cardiocytes ou faisceaux musculaires (Weber, 1989 ; Eghbali et al., 1988 ; Weber, 1992). On le localise dans l'espace intermusculaire. Les fibres de pérимыsium formées stockent l'énergie en fin de contraction des cardiocytes pour permettre leur élongation éventuelle et une relaxation des ventricules cardiaques.

✓ L'épимыsium représente le collagène fibrillaire qui lie l'endothélium épикаrdique et l'endocarde (Weber, 1989 ; Eghbali et al., 1988). On a démontré que l'épимыsium protégeait les fibres musculaires cardiaques d'un étirement trop important.

L'endomysium et le pérимыsium permettent au ventricule de retrouver sa forme et sa taille initiales pendant le relâchement musculaire (Weber, 1992).

A la naissance, la quantité de collagène est identique dans les deux ventricules puis, pendant la période néonatale, la concentration de collagène augmente dans le ventricule droit par rapport au ventricule gauche (Weber, 1989).

En 1960, Hort (Weber, 1989) propose que la matrice de collagène du myocarde empêche sa dilatation excessive. Dans un état non pathologique, les fibres de collagène subissent des transformations adaptatives qui facilitent la croissance concentrique du myocarde et sa force de génération. L'état devient pathologique quand il y a modifications des concentrations de collagène I et III (ceci influence les propriétés physiques du tissu (Weber, 1992)) et altération de l'alignement du collagène et des fibres musculaires, modifications dans l'architecture des valves et du myocarde (Weber, 1989).

Il semblerait que cette glycoprotéine accompagne l'hypertrophie et la surcharge de pression. On aurait alors une prolifération fibroblastique aboutissant à l'accumulation de collagène, une diminution de la dimension des fibres donnant lieu à un remodelage structural et biochimique de la matrice (Weber, 1989). Une rupture de la paroi peut être causée par une perte de collagène (Ju et al., 1996).

Dans des conditions normales, on suppose qu'il y a un équilibre entre la synthèse et la dégradation du collagène car la masse de cette molécule est stable (Weber, 1989 ; Weber et al., 1994). Néanmoins, à l'heure actuelle, on n'a pas encore mesuré ce paramètre (Weber, 1989). Les enzymes responsables de sa dégradation sont les métalloprotéinases MMP-1, MMP-2 et MMP-9, appartenant toutes au groupe des collagénases (Weber, 1989 ; Weber et al., 1994), synthétisée par les fibroblastes cardiaques. Par des expériences d'immunohistochimie, Montfort et Perez-Tamayo (Weber, 1989 ; Weber et al., 1994) ont montré que la collagénase est stockée dans le périmysium et l'endomysium et non dans les fibroblastes (Weber, 1989).

La dégradation du collagène a lieu soit par une voie intracellulaire (passant par les lysosomes), soit par une voie extracellulaire (en utilisant les métalloprotéinases) (Bishop et al., 1995).

Les métalloprotéinases (ou collagénases) sont des enzymes dépendantes du calcium et du zinc, importantes pour la résorption complète de tous les composants des matrices extracellulaires, dans les processus physiologiques normaux et pathologiques (Dollery et al., 1995). Elles permettent de conserver l'homéostasie de la paroi vasculaire (Dollery et al., 1995). Il existe des inhibiteurs des métalloprotéinases appelées TIMPs ("Tissue Inhibitor of Metalloproteinases") (Dollery et al., 1995).

1.2.3.2. La laminine.

C'est une glycoprotéine de 850 kDa (Yurchenco et al., 1990) composée de trois sous-unités (Ju et al., 1996) possédant une chaîne A (400 kDa) et deux chaînes B homologues (200 kDa).

La laminine forme des polymères comme le collagène de type IV et quand le collagène est absent, elle peut constituer à elle seule le réseau (Yurchenco et al., 1990). *In vitro*, elle peut former de gros polymères et la grosseur de l'assemblage dépend de la température, de la durée et de la concentration. La polymérisation nécessite la présence de certains cations divalents, notamment le Ca^{2+} et l'auto-assemblage peut se faire en deux étapes : une formant un oligomère dépendant de la température et l'autre formant un polymère dépendant du Ca^{2+} . La moitié de l'agrégation maximale est réalisée pour une concentration de 10 à 15 μM de Ca^{2+} (si on utilisait le magnésium, il faudrait une concentration 10 fois plus grande pour obtenir la moitié de l'agrégation maximale). La polymérisation ou l'agrégation de la laminine peut être inhibée par des fragments de la molécule elle-même.

La laminine cardiaque est une protéine que l'on retrouve au niveau de la membrane basale des cardiocytes et des fibroblastes cardiaques avec des liaisons possibles au collagène type I, III, IV (Ju et al., 1996). Elle peut aussi s'associer très étroitement avec la protéine entactine/nidogène, glycoprotéine sulfatée de 150 kDa, découverte par Chung et son équipe (Yurchenco et al., 1990). L'affinité de la liaison est très forte entre ces deux molécules ($K_D = 1-10$ nM). Comme l'entactine/nidogène lie également le collagène type IV, cette molécule peut agir comme un pont entre les deux protéines principales de la membrane basale. Toutefois, les extrémités des bras de la laminine peuvent interagir directement avec la chaîne du collagène de type IV. C'est cet assemblage qui constitue l'architecture de la matrice extracellulaire.

La laminine est la protéine de la MEC que l'on détecte le plus tôt dans l'embryogénèse (Price et al., 1992). Elle est présente à tous les stades de développement (embryonnaire, néonatal et adulte), seule la distribution spatio-temporelle varie dans l'embryon mûre (Price et al., 1992). De plus, elle est abondamment localisée dans des "zones de spécialisation morphologiques" (Ju et al., 1996 ; Price et al., 1992 ; Schaper et al., 1992) comme les bandes Z du sarcomère. Elle est nécessaire au développement et à la survie de nombreux tissus et organes ainsi qu'au développement des jonctions neuromusculaires (Price et al., 1992 ; Pelouch et al., 1994). Elle joue un rôle dans l'adhésion cellulaire, la migration, la croissance, la différenciation (Price et al., 1992 ; Schaper et al., 1992 ; Yurchenco et al., 1990) et c'est le substrat essentiel des cardiocytes adultes en culture (Price et al., 1992 ; Schaper et al., 1992). Dans ce cas, la laminine facilite l'étalement et la survie *in vitro* des cardiocytes adultes isolés.

1.2.4- Rôle privilégié de la fibronectine.

C'est une glycoprotéine de la MEC distribuée de manière homogène à travers l'espace extracellulaire et généralement, elle se situe à proximité du collagène (Ju et al., 1996). Elle possède aussi de nombreux sites de liaison pour les molécules d'héparine, de fibrines et de protéoglycans (Ju et al., 1996 ; Ahumada et al., 1984) ce qui permet la formation d'une matrice extracellulaire complexe.

Cette glycoprotéine dimérique est constituée de plusieurs séquences répétitives appelées modules (Schwarzbauer et al., 1999 ; Hynes, 1999). La fibronectine se présente d'abord dans un état inactif, sous la forme d'un dimère soluble (Schwarzbauer et al., 1999). Les récepteurs (intégrines), ancrées dans la membrane plasmique, vont se lier aux dimères et entraînent alors un changement conformationnel au cours duquel la fibronectine devient active (Schwarzbauer et al., 1999). Le regroupement des récepteurs permet

de lier plus de dimères et on aboutit à la formation de fibrilles conduisant à un réseau dense (Schwarzbauer et al., 1999).

L'ARNm de la fibronectine peut également subir des processus d'épissages alternatifs ce qui amène à la formation de multiples isoformes, présents dans le tissu cardiaque (Ju et al., 1996 ; Schwarzbauer et al., 1999 ; Farhadian et al., 1995). Les deux formes les plus connues sont les formes pFN et cFN (Farhadian et al., 1995 ; Ruoslahti et al., 1982 ; Farhadian et al., 1996). pFN, dimère circulant synthétisé par le foie, s'accumule dans l'espace interstitiel et est responsable de nombreux changements morphologiques cardiaques (Farhadian et al., 1995 ; Ruoslahti et al., 1982). cFN, quant à lui, dimère cellulaire synthétisé localement, n'a pas de rôle majeur pendant la différenciation cardiaque (Farhadian et al., 1995 ; Ruoslahti et al., 1982).

La fibronectine plasmatique a la propriété de précipiter avec le fibrinogène et d'autres protéines quand le plasma est conservé au froid (Ruoslahti et al., 1982). C'est une molécule relativement sensible à la protéolyse et, chez les fibroblastes en culture, elle peut être isolée par extraction avec de basses concentrations d'urée (Ruoslahti et al., 1982). Il faut également noter que lorsque la concentration est supérieure à un mg/mL, la fibronectine a tendance à être insoluble suite à la présence de ponts disulfures (Ruoslahti et al., 1982).

La double immunofluorescence a montré que les fibrilles de fibronectine subcellulaire se colocalisent, le plus souvent, avec les microfilaments d'actine (Hynes et al., 1982). En effet, à la base des cellules, il existe des associations transmembranaires étroites entre la fibronectine et les filaments d'actine visualisées par microscopie électronique (Hynes et al., 1982).

La fibronectine est synthétisée de manière prédominante par les cellules mésenchymateuses (Farhadian et al., 1995). Elle a plusieurs rôles

très importants : la migration cellulaire, la prolifération dans le développement embryonnaire, la cicatrisation (Ju et al., 1996 ; Hynes, 1999), la survie et la différenciation cellulaire (Hynes, 1999 ; Farhadian et al., 1995). Elle est également un acteur très important dans le mécanisme de l'oncogénèse (Farhadian et al., 1995) et de la vasculogénèse (Farhadian et al., 1996).

2- Interaction entre la matrice extracellulaire et les molécules d'adhésion cellulaire.

La croissance cellulaire, la différenciation, la formation des jonctions, la polarité sont influencées par différents récepteurs. Plusieurs familles de récepteurs d'adhésion ont été identifiées (Humphries et al., 1998 ; Albelda et al., 1990) et on trouve principalement les molécules d'adhésion de la superfamille des immunoglobulines (Albelda et al., 1990), les LEC-CAMs (Albelda et al., 1990), les cadhérines (Humphries et al., 1998), les sélectines (Humphries et al., 1998) et les intégrines.

2.1- Les intégrines.

2.1.1- Structure générale.

Ce sont toutes des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires (Humphries et al., 1998 ; Hynes, 1992 ; Albelda et al., 1990). Comme le montre la figure 2, elles sont constituées de deux sous-unités, une sous-unité α et une sous-unité β , associées de manière non-covalente (Humphries et al., 1998 ; Hynes, 1992 ; Albelda et al., 1990). A l'heure actuelle, on connaît plus de 16 sous-unités α et 8 sous-unités β chez l'humain ; il existe plus de 22 dimères différents formés par l'association d'une sous-unité de chaque type (Humphries et al., 1998). Chaque sous-unité est constituée d'un domaine extracellulaire ou N-terminal (poids moléculaire supérieur à 75 kDa pour les sous-unités β et supérieur à 100 kDa pour les

sous-unités α) (Hynes, 1992), une portion transmembranaire hydrophobe et un court domaine cytoplasmique (ou C-terminal) constitué d'une cinquantaine d'acides aminés (Hynes, 1992 ; Albelda et al., 1990 ; Hillis et al., 1996 ; Hsueh et al., 1998).

La sous-unité β (90 à 110 kDa) montre une très grande conservation au niveau des acides aminés (Hynes, 1992 ; Hillis et al., 1996). En effet, il y a une homologie de 40 à 48% dans leur séquence et certaines caractéristiques structurales ont été conservées parmi les espèces comme les mammifères, les oiseaux, les amphibiens, les insectes et les champignons (Albelda et al., 1990). Toutes les sous-unités β sont constituées d'un segment riche en cystéine, soit 56 résidus cystéines conservés et liés de manière interne par des liaisons disulfures fortes (Hynes, 1992 ; Hillis et al., 1996). Dans la partie extracellulaire de forme globulaire (Hynes, 1992), une portion de 40 à 50 kDa est repliée de manière serrée par des boucles disulfures internes (Hynes, 1992). Cette partie contribue au domaine de liaison du ligand (Hynes, 1992). La sous-unité β_4 constitue une exception à toute cette organisation. Elle a un poids moléculaire de 210 kDa, possède 48 résidus cystéines (Hillis et al., 1996) et son domaine cytoplasmique compte 1000 acides aminés (Hynes, 1992).

La sous-unité α (120 à 180 kDa) comprend plus de séquences hétérogènes que la sous-unité β (Albelda et al., 1990 ; Hillis et al., 1996). Le maximum de similitude est observé pour les domaines extracellulaires de la sous-unité α (Hillis et al., 1996). La sous-unité α est constituée de 7 répétitions d'un segment homologue (Hynes, 1992). Les propriétés de liaison des cations divalents sont contenues dans des séquences situées dans les trois ou quatre dernières répétitions. Ces cations divalents sont essentiels à la fonction de l'intégrine (Hynes, 1992). Certaines sous-unités α subissent des clivages post-traductionnels (Hynes, 1992) alors que d'autres contiennent un segment d'environ 180 acides aminés appelé le domaine I (Hynes, 1992) inséré avant

les cinq dernières répétitions contenant le domaine de liaison aux cations (Hynes, 1992). La fonction du domaine I est inconnue ((Hynes, 1992 ; Hillis et al., 1996), mais il semblerait que ses fonctions soient similaires aux domaines liant le collagène du facteur de von Willebrand (Hynes, 1992). Le domaine I serait impliqué dans les fonctions d'adhésion des intégrines $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_2$ et dans toutes les associations α/β_2 (Hynes, 1992 ; Hillis et al., 1996).

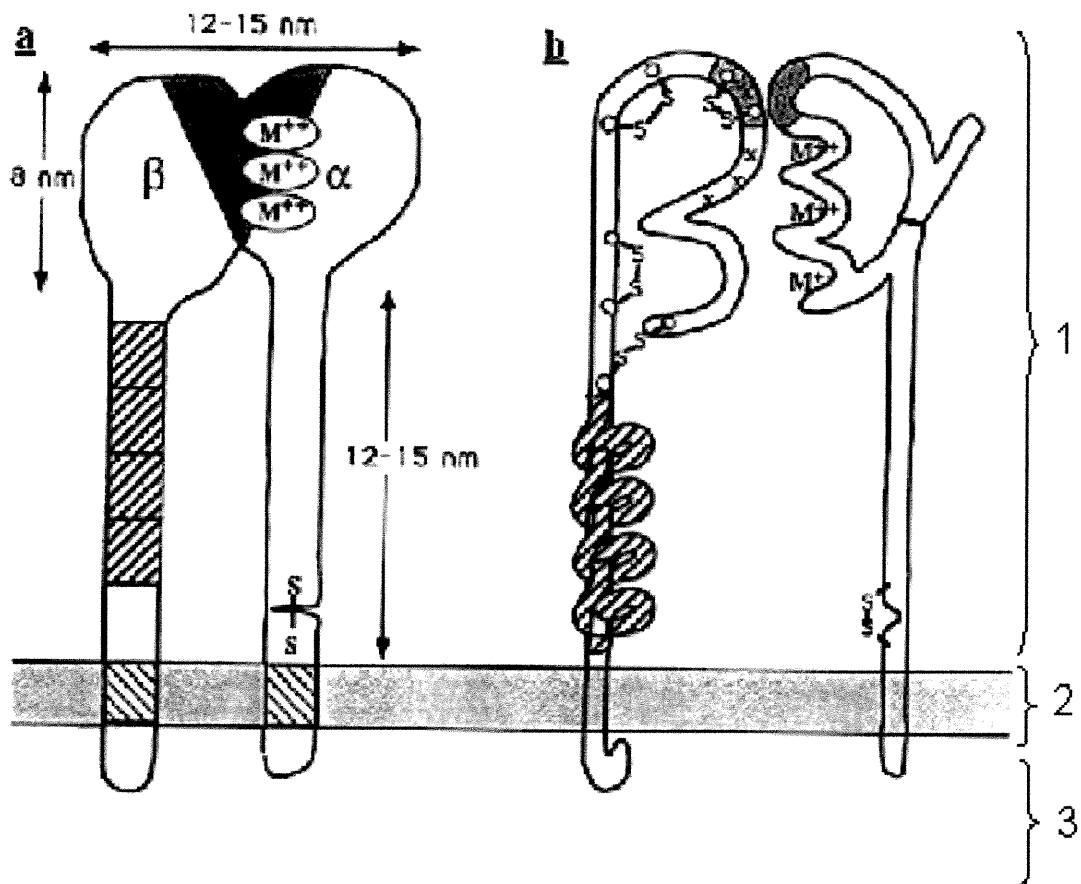


Figure 2 : Schématisation de la structure des intégrines (tiré de l'article de Hynes, 1992).

a- Forme déduite par analyse au microscope électronique ; **b-** Arrangement des chaînes polypeptidiques ; 1= portion extracellulaire ; 2= portion transmembranaire ; 3= portion cytoplasmique ; M^{++} = sites de liaison des métaux.

- *Sous-unité β* : Les régions hachurées correspondent aux répétitions riches en cystéine. La zone grisée représente la région de liaison du ligand.

- *Sous-unité α* : Xs indique les positions des mutations (sous-unités β_2 humaines ou β_3) qui affectent la liaison du ligand ou la dimérisation des complexes $\alpha\beta$. Les positions des segments épissés alternativement chez la *Drosophile* sont ombragés dans les deux sous-unités.

Un des rôles des intégrines est de transmettre une information depuis l'environnement extérieur de la cellule, ce qui implique ensuite des changements structuraux dans la cellule et une régulation de l'activité cellulaire (Hsueh et al., 1998).

Pour chaque sous-unité, le domaine extracellulaire lie les protéines de la MEC comme la fibronectine, le collagène, la vitronectine, la laminine, l'ostéopontine... alors que le domaine intracellulaire interagit avec des protéines du cytosquelette (notamment des interactions directes avec la taline et l' α -actinine) et des molécules de la signalisation intracellulaire comme FAK (Hynes, 1992 ; Hsueh et al., 1998 ; Luscinskas et al., 1994 ; Berman et al., 2000). Les deux sous-unités sont nécessaires pour qu'il y ait interaction des intégrines avec le cytosquelette et la matrice extracellulaire (Albelda et al. 1990).

2.1.1.1- La spécificité des ligands des intégrines.

Les intégrines sont situées au niveau de la membrane plasmique donc leurs domaines extracellulaires jouent un rôle très important dans la liaison avec les ligands extracellulaires (Berman et al., 2000). Grâce à des études de résonance magnétique nucléaire et à la cristallographie, on a montré que les propriétés adhésives sont contrôlées par un site de liaison qui permet l'association avec un ligand extérieur (Hynes, 1992 ; Haas et al., 1994 ; Ruoslahti et al., 1986).

Comme le montre le tableau 1, la plupart des protéines de la MEC présentent une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) (Berman et al., 2000). Ce tripeptide est essentiel pour l'interaction du ligand avec l'intégrine et pour son activité cellulaire (Ruoslahti et al., 1986). Seul le ligand possède un motif RGD ; l'intégrine, quant à elle, a un site de reconnaissance pour ce motif (Haas et al., 1994). Pour qu'il y ait une interaction productive et de haute affinité (ex : intégrine $\alpha_5\beta_1$ et fibronectine), l'intégrine et le ligand doivent être dans une conformation complémentaire : la séquence RGD du ligand doit être

capable d'adopter la conformation du domaine de reconnaissance au ligand porté par l'intégrine (Haas et al., 1994). Si le ligand possède un motif RGD caché (ex : laminine), l'intégrine ne peut pas reconnaître ce site et aucune liaison n'est possible (Haas et al., 1994). Dans le cas d'une interaction de faible affinité (ex : collagène), le motif RGD du ligand est exposé mais il ne possède pas de conformation secondaire adéquate pour que l'intégrine puisse s'y lier (Haas et al., 1994).

Les protéines de la MEC possédant un motif RGD sont la fibronectine (ligand notamment pour l' $\alpha_5\beta_1$), la vitronectine (ligand pour $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_5$), l'ostéopontine (ligand pour $\alpha_v\beta_1$), la thrombospondine (ligand pour $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_{11b}\beta_3$),... (Haas et al., 1994 ; Berman et al., 2000). Les intégrines contenant un site de reconnaissance pour le motif RGD sont $\alpha_3\beta_1$ (selon les ligands avec lesquels cette intégrine se lie. (Elices et al., 1996), $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_8$ (Hynes, 1992 ; Berman et al., 2000).

2.1.1.2- Les cations divalents.

Les cations divalents sont très importants pour la stabilité des intégrines (Haas et al., 1994) car ils peuvent affecter différemment leur structure et leur fonction (Luscinskas et al., 1994 ; Haas et al., 1994). De même, la liaison des intégrines avec leur ligand est un processus dépendant des cations divalents (Luscinskas et al., 1994). Le Mn^{2+} renforce l'affinité de la liaison entre les intégrines et le ligand (Luscinskas et al., 1994). Le Mg^{2+} permet une liaison entre le ligand et l'intégrine sans renforcement de l'affinité (Luscinskas et al., 1994) alors que le Ca^{2+} inhibe la liaison (Luscinskas et al., 1994).

<u>Intégrines</u>		<u>Ligands</u>	<u>Sites de reconnaissance</u>
β_1	α_1	Collagène type I et IV, laminine	
	α_2	Collagène type I et IV, laminine	DGEA
	α_3	Fibronectine, laminine, collagène, épiligrine	RGD ?
	α_4	Fibronectine, VCAM-1	LDV
	α_5	Fibronectine	RGD
	α_6	Laminine	
	α_7	Laminine	
	α_8	Vitronectine, fibronectine, tenascine	RGD
	α_9	Tenascine, collagène, laminine	
	α_{10}	Collagène	
	α_{11}	Collagène type I	
	α_v	Vitronectine, fibronectine, ostéopontine	RGD
β_2	α_D	ICAM, VCAM	
	α_L	ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3	
	α_M	C3b, fibrinogène, facteur X, ICAM-1, ICAM-2	KRLDGS
	α_X	C3b, fibrinogène	
β_3	α_{IIb}	Fibrinogène, f. von Willebrand, fibronectine, vitronectine, thrombospondine	RGD, KQAGDV
	α_v	Vitronectine, fibrinogène, fibronectine, thrombospondine, f. von Willebrand, tenascine, fibuline, ostéopontine, fibrilline	RGD
β_4	α_6	Laminine, desmine	
β_5	α_v	Vitronectine, ostéopontine	RGD
β_6	α_v	Fibronectine	RGD
β_7	α_4	Fibronectine, VCAM-1, MAdCAM-1	EILDV
	α_E	E-cadhérine	
β_8	α_v	Vitronectine	RGD

Tableau 1 : Spécificité des ligands des intégrines (tiré de Berman et al., 2000)

Note : RGD, Arg-Gly-Asp; DGEA, Asp-Gly-Glu-Ala; EILDV, Glu-Ile-Leu-Asp-Val; KQAGDV, Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val; ICAM-1, ICAM-2 et ICAM-3, récepteurs de surface impliqués dans les interactions intercellulaires; c3b, facteur complément 3b; MAdCAM-1, adrésine.

2.1.2- Implication des intégrines dans les maladies.

La distribution des intégrines semble être universelle et ubiquitaire (Albelda et al., 1990). De ce fait, elles sont impliquées dans de nombreuses maladies lorsque leur rôle n'est plus assuré. Elles interviennent dans :

- *des maladies rénales* : l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ est localisée au niveau des cellules épithéliales du glomérule et semble maintenir le contact entre ces cellules et la membrane basale glomérulaire. Cette intégrine présente une modification d'expression lors de néphropathies membranaires (Hillis et al., 1996).
- *des maladies gastro-intestinales et hépatiques* : les hépatocytes expriment les récepteurs des intégrines pour la fibronectine, le collagène et la laminine. L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est importante pour la régénération du foie vu que son expression est augmentée de six à huit fois à ce moment (Hillis et al., 1996).
- *des maladies pulmonaires* : l'épithélium bronchique de personnes asthmatiques voit l'expression des intégrines $\alpha_4\beta_1$ augmenter (Hillis et al., 1996).
- *des maladies dermiques* : certaines intégrines, notamment l' $\alpha_1\beta_1$ et l' $\alpha_3\beta_1$, sont sur-exprimées dans les maladies dermiques (Hillis et al., 1996) .
- *des maladies osseuses* : en effet, les ostéoclastes expriment les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_v\beta_1$ (Hillis et al., 1996). Le blocage des intégrines β_1 empêche la résorption *in vitro* de l'os par les ostéoclastes humains et de rongeurs.
- *des maladies neurologiques* : de nombreuses intégrines sont exprimées dans les plaques amyloïdes de la maladies d'Alzheimer (Hillis et al., 1996).
- *dans les infections virales* : pour adhérer aux cellules et les envahir, les virus peuvent utiliser plusieurs récepteurs d'adhésion (Hillis et al., 1996).
- *dans les processus métastatiques, invasifs et la cancérogénèse* : quand une cellule perd ses facultés d'adhésion, elle montre un phénotype

métastatique (Albelda et al., 1990 ; Hillis et al., 1996 ; Mizejewski, 1999). Dans les mélanomes malins humains, la sous-unité β_3 est surexprimée (Albelda et al., 1990 ; Mizejewski, 1999).

- *dans les maladies cardiovasculaires* : le développement de la plaque athérosclérotique implique des interactions cellules/cellules anormales. A ce niveau, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ a un rôle très important à jouer (Hillis et al., 1996, Clemetson et al., 1998 ; Berman et al., 2000). De plus, l'ostéopontine, protéine de la MEC à motif RGD, est sur-exprimée pendant les processus d'athérosclérose.

Les intégrines interviennent dans les processus d'élaboration tissulaire majeur comme la vasculogénèse, l'angiogénèse, la cicatrisation (Luscinskas et al., 1994), l'embryogénèse, la différenciation, la prolifération cellulaire, la survie et la migration cellulaire (Berman et al., 2000) mais aussi dans la réponse inflammatoire et la régulation du cycle cellulaire.

2.1.3- Rôle des différents complexes d'intégrines dans le système cardiovasculaire.

2.1.3.1- La sous-unité β_1 .

Les sous-unités β_1 sont particulièrement exprimées dans les cœurs nouveau-nés (Carver et al., 1994) et notamment au niveau des bandes Z du sarcomère, *in vitro* (Carver et al., 1994 ; Hilenski et al., 1992). La sous-unité β_1 intervient alors dans l'étalement et la formation des fibrilles des cardiocytes de rats nouveau-nés *in vitro* (50). La localisation spatiale et temporelle de la sous-unité β_1 varie mais cette sous-unité est toujours présente quelque soit le stade de développement du cœur (Carver et al., 1994). L'équipe de Fässler (Fässler et al., 1995) a généré une souris knock-out pour l'intégrine β_1 et a montré que cette intégrine est cruciale : en effet, une déficience de l'intégrine β_1 entraîne la létalité peu de temps après l'implantation de l'embryon soit au

jour embryonnaire 5,5 et 6 (Fässler et al., 1995). L'intégrine β_1 est importante pour la migration cellulaire ; les embryons où la glycoprotéine est absente s'attachent à la membrane utérine, envahissent la stroma mais meurent rapidement après (Fässler et al., 1995). Si on bloque la fonction de cette intégrine par des anticorps ou par des peptides synthétiques, la migration des cellules des crêtes neurales et des myoblastes *in vivo* est inhibée (Fässler et al., 1995). De la même façon, les cellules hématopoïétiques ont besoin de la présence des intégrines β_1 pour coloniser leurs organes cibles (Fässler et al., 1995).

La sous-unité β_1 est également un facteur très important dans la réponse hypertrophique des cardiocytes ventriculaires de rats nouveau-nés (Ross et al., 1998). Chez le rat adulte, il existe une sur-expression des niveaux protéiques des intégrines α_1 , α_5 et β_1 après induction de l'hypertrophie (Ross et al., 1998).

De plus, chez les cardiocytes humains, la synthèse protéique et la sécrétion d'ANF peuvent être augmentées suite à une sur-expression de l'intégrine β_1 humaine (Ross et al., 1998). Bien qu'il n'y ait aucun changement au niveau de la synthèse de l'ADN, ceci est caractéristique d'un phénotype hypertrophique (Ross et al., 1998).

La régulation de l'expression des différentes sous-unités des intégrines peut entraîner une modulation de la prolifération cellulaire, dans des conditions normales ou pathologiques (Zheng et al., 1997). Les queues cytoplasmiques modulent l'affinité de liaison des ligands du domaine extracellulaire, la distribution du récepteur, l'adhésion cellulaire et l'étalement (Zheng et al., 1997). Il existe donc quatre isoformes différents pour la sous-unité β_1 : β_{1A} , β_{1B} , β_{1C} , β_{1D} (Zheng et al., 1997 ; Giancotti, 2000), où la séquence COOH est modifiée par épissage alternatif (Zheng et al., 1997). β_{1A} , correspondant à la "forme normale" de la sous-unité β_1 , sans épissage (Zheng et al., 1997), a un domaine cytoplasmique hautement conservé des

invertébrés aux humains et il joue un rôle régulateur dans la migration cellulaire, la localisation des intégrines, l'activation de FAK et l'affinité des intégrines pour les ligands (Zheng et al., 1997 ; Giancotti, 2000). La forme β_{1D} a une fonction similaire à β_{1A} c'est-à-dire la localisation au niveau des foyers d'adhésion, la stimulation de FAK et l'activation des MAPK (Zheng et al., 1997 ; Giancotti, 2000). L'isoforme β_{1B} , quant à lui, n'est pas localisé au niveau des foyers d'adhésion et il inhibe l'adhésion cellulaire et la motilité (Zheng et al., 1997 ; Giancotti, 2000). La forme épissée β_{1C} inhibe la prolifération cellulaire et est sous-réglée dans les mécanismes de cancérogénèse (Zheng et al., 1997) alors que la forme β_{1A} est inchangée dans ce cas (Zheng et al., 1997 ; Giancotti, 2000). Les travaux de Ross et ses collaborateurs (Ross et al., 1998) montrent que les isoformes β_{1A} et β_{1D} participent tous deux à la réponse hypertrophique par activation de FAK. De ce fait, les différents isoformes obtenus après épissage alternatif de la sous-unité β_1 peuvent réguler les principales voies de signalisation (Zheng et al., 1997).

2.1.3.2- Le complexe $\alpha_3\beta_1$.

Le complexe $\alpha_3\beta_1$ se lie avec de nombreuses protéines de la MEC comme la fibronectine, le collagène de type I et IV, la laminine-1, -10 et -11, la thrombospondine-1, l'entactine/nidogène (Kreidberg, 2000 ; Elices et al., 1991). L' $\alpha_3\beta_1$ peut aussi s'associer avec une protéine possédant quatre domaines transmembranaires, la tétraspanine (Kreidberg, 2000). Selon son ligand, l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ est dite à motif RGD (liaison à la fibronectine) ou son interaction avec les protéines de la MEC est indépendante du motif RGD (liaison avec le collagène et la laminine-1) (Kreidberg, 2000 ; Elices et al., 1991).

Une déficience en $\alpha_3\beta_1$ entraîne la mort pendant la période néonatale donc la formation de plusieurs organes vitaux semble dépendre de la présence de

cette intégrine (Kreidberg, 2000). L' $\alpha_3\beta_1$ est prédominante au niveau du rein et plus particulièrement des podocytes glomérulaires (Kreidberg, 2000). Pour le développement du cerveau, la migration neuronale fait intervenir l'intégrine $\alpha_3\beta_1$, exprimée au niveau des neurones (Kreidberg, 2000). Cette intégrine joue un rôle crucial dans le développement d'autres organes comme le foie, le poumon, le muscle et les glandes salivaires (Kreidberg, 2000). L'intégrine $\alpha_3\beta_1$ maintient la morphologie épithéliale et dans ce cas, il y a une communication entre les cadhérines et les intégrines. L'adhésion cellule/cellule est alors un mécanisme dépendant du Ca^{2+} (Kreidberg, 2000). De par sa localisation, l' $\alpha_3\beta_1$ joue un rôle dans l'assemblage et le maintien de la structure de la membrane basale (Kreidberg, 2000). Elle intervient aussi dans les processus de migration, d'adhésion, de prolifération et d'invasion en activant la voie des MAPK (cf interaction $\alpha_3\beta_1$ et laminine-5 ; (Kreidberg, 2000)).

2.1.3.3- Le complexe $\alpha_v\beta_3$.

On dit souvent que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est le récepteur de la vitronectine. Cependant, bien d'autres ligands sont attribués à cette glycoprotéine (Kreidberg, 2000) comme le fibrinogène, la fibronectine, la laminine, la thrombospondine, le facteur de Von Willebrand, la ténascine, l'ostéopontine et certaines formes de collagène (Byzova et al., 1998). La métalloprotéinase MMP-2 peut aussi être un ligand pour cette intégrine (Byzova et al., 1998). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a une vaste répartition ; en effet, elle est présente au niveau des cellules endothéliales, des cellules du muscle lisse, des lymphocytes T, des neutrophiles, des plaquettes, des cellules mésangiales, des monocytes et des macrophages,... (Byzova et al., 1998).

Par conséquent, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ intervient dans de nombreux processus physiologiques comme l'angiogénèse (Friedlander et al., 1996), la croissance néoplasique, l'invasion, la résorption de l'os médiée par les ostéoclastes (Byzova et al., 1998) , la migration cellulaire (Byzova et al., 1998) et la

prolifération des cellules endothéliales et des cellules du muscle lisse (Byzova et al., 1998). Elle joue un rôle très important, avec l'intégrine $\alpha_v\beta_5$, dans les maladies oculaires néovasculaires comme au niveau de la dégénéscence de la macula (Friedlander et al., 1996).

2.1.3.4- Le complexe $\alpha_8\beta_1$.

Cette intégrine a récemment été découverte dans les neurones et les cellules épithéliales, alors que sa localisation était déjà connue au niveau des cellules du muscle lisse, des cellules glomérulaires mésangiales et des fibroblastes pulmonaires (Schnapp et al., 1995 ; Hartner et al., 1999 ; Müller et al., 1997). C'est une intégrine à motif RGD qui a plusieurs ligands : fibronectine, vitronectine, ténascine et ostéopontine (Denda et al., 1998). Sa grande abondance dans les fibroblastes cardiaques de rats adultes lui confère un rôle majeur dans l'adhésion. Elle participe probablement à l'attachement et à l'étalement des fibroblastes sur une matrice de fibronectine (Thibault et al., 2000).

Il existerait une relation entre l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ et la fibrose pathologique car, lors d'une éventuelle différenciation des cellules de fibroblastes pulmonaires et hépatiques en myofibroblastes et d'un possible dépôt tissulaire de fibronectine, cette intégrine est sur-exprimée (Schnapp et al., 1995 ; Thibault et al., 2000).

Des expériences d'immunocytochimie ont montré que l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ est colocalisée avec la vinculine et la sous-unité β_3 donc, elle serait impliquée dans la formation des foyers d'adhésion (Thibault et al., 2000).

2.1.3.5- Le complexe $\alpha_5\beta_1$.

L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ est considérée comme étant le principal récepteur pour la fibronectine (Pankov et al., 2000 ; Yang et al., 1993). Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération cellulaire, la

transformation oncogénique, la migration cellulaire, la régulation de l'expression des gènes, la cicatrisation et l'activation des cellules T (Yang et al., 1993).

Elle joue aussi un rôle dans l'embryogénèse et, par conséquent, elle est hautement exprimée dans l'embryon précoce du Xenope et du poulet alors que son expression est plus limitée dans les tissus adultes (Yang et al., 1993). En créant une souris déficiente pour l'intégrine α_5 , Yang et ses collaborateurs ont montré que cette intégrine est cruciale pour le développement embryonnaire (Yang et al., 1993). En effet, la mutation récessive embryonnaire de l'intégrine α_5 est létale (Yang et al., 1993). Chez les souris "null- α_5 ", ils ont observé des déficiences au niveau des membres postérieurs, du tube neural, des malformations vasculaires, extra-embryonnaires et mésodermiques (Yang et al., 1993). Cependant, les cellules de ces souris sont toujours capables de réaliser une assemblage de fibronectine et elles ont encore la capacité de migrer. Cela suggère que d'autres intégrines, comme $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_4\beta_1$ sont des récepteurs pour la fibronectine qui compensent l'absence d' $\alpha_5\beta_1$ (Yang et al., 1993). En effet, l' $\alpha_4\beta_1$ lie un segment alternatif épissé de la fibronectine (Yang et al., 1993).

2.1.3.6- Les complexes $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_1\beta_1$.

L'intégrine $\alpha_2\beta_1$ est exprimée dans les lymphocytes B et T, les plaquettes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules de mélanome (Santoro et al., 1995 ; Gotwals et al., 1996). L'intégrine $\alpha_1\beta_1$, quant à elle, est exprimée principalement dans les cellules dérivées du mésenchyme (Gotwals et al., 1996).

Ces deux intégrines permettent de réaliser spécifiquement l'adhésion cellulaire au collagène (Kern et al., 1993 ; Gotwals et al., 1996). Les formes solubles de l' $\alpha_2\beta_1$ et de l' $\alpha_1\beta_1$ se lient au collagène de type IV natif (forme de triple hélice) mais pas au collagène dénaturé (Kern et al., 1993). Il existe cependant quelques différences au niveau de l'affinité de liaison et du ligand :

l' $\alpha_1\beta_1$ montre une très grande affinité pour le collagène de type IV alors que l' $\alpha_2\beta_1$ a une plus grande affinité pour le collagène de type I (Kern et al., 1993). Kern et ses collaborateurs ont aussi montré que le collagène de type VI a une faible affinité pour l' $\alpha_1\beta_1$ et aucune affinité pour l' $\alpha_2\beta_1$. Aucune autre protéine de la MEC ne semble avoir d'affinité pour ces intégrines sauf la laminine qui possède une faible capacité de liaison pour l' $\alpha_1\beta_1$ (Kern et al., 1993). Plusieurs études démontrent que l'intégrine $\alpha_2\beta_1$ permet l'adhésion des plaquettes au collagène en présence de Mg^{2+} (Santoro et al., 1995 ; Kern et al., 1993). L'inhibition de l'expression de cette intégrine résulte en une déficience de l'attachement des cellules épithéliales au collagène mais aussi en une altération de la motilité cellulaire (Santoro et al., 1995). Cette intégrine semble aussi être un récepteur de surface pour des virus comme l'échovirus1 (Santoro et al., 1995). L'intégrine $\alpha_1\beta_1$ aurait un rôle à jouer au niveau de la réponse à une blessure vasculaire chez les cellules du muscle lisse de l'intima (Gotwals et al., 1996).

2.2- Signalisation intracellulaire passant par les intégrines.

De nombreuses voies de signalisation cellulaire vont passer par les intégrines.

2.2.1- Signalisation "inside-out".

"Ces processus, impliquant des voies de transduction classiques, se produisent depuis l'intérieur vers le milieu extracellulaire de la cellule" (Luscinskas et al., 1994 ; Faull et al., 1996 ; Jones et al., 1999). Ce sont des mécanismes de signalisation qui régulent l'affinité des intégrines pour leurs ligands (Coppolino et al., 2000 ; Jones et al., 1999).

Les plaquettes représentent un bon exemple pour ce type de signalisation (Luscinskas et al., 1994 ; Shattil et al., 1994 ; Parise, 1999). Les plaquettes sont couvertes d'intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Hynes, 1987 ; Ruoslahti, 1991). Dans les plaquettes circulantes, l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ est dans un état inactif

(Shattil et al., 1994 ; Parise, 1999). Des molécules agonistes comme la thrombine, l'ADP, le collagène, la thrombospondine activent l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Shattil et al., 1994 ; Parise, 1999). De cette façon, l'intégrine active pourra lier des protéines plasmatiques spécifiques en solution comme le facteur de Von Willebrand ou le fibrinogène (Ruoslahti, 1991 ; Shattil et al., 1994 ; Parise, 1999).

Un autre exemple de signalisation "inside-out" est représenté par le "rolling" des leucocytes (Luscinskas et al., 1994 ; Stewart et al., 1996). Les intégrines (notamment $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$ et $\alpha_M\beta_2$), ainsi que d'autres molécules d'adhésion comme les sélectines, jouent un rôle très important dans les fonctions des différents types de leucocytes. En général, elles régissent l'attachement sur la paroi vasculaire, faisant passer les leucocytes de leur forme circulante à adhérente (Ruoslahti, 1991 ; Luscinskas et al., 1994). Le rolling permet également aux leucocytes d'arriver sur le lieu d'une inflammation par diapédèse (Luscinskas et al., 1994).

2.2.2- Signalisation "outside-in".

"Ce sont des signaux de transduction issus de l'environnement extracellulaire qui se propagent jusqu'au cytoplasme cellulaire" (Faull et al., 1996 ; Coppelino et al., 2000).

Dans le cas de l'agrégation plaquettaire (après que la signalisation "inside-out" ait eu lieu), quand le fibrinogène ou la fibrine générée par la thrombine se lie à l' $\alpha_{IIb}\beta_3$ des plaquettes, des signaux "outside-in" activent des phosphorylations protéiques intracellulaires, des translocations moléculaires,... (Parise, 1999). Ainsi, le fibrinogène lie les plaquettes ensemble, grâce à ses multiples sites d'adhésion plaquettaire, en un agrégat pour former un "bouchon plaquettaire" (Shattil et al., 1994 ; Parise, 1999). C'est le colmatage qui se déroule lors d'une blessure de la paroi vasculaire, pour empêcher une perte de sang trop importante (Parise, 1999).

Ces signaux affectent la différenciation cellulaire, l'activation, l'expression des gènes et la prolifération (Luscinskas et al., 1994).

2.2.3- Signalisation intracellulaire.

2.2.3.1- Formations des foyers d'adhésion.

Les intégrines ont un rôle de molécules de signalisation (Jones et al., 1999). Une grande majorité des voies de transduction des signaux médiées par les intégrines est initiée à partir des adhésions focales (Vuori, 1998). Les contacts focaux peuvent se définir comme étant "les sites d'ancrage de la surface de la cellule sur un substrat" (Berman et al., 2000 ; Vuori, 1998). C'est à partir de ces zones que l'adhésion aux substrats, l'étalement, le mouvement et la division peuvent avoir lieu (Berman et al., 2000).

Les zones d'adhésion focales apparaissent suite au regroupement des intégrines en bouquets ou "clusters" (Berman et al., 2000 ; Vuori, 1998 ; Giancotti et al., 1999) comme le montre la figure 3. De nombreuses protéines du cytosquelette vont prendre part à ces adhésions focales : (Berman et al., 2000 ; Meredith et al., 1996)

❖ La TALINE : C'est l'élément structural majeur des adhésions focales (Vuori, 1998). C'est une protéine dimérique de 60 nm, 270 kDa (Critchley, 2000), flexible, qui se lie à la fois avec l'actine (Vuori, 1998 ; Critchley, 2000) et l' α -actinine (Vuori, 1998). La liaison de la taline aux intégrines est requise pour l'attachement de l'actine (Vuori, 1998).

❖ La VINCULINE : Elle est capable de stabiliser les interactions entre la taline et l'actine mais aussi entre la taline et la bicouche lipidique (Vuori, 1998 ; Critchley, 2000). Si sa conformation est favorable, elle peut se lier directement à l'actine (Vuori, 1998).

C'est une des protéines les plus abondantes au niveau des contacts focaux (Vuori, 1998). Cette protéine cytosquelettique est essentielle à l'arrangement

normal des myofibrilles chez les cardiocytes ventriculaires foetaux de souris (Shiraishi et al., 1997).

Les stades les plus précoces de la formation des contacts focaux affichent la présence de la taline ; puis, vers la fin de la formation de ces zones, l'actine et l' α -actinine se mettent en place (Berman et al., 2000).

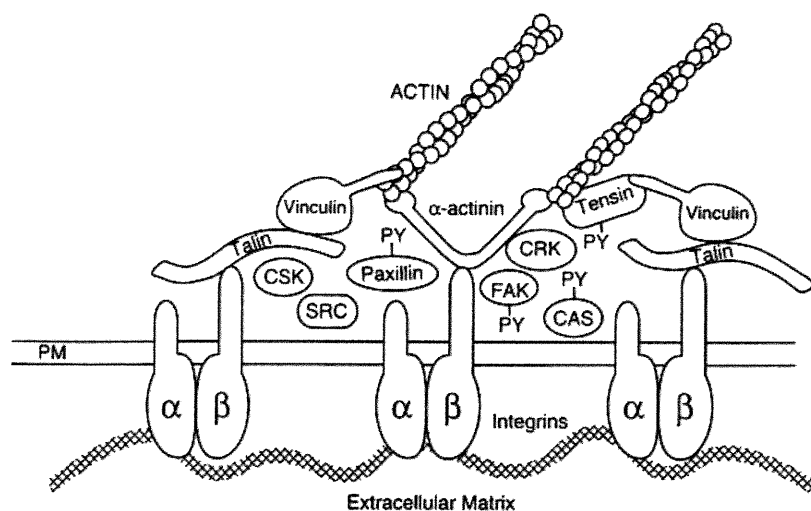


Figure 3 : Représentation schématique des foyers d'adhésion (tiré de l'article de Vuori, 1998).

2.2.3.2- Signalisation consécutive.

La mise en place des foyers d'adhésion permet aux molécules de la signalisation sous-jacente de s'assembler.

L'initiation des voies de signalisation peut se faire à partir de la sous-unité α . Dans ce cas, il y a nécessité d'un adaptateur membranaire comme la cavéoline et d'une protéine adaptatrice comme Shc ("SH2 containing protein") pour initier la cascade moléculaire (Berman et al., 2000 ; Giancotti et al., 1999 ; Kumar, 1998 ; Coppolino et al., 2000). Pour la sous-unité β , l'arrivée de FAK entraîne la venue de Grb2/Sos (Berman et al., 2000 ; Kumar, 1998 ; Meredith et al., 1996 ; Cary et al., 1999) puis différentes voies de signalisation peuvent débiter (voir figure 4). Elles contrôlent des processus physiologiques bien

distinctes : en effet, la voie passant par Grb2/Sos/Ras/Raf/ERK contrôle la survie, la prolifération cellulaire (Giancotti et al., 1999 ; Kumar, 1998 ; Meredith et al., 1996 ; Cary et al., 1999) et l'expression des gènes (Longhurst et al., 1998). Les voies de signalisation passant par Rho/Rac/Cdc42 permettent la formation des adhésions focales et des fibres d'étirement (Kumar, 1998). L'organisation du cytosquelette est également médiée par cette voie (Clark et al., 1998). D'autres molécules interviennent dans le contrôle de l'apoptose (Kumar, 1998 ; Cary et al., 1999). Le comportement migratoire de la cellule peut résulter de l'activation des voies passant par ERK (Schlaepfer et al., 1998).

L'hypertrophie est aussi régulée par ces voies de signalisation (Nemoto et al., 1998 ; Aoki et al., 2000). En effet, deux molécules de la famille des MAPK, p38 et JNK, ont des effets antagonistes sur le développement de l'hypertrophie des cardiocytes (Nemoto et al., 1998). L'activité p38 est nécessaire et suffisante pour stimuler l'expression de l'ANF, marqueur hypertrophique, chez les cardiocytes ventriculaires nouveau-nés (Nemoto et al., 1998). Par contre, l'activité de JNK inhibe l'expression de l'ANF induite par MEKK1 et par les agonistes hypertrophiques comme la phényléphrine et l'endothéline-1 (Nemoto et al., 1998). L'Ang II peut augmenter l'expression de l'ANF (ARNm et polypeptide) exclusivement via la voie des MAPK (Aoki et al., 2000).

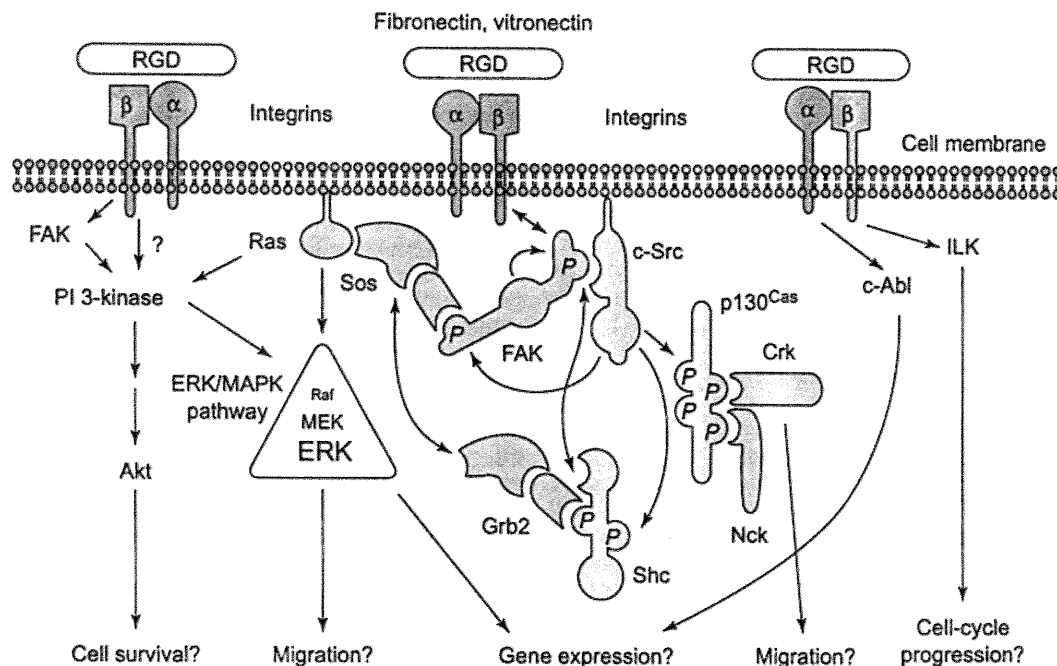


Figure 4: Modèle de la phosphorylation des tyrosines stimulée par les intégrines et les voies de signalisation (tiré de l'article de Schlaepfer et al., 1998).

2.3- Les désintégrines. Définition et généralités.

Comme outil d'étude des intégrines, nous avons utilisé les désintégrines. Ce sont des toxines hémorragiques issues du venin des serpents de la famille des Viperidae (Gould et al., 1990 ; McLane et al., 1998).

Ce sont des peptides de bas poids moléculaire (5 à 8 kDa), contenant une séquence RGD et des résidus cystéine (Gould et al., 1990). Trois groupes peuvent être définis en fonction du nombre d'acides aminés : parmi les peptides de 48 à 49 acides aminés, il y a l'échistatine et l'éritostatine qui contiennent huit cystéines, soit quatre ponts disulfures . L'élégantine, la flavoridine et la rhodostomine contiennent 12 résidus cystéine et ont 70 à 73

acides aminés. La bitistatine, quant à elle, comprend 83 à 84 résidus aminoacides et 14 cystéines.

Ce sont de puissants inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire. Elles ont une courte durée de demi-vie et sont apparemment non-toxiques. Leur puissance à inhiber l'interaction ligand/intégrine est probablement due à la conformation spécifique de leur séquence RGD et aux acides aminés adjacents à cette séquence.

D'après les travaux de Thibault (Thibault, 2000), plusieurs désintégrines ont été testées. L'élégantine et la flavoridine possèdent la plus grande affinité pour les intégrines des fibroblastes cardiaques de rats adultes. Cependant, la flavoridine montre une plus grande sélectivité envers l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'échistatine, quant à elle, montre des affinités similaires pour toutes les intégrines d'où le choix de travailler avec cette désintégrine. C'est un peptide de 49 acides aminés (figure 5) provenant du venin d'*Echis carinatus*. Il possède un résidu tyrosine permettant l'addition d'un iode radioactif (^{125}I). Le peptide ainsi obtenu peut servir de marqueur radioactif pour détecter les intégrines.

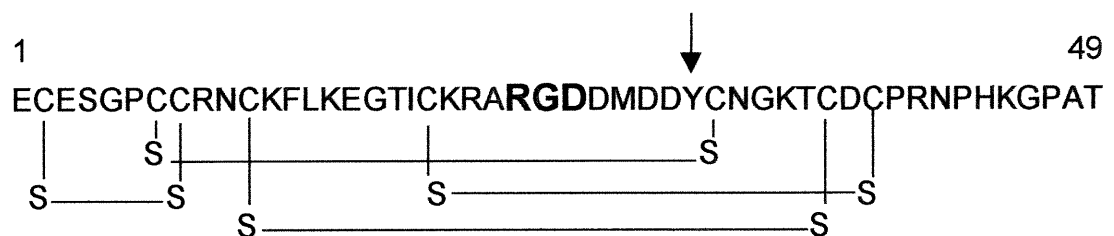


Figure 5 : Représentation de l'échistatine.

Ce dessin est une adaptation des schémas présentés dans les articles de Gould et al. (1990) et McLane et al. (1998).

Thibault a montré que l'échistatine a un comportement pharmacologique identique à celui d'un récepteur : saturabilité, réversibilité, spécificité, haute affinité (environ un nM) et densité limitée (environ 150,000 sites par cellule).

Thibault montre qu'il y a formation de complexe ^{125}I -échistatine/protéine stables au SDS en absence de chauffage. En effet, les bandes obtenues après électrophorèse sont résistantes au SDS à moins que les échantillons ne soient chauffés à haute température ou qu'un agent rompant les liaisons disulfures (ex : β -mercaptoéthanol) ne soit ajouté. La formation de ces complexes requiert des cations divalents et Thibault montre que cinq mM de Mn^{2+} donne un signal optimal par rapport au MgCl_2 et au CaCl_2 .

3- Hypertrophie ventriculaire gauche et facteurs de croissance.

3.1- Définition.

L'hypertrophie ventriculaire est une adaptation du ventricule suite à un étirement accru et ce processus succède généralement à une surcharge de travail imposée au cœur (Morgan et al., 1991). Le ventricule gauche est le plus touché par cette pathologie car ses parois musculaires sont épaisses et l'activité musculaire qu'il développe est très importante, surtout pendant la systole cardiaque (Katz, 1977).

La présence d'une hypertrophie ventriculaire gauche est un puissant indicateur des événements cardiovasculaires (Weber et al., 1991; Agabiti-Rosei et al., 1998). En effet, le développement de cette pathologie reflète les changements structuraux vasculaires dans les petites et les grosses artères.

Weber et al. distinguent deux types d'hypertrophie. Cette différence est basée sur la croissance proportionnée des cellules non contractiles (Weber et al., 1991).

En conséquence, l'hypertrophie "adaptative" est une hypertrophie où l'homogénéité du tissu est préservée (reflet d'une croissance proportionnée des cellules non contractiles) et où la proportion entre les compartiments musculaire, vasculaire et interstitiel est maintenue. Ce processus se produit en réponse à un exercice d'entraînement isotonique (même tension) ou isométrique (même longueur), à une anémie chronique ou à des fistules artérioveineuses. Dans ce cas, la concentration de collagène du myocarde reste inchangée par rapport à la normale même si la quantité de collagène est augmentée.

D'un autre côté, l'hypertrophie "pathologique" est un processus au cours duquel il existe une hétérogénéité du tissu du myocarde (reflet d'une croissance disproportionnée des cellules non contractiles) et une perte de la proportion entre les différents compartiments (Weber et al., 1991; Bishop et al., 1995). Dans ce cas, il y a une augmentation du contenu et de la quantité de collagène ce qui conduit à la fibrose du myocarde.

Il faut noter que la quantité de collagène peut augmenter de deux façons : il peut s'agir d'une augmentation de la synthèse de collagène par les fibroblastes et/ou d'une augmentation du nombre de fibroblastes (Bishop et al., 1995). Les changements dans les proportions relatives des collagènes I et III n'apportent pas de preuve concluante sur la présence d'une hypertrophie. Il semblerait toutefois que le type III subisse une augmentation dans les stades précoces de l'installation.

3.2- Changements survenant lors de l'hypertrophie cardiaque.

3.2.1- Les caractéristiques générales.

L'hypertrophie ventriculaire gauche s'accompagne principalement d'une hypertrophie cardiaque et vasculaire, de changements athérosclérotiques avec formation d'une plaque au niveau carotidien et d'une augmentation de l'épaisseur de la paroi de la média-intima (Agabiti-Rosei et al., 1998).

3.2.2- Les caractéristiques cellulaires et moléculaires. Les changements ultrastructuraux.

Dans un myocarde hypertrophié, les cellules cardiaques sont plus grandes et plus larges que dans un cœur normal (Schaper et al., 1991). Ces cellules peuvent subir une augmentation de trois à quatre fois leur taille normale (qui est de 12 x 45 μm). Il y a également une augmentation de la taille du noyau ce qui pourrait se traduire par une augmentation de la synthèse de matériel comme de l'ARNm (Schaper et al., 1991).

Dans ces cellules hypertrophiées, les mitochondries se disposent en larges bouquets dans des espaces cytoplasmiques dépourvus de myofibrilles. La forme et la taille de ces organites sont très variables (Schaper et al., 1991). La cellule hypertrophiée a d'autres particularités qui contribuent à améliorer sa fonction contractile comme un système de tubule T dilaté, de nombreux disques intercalaires. L'activité métabolique semble augmentée avec une accumulation de glycogène et de gouttelettes lipidiques, de nombreuses vacuoles et des zones myélinisées. Son espace interstitiel est élargi et contient des macrophages, des fibroblastes, des fibrocytes (cellules au repos), des fibres de collagène et des particules de débris cellulaires (Schaper et al., 1991).

Toutes les cellules ne subissent pas ces changements. En effet, environ un tiers des cellules présentent des altérations sévères; un tiers des cellules sont normales et le reste est atteint de changements plus ou moins sévères (Schaper et al., 1991).

Les capillaires, artérioles et veinules cardiaques présentent une apparence normale sauf pour la membrane basale qui subit un épaississement (Schaper et al., 1991).

Les protéines présentes au niveau du cytosquelette sont également le lieu de remaniements (Schaper et al., 1991). Ces changements sont

présentés dans le tableau 2 et ont tous été observés suite à des expériences d'immunofluorescence.

Au niveau moléculaire, l'hypertrophie se caractérise par (Aoki et al., 2000):

- la ré-activation des gènes foëtaux comme l'ANF, l' α -actine squelettique ou le β -MHC,
- l'induction des gènes précoces (tels que c-fos, c-jun et c-myc),
- l'augmentation de la synthèse protéique qui s'accompagne d'une augmentation de taille des cellules,
- l'organisation des protéines contractiles individuelles en unités sarcomériques. Ces unités s'assemblent et ce processus s'accompagne d'un accroissement de la longueur de chaque cardiocyte (Braunwald, 1997).

PROTÉINES	MYOCARDE NORMAL	MYOCARDE HUMAIN HYPERTROPHIÉ
Desmine	Localisation au niveau des bandes Z du sarcomère.	Localisation irrégulière au niveau des bandes Z, A et I sarcomériques. Seules les cellules du muscle lisse sont marquées.
Tubuline	Marquage au niveau des microtubules et autour du noyau.	Répartition diffuse ou liaison aux composants structuraux cellulaires. Marquage plus abondant que dans le myocarde normal.
Vinculine	Marquage sous forme d'une fine ligne au niveau des disques intercalaires et, en moins grande quantité, au niveau des bordures latérales des cardiocytes (sarcolemme).	Plus abondant que dans le myocarde normal, marquage sous forme de lignes irrégulières au niveau des disques intercalaires, très prononcé au niveau du sarcolemme.
Vimentine	Les éléments contenant de la vimentine sont seulement présents dans l'espace interstitiel, notamment chez les fibrocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules du muscle lisse des vaisseaux sanguins.	

Tableau 2 : Changements survenant au niveau des protéines composant le cytosquelette lors de l'hypertrophie.

3.3- Facteurs influençant l'apparition de l'hypertrophie ventriculaire.

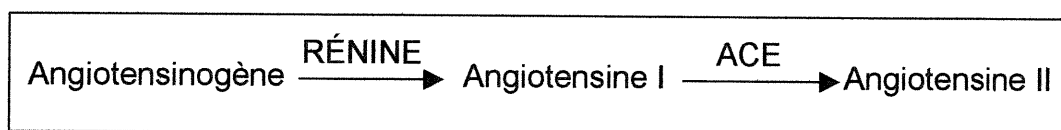
Si le volume de travail ou la pression intra-cardiaque augmentent, les concentrations plasmatiques d'hormones et/ou le relargage des neurotransmetteurs sont également modifiés à la hausse. Ce phénomène peut avoir un effet direct sur la croissance des cardiocytes. Kent et al. ont démontrés, en 1989, qu'il existait un influx de sodium constituant le signal précoce de la transformation de la charge en croissance. En effet, la synthèse de protéines est directement proportionnelle à l'entrée de sodium.

D'autres facteurs peuvent également agir sur la génèse de l'hypertrophie comme le pH intracellulaire (une alcalinisation de l'intérieur de la cellule peut représenter un signal de croissance cellulaire), la concentration intracellulaire de l'AMPc (second messenger) et, bien sûr, la présence des facteurs de croissance.

3.4- Les facteurs de croissance.

3.4.1- Le système rénine-angiotensine.

Le SRA est le régulateur principal du volume intravasculaire et de la pression sanguine systémique (Dostal et al., 1993). C'est aussi un acteur très important dans l'hypertrophie cardiaque (Iwai et al., 1995; Carretero et al., 1991). Il est constitué de plusieurs composantes formées lors de la cascade métabolique suivante (Dostal et al., 1993; Methot et al., 1997; Jan Danser et al., 1999) :



Chaque composante du SRA a des caractéristiques et une origine bien précises (Dostal et al., 1993; Methot et al., 1997):

- L'angiotensinogène est une glycoprotéine du sérum dont le poids moléculaire est de 55-60 kDa, synthétisée principalement par le foie.
- La rénine est une enzyme protéolytique synthétisée par les reins et sécrétée dans la circulation. Elle coupe l'angiotensinogène à l'extrémité amino terminale pour donner une prohormone décapeptidique, l'angiotensine I.
- La dipeptidylcarboxypeptidase appelée ACE (Enzyme de Conversion de l'Angiotensine), synthétisée au niveau des cellules endothéliales vasculaires, retire deux acides aminés à partir de l'extrémité carboxy terminale de l'angiotensine I pour générer l'angiotensine II, hormone octapeptidique.

Les ARNm et/ou les protéines des différentes composantes sont retrouvés dans différents tissus comme les reins, le cœur, le cerveau, les tissus reproducteurs, les artères, les glandes adrénargique et pituitaire (Carretero et al., 1991; Methot et al., 1997). La rénine est également présente dans d'autres organes comme l'utérus, les ovaires, les glandes sous-mandibulaires où son rôle reste indéterminé.

En général, les auteurs parlent d'un système circulant de rénine-angiotensine avec une synthèse hépatique de l'angiotensinogène et rénale de la rénine. Cependant, bien que sujet à controverse, certains pensent qu'il existe aussi un SRA local (Iwai et al., 1995; Dostal et al., 1993; Carretero et al., 1991; Jan Danser et al., 1999; Dostal et al., 1992a; Braunwald, 1997). Les niveaux des ARNm de la rénine et de l'angiotensinogène dans le cœur sont significativement moins élevés que les niveaux présents respectivement dans les reins et le foie (Dostal et al., 1993).

Les ARNm de l'angiotensinogène et la rénine sont présents dans les quatre chambres cardiaques (Braunwald, 1997): chez le rat adulte, la concentration des ARNm est très forte dans l'oreillette droite (Dostal et al., 1993; Dostal et

al., 1992b) alors que la majorité de l'ARNm se trouve dans le ventricule gauche chez le nouveau-né (Dostal et al., 1993; Dostal et al., 1992b). Cette différence de localisation peut être le fait de la croissance rapide qui a lieu dans le ventricule néonatal pendant les stades précoces de développement (Dostal et al., 1992b).

Lors de l'hypertrophie ventriculaire, dans le cœur de rat adulte, la synthèse de l'ARNm de l'angiotensinogène et de la rénine est augmentée dans le ventricule gauche (Dostal et al., 1992b). De même, dans les ventricules des cœurs hypertrophiés, l'ARNm du récepteur AT₁ voit son expression augmenter de plus de trois fois (Braunwald, 1997).

Il faut également noter que les ARNm de l'angiotensinogène et de la rénine, respectivement dans le foie et les reins, sont régulés par des stimuli pharmacologiques, physiologiques et développementaux (Dostal et al., 1992b). Par exemple, suite à l'administration d'inhibiteur de l'ACE comme l'énalapril maléate, il se produit une sur-régulation pharmacologique de l'ARNm de l'angiotensinogène chez le rat adulte (Dostal et al., 1992b).

En ce qui concerne l'ACE, son ARNm est localement exprimé dans le cœur de rat (Dostal et al., 1993). Au niveau de la vasculature coronarienne, l'ACE est concentrée dans la couche de l'adventis (une des trois couches constituant les vaisseaux sanguins, les deux autres étant la média et l'intima) et les couches endothéliales des artères (Dostal et al., 1993). Cette carboxypeptidase est également exprimée dans les valvules pulmonaire, aortique, mitrale et tricuspide. L'endocarde et le myocarde ventriculaire renferment peu d'ACE (Dostal et al., 1993). L'expression de l'ARNm de l'ACE a été démontrée dans l'hypertrophie accompagnée d'une surcharge de pression (Iwai et al., 1995). Par conséquent, une augmentation dans l'expression de l'ACE entraîne une augmentation dans la production d'angiotensine II dans le ventricule hypertrophié (Iwai et al., 1995).

La figure 6 montre l'organisation du système rénine-angiotensine et l'interaction des différents composants avec l'environnement cellulaire.

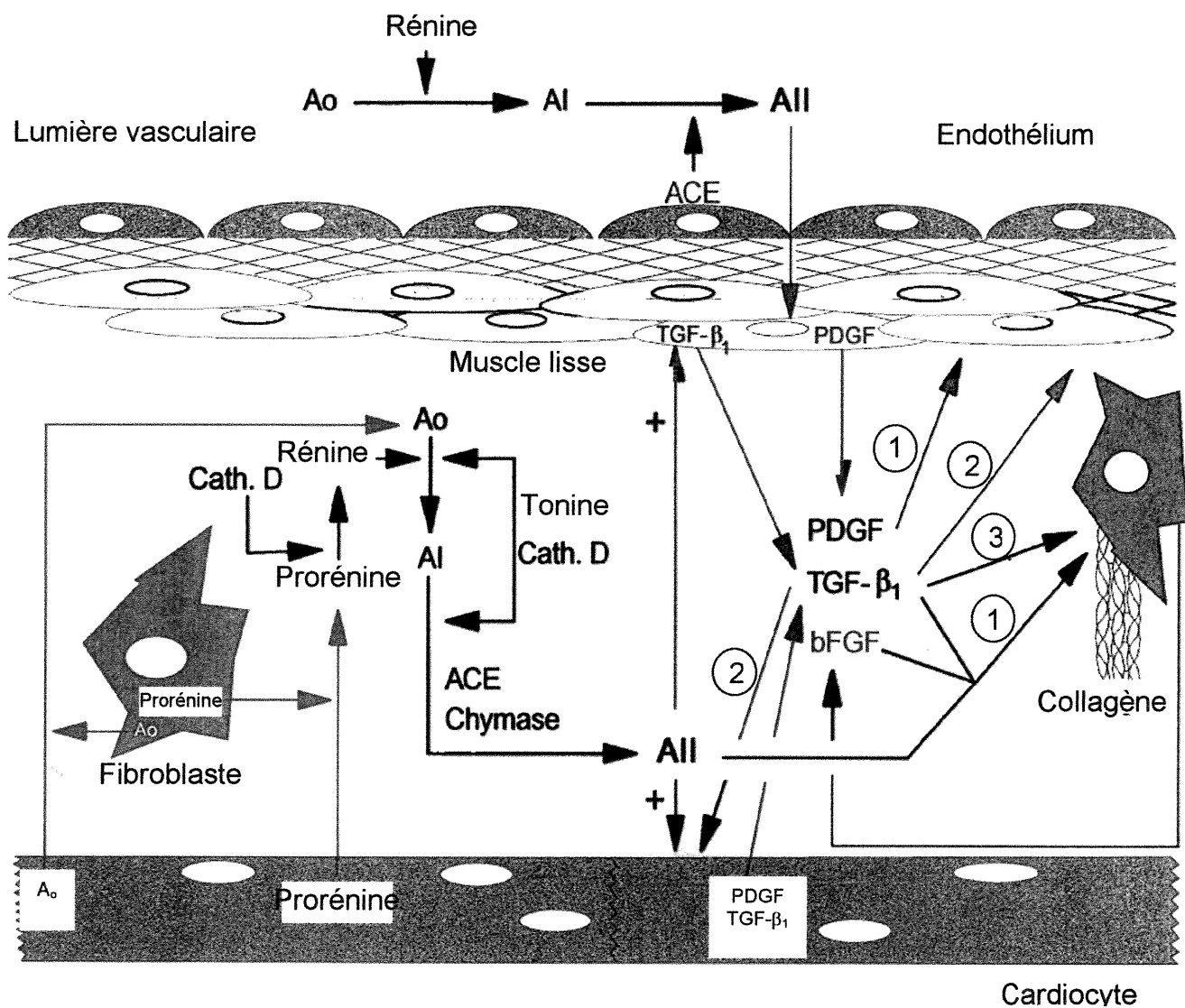


Figure 6 : Système rénine-angiotensine (adapté de l'article de Dostal et al., 1993).

Cath.D : Cathepsine D; ACE : Enzyme de Conversion de l'Angiotensine; A_o : angiotensinogène; AI : angiotensine I; All : angiotensine II
 1= prolifération; 2= hypertrophie; 3= matrice extracellulaire.

3.4.1.1- L'angiotensine II.

L'angiotensine II a un puissant rôle vasoconstricteur sur le système cardiovasculaire. Il existe deux types de récepteurs pour l'All : les récepteurs de type AT₁ et AT₂ (Brecher, 1996; Dostal et al., 1993).

Les récepteurs AT₁ sont des protéines constituées de sept domaines transmembranaires qui transmettent les effets de l'All par l'intermédiaire de la voie couplée aux protéines G (Sadoshima et al., 1993; Dostal et al., 1993). Les récepteurs AT₁ permettent d'obtenir une réponse mitogénique, une augmentation de la synthèse protéique et induisent l'expression des gènes de la matrice extracellulaire. A partir des récepteurs de type AT₁, il y a activation des voies de transduction menant à l'hypertrophie cardiaque vu que l'augmentation du ventricule gauche est bloquée par un antagoniste spécifique des récepteurs AT₁ (Dostal et al., 1993).

Les récepteurs de type AT₂, par contre, n'ont pas de fonction biologique bien connue et les voies de transduction qui partent de ces récepteurs n'ont pas de lien avec les protéines G (Dostal et al., 1993). Ces récepteurs semblent être impliqués dans la différenciation, la régénération tissulaire et l'apoptose (de Gasparo et al., 1999; Nouet et al., 2000).

La densité des récepteurs à l'All semble être régulée pendant le développement avec un maximum de récepteurs atteint pour la période néonatale (van Kesteren et al., 1997; Sadoshima et al., 1993). Seuls les récepteurs AT₂ voient leur nombre diminuer après la naissance chez les fibroblastes cardiaques et les cardiocytes ventriculaires tandis que les cellules cardiaques adultes ne semblent posséder que le récepteur AT₁ (van Kesteren et al., 1997). La perte progressive des récepteurs AT₂ ventriculaires pendant les dix premiers jours après la naissance du rat suggère que le SRA pourrait jouer un rôle important pendant le développement (Dostal et al., 1993).

L'angiotensine II exerce des effets indirects sur le système nerveux central (stimulation de la soif, inhibition du tonus vagal), au niveau des surrénales (stimulation de la synthèse d'aldostérone et de son relargage),

mais elle a également des effets rénaux en diminuant l'excrétion du sodium rénal (Dostal et al., 1992b). Il agit également sur l'augmentation du tonus vasculaire (Dostal et al., 1992b) et augmente la pression sanguine (Brecher, 1996). L'angiotensine possède aussi des effets directs sur la fonction cardiaque (Dostal et al., 1992b). Cette hormone exerce des effets inotropiques, chronotropiques et hypertrophiques positifs sur le tissu cardiaque (Dostal et al., 1992c).

3.4.1.1.1- Les effets de l'angiotensine II sur les fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés.

Les fibroblastes cardiaques nouveau-nés ont plusieurs sites de liaison de haute affinité pour l'angiotensine II ($IC_{50} = 1 \text{ nM}$; $B_{\max} = 778 \text{ fmol/mg}$ protéines). Ces sites sont sensibles à l'antagoniste compétitif non-peptidique du récepteur AT_1 , le losartan ($IC_{50} = 13 \text{ nM}$) (Schorb et al., 1993).

Le récepteur à l'Ang II des fibroblastes cardiaques est couplé à la croissance cellulaire (Schorb et al., 1993). L'Ang II et la $[Sar^1]$ -Ang II, un analogue de l'Ang II résistant aux protéases, augmentent la quantité des protéines totales des fibroblastes cardiaques en culture (Schorb et al., 1993). Il y a donc hypertrophie des fibroblastes (Braunwald, 1997).

L'Ang II a des effets hyperplasiques sur les fibroblastes, en augmentant le nombre de cellules et la synthèse d'ADN; cependant, comme aucun effet n'a été observé sur le rapport protéine/ADN, ce facteur de croissance peut être qualifié de mitogène. Toutes les réponses passent par l'intermédiaire du récepteur AT_1 (Schorb et al., 1993; Braunwald, 1997).

Les ARNm de la fibronectine, de la laminine, du $TGF-\beta_1$ sont induits par l'intermédiaire du récepteur AT_1 de l'Ang II (Graf et al., 2000). De ce fait, l'attachement des cellules à toutes ces protéines de la matrice extracellulaire est contrôlée par l'Ang II (Kawano et al., 2000a).

Cette hormone a une activité pro-fibrotique (Kawano et al., 2000a) car elle peut stimuler la fibrose *in vivo* et entraîner une accumulation de collagène

dans les cœurs de rats (Schorb et al., 1993). Il faut noter que de tels effets (augmentation de l'attachement des cellules aux collagènes type I et III, augmentation de l'activité de FAK,...) peuvent se produire chez les fibroblastes cardiaques humains (Kawano et al., 2000b).

La régulation de l'expression de l' α -actinine par l'All contrôle l'attachement cellulaire et la phosphorylation de FAK (Kawano et al., 2000a). L'All entraîne une sur-régulation de l'ostéopontine, protéine caractéristique de l'hypertrophie cardiaque.

L'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est sur-régulée par l'All mais aussi par d'autres facteurs de croissance comme le PDGF et le TGF- β_1 chez les fibroblastes cardiaques (Graf et al., 2000). Cette intégrine contribue à l'adhésion des fibroblastes à la vitronectine grâce à sa séquence RGD et permet la mobilité des cellules. L'All régule ainsi la migration des fibroblastes (Graf et al., 2000).

L'expression d'autres intégrines (α_v , β_1 , β_3 et β_5) est également régulée par l'All en passant par l'activation des récepteurs AT₁ (Kawano et al., 2000a). L'All stimule les voies de signalisation intracellulaires comme celle de la phospholipase C, la protéine kinase C, l'élévation de calcium cytosolique et l'échangeur Na⁺-K⁺ avec une alcalinisation subséquente (Schorb et al., 1993), de même que l'activité MAPK (Schorb et al., 1995).

3.4.1.1.2- Les effets de l'angiotensine II sur les cardiocytes ventriculaires néonataux.

Chez les cardiocytes, il existe également des sites de liaison à haute affinité pour l'ang II ($K_d = 0,63$ nM; $B_{max} = 318$ fmol/mg protéines) (Schorb et al., 1993).

L'All induit l'expression d'un grand nombre de gènes précoces comme c-fos, c-jun, jun B, Egr-1 et c-myc chez les cardiocytes, comme chez les fibroblastes (Sadoshima et al., 1993). Elle provoque également l'expression

du "programme foetal" (induction d' α -actine squelettique et d'ANF) (Sadoshima et al., 1993).

L'angiotensine II entraîne une augmentation de la synthèse protéique et de la croissance cellulaire chez les cardiocytes (Baker et al., 1990; Sadoshima et al., 1993; Aceto et al., 1990; Pönicke et al., 1997). Il n'y a aucune division du contenu d'ADN (Aceto et al., 1990). Ces effets constituent donc une hypertrophie des cardiocytes (Baker et al., 1990; Braunwald, 1997). Cette réponse est médiée par le récepteur AT₁ et est dépendante du temps et de la dose administrée (Aceto et al., 1990; Pönicke et al., 1997). L'hypertrophie cellulaire peut se définir comme étant "une augmentation des protéines totales car plus de 50% de la masse sèche de la cellule est constitué de protéines" (Aceto et al., 1990). Ce phénomène est associé à une augmentation de la synthèse protéique sans changement notable du contenu en ARN ou en ADN (Aceto et al., 1990). Cette absence d'augmentation de la quantité en ADN et en ARN indique que les cardiocytes sont des cellules qui ne se divisent pas (Aceto et al., 1990).

L'Angiotensine II stimule la protéine kinase C chez les cardiocytes nouveaux en culture (Baker et al., 1990). Elle a également un effet très important sur les taux de calcium (Touyz et al., 1996) : en effet, l'Angiotensine II module les concentrations de calcium intracellulaires (Fareh et al., 1995; Fareh et al., 1996; Touyz et al., 1996) ce qui peut provoquer une augmentation des battements cardiaques.

Les effets stimulants de l'Angiotensine II sur la synthèse protéique et sur la croissance cellulaire peuvent se traduire par l'intermédiaire d'un grand nombre de mécanismes comme une augmentation des battements cardiaques, le taux de calcium libre cytosolique, la concentration de l'inositol-1,4,5-trisphosphate et/ou la concentration de PKC (Baker et al., 1990; Aceto et al., 1990).

3.4.2- L'endothéline-1.

Il existe trois isoformes de l'endothéline : ET-1, ET-2 et ET-3 (Battistini et al., 1993; Braunwald, 1997). Ce sont des polypeptides de 21 acides aminés contenant deux ponts disulfures intramoléculaires (Battistini et al., 1993). Ils sont formés par un clivage endoprotéolytique à partir de précurseurs distincts (contenant 38-39 résidus) appelés "big" endothéline (bET-1, bET-2 et bET-3). L'endothéline-1 est synthétisée et relarguée à partir de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales, les macrophages, les leucocytes polymorphonucléaires humains, les fibroblastes, les cellules mésangiales de rats et humaines (Battistini et al., 1993).

Les récepteurs de surface qui reconnaissent les endothélines se trouvent sur les cardiocytes de rats et s'appellent: ET_A, ET_B, ET_C (Battistini et al., 1993). Même si ET_A et ET_B sont fonctionnellement différents, ils ressembleraient aux récepteurs de type rhodopsine, avec sept domaines transmembranaires et un couplage à des protéines G régulatrices (Battistini et al., 1993).

Ces récepteurs sont constitués de deux domaines : un domaine amino terminal, contenant une séquence signal et un domaine carboxy terminal, possédant des résidus sérine-thréonine, potentiels substrats pour les protéines kinases (Battistini et al., 1993).

L'endothéline-1 est un très puissant vasoconstricteur avec des effets inotropiques et chronotropiques, de même que des effets biphasiques sur la pression sanguine (Battistini et al., 1993). Les endothélines-1 et -2 ont la même activité pour induire la synthèse d'ADN alors que l'ET-3 est moins active (Battistini et al., 1993).

L'endothéline-1 stimule la synthèse d'ADN chez les cardiocytes ventriculaires (Battistini et al., 1993) et chez les fibroblastes cardiaques néonataux (Piacentini et al., 2000). De plus, ET-1 induit l'hypertrophie des cardiocytes nouveau-nés via les récepteurs ET_A (Battistini et al., 1993). Ces

effets hypertrophiques (à une concentration d'ET-1 de un nM) se caractérisent par des augmentations de la taille des cardiocytes, du nombre de sarcomères et du contenu protéique (Suzuki et al., 1990).

Les effets hypertrophiques de l'ET-1 sur les cardiocytes peuvent impliquer l'augmentation de l'expression des ARNm de certains gènes comme la chaîne légère-2 de la myosine, de l' α -actine, de la troponine-1, des chaînes lourdes α et β de la myosine (Battistini et al., 1993; Itoh et al., 1991).

Les contractions rythmiques des cardiocytes sont déclenchées par l'ET-1, dans des cardiocytes en culture (Fareh et al., 1996). L'endothéline-1 a donc un effet sur les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} .

3.4.3- Le TGF- β_1 .

A partir d'une protéine précurseur de 390 acides aminés, ce facteur de croissance est synthétisé sous forme d'un complexe latent, qui peut être activé par plusieurs facteurs tels que un pH extrême, la chaleur ou des enzymes protéolytiques (Lembo et al., 1995).

Chez les cardiocytes néonataux, le traitement avec le TGF- β_1 entraîne une sur-régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes cardiaques comme le β -MHC, l' α -actine squelettique, l'ANF et l' α -actine du muscle lisse (Braunwald, 1997). Ce facteur de croissance permet un contrôle du taux des battements cellulaires dans un milieu sans sérum et maintient un rythme régulier (Lembo et al., 1995; Roberts et al., 1993).

3.4.4- L'IGF-1.

L'IGF-1 est un peptide non glycosylé, constitué de 70 acides aminés ayant des homologies de fonction et de structure avec la pro-insuline (Lembo et al., 1995; Braunwald, 1997). Le récepteur à l'IGF-1 est semblable structurellement à celui de l'insuline. C'est un hétérotétramère composé de deux chaînes alpha de 125 kDa, orientées vers le côté extracellulaire, et de

deux chaînes bêta de 95 kDa, s'étendant à travers la membrane et contenant l'activité tyrosine kinase (Lembo et al., 1995).

De nombreux tissus synthétisent localement l'IGF selon un mode autocrine/paracrine. L'ARNm des gènes de la bêta-MHC, de la troponine-1 augmentent par la stimulation avec l'IGF-1 (Lembo et al., 1995; Braunwald, 1997); la synthèse protéique est également augmentée par l'IGF-1 chez les cardiocytes adultes. Les chercheurs ont démontrés que l'IGF-1 pourrait être impliqué dans une réponse hypertrophique adaptative pour ces cellules adultes; il existerait un effet de croissance du muscle squelettique et une myogénèse. En effet, une croissance incontrôlable des myofibrilles naissantes a lieu chez des cardiocytes adultes traités par l'IGF-1 (Braunwald, 1997).

3.4.5- L'ANP.

Le facteur natriurétique atrial ou ANP est issu d'une molécule appelée prépro-ANP de 152 acides aminés. Le clivage de son peptide signal engendre la pro-ANP (1-126), principale forme d'ANP stockée dans les granules auriculaires. Puis, un clivage protéolytique donne deux formes d'ANP : une inactive, l'ANP (1-98) et une active, l'ANP (99-126), également appelée ANP (1-28) (Koller et al., 1992; Brenner et al., 1990). L'ANP (99-126) possède une structure centrale en boucle du fait de l'existence d'un pont disulfure entre les cystéines situées en position 107 et 121 (Koller et al., 1992; Brenner et al., 1990). Il faut également noter que cet agencement en boucle est retrouvé dans d'autres peptides natriurétiques comme le BNP, présent au niveau du cerveau, et le CNP (Koller et al., 1992).

L'ANP est principalement synthétisé et stocké au niveau des cardiocytes auriculaires (Thibault et al., 1988; Brenner et al., 1990). Cependant, certains chercheurs ont montré que l'ANP est aussi sécrété par les cardiocytes ventriculaires (Brenner et al., 1990; Nemer et al., 1986). En effet, des granules identiques aux granules de sécrétion présents dans les oreillettes ont été trouvés dans les ventricules d'amphibiens (Nemer et al.,

1986). En fait, pendant la période pré natale, les niveaux d'ARNm et les quantités d'ANP sont bien plus élevés dans les ventricules que dans les oreillettes mais cette répartition s'inverse totalement après la naissance (Brenner et al., 1990). De la même façon, lors de l'hypertrophie ventriculaire gauche (Urbain et al., 1989) ou pendant un dysfonctionnement cardiaque (Thibault et al., 1988), il y a respectivement une ré-expression du gène de l'ANP au niveau des ventricules et une augmentation de la quantité d'ANP exprimée par les ventricules.

L'ANP a de nombreux rôles physiologiques tant au niveau rénal que cardiovasculaire. En induisant une hyperfiltration tubulaire rénale, inhibant le transport du sodium, supprimant le relargage de la rénine, l'ANP est responsable de la natriurèse, de la diurèse et de la diminution de pression artérielle (Brenner et al., 1990). Il inhibe également la synthèse d'aldostérone en supprimant la sécrétion de rénine. Il exerce surtout un effet vasorelaxant très puissant. Chez les fibroblastes cardiaques néonataux, l'ANP inhiberait la synthèse de l'ADN (Cao et al., 1995).

L'Ang II peut augmenter le relargage de l'ANP via les récepteurs AT_1 en activant la PKC et en augmentant la concentration de calcium intracellulaire (Thibault et al., 1999).

L'ET est également connue pour être un puissant stimulateur du relargage de l'ANP dans l'oreillette isolée de rat, via le récepteur ET_A (Thibault et al., 1999). Il y a une régulation différentielle dans chaque chambre cardiaque : dans l'oreillette gauche, la sécrétion d'ANP est stimulée par ET-2 et ET-3 uniquement. Par contre, dans l'oreillette droite, la sécrétion de l'ANP est stimulée par ET-1, ET-2 mais pas par ET-3 (Thibault et al., 1999).

4. Hypothèse de travail.

Les intégrines sont des molécules hétérodimériques transmembranaires qui jouent un rôle majeur, aussi bien dans de nombreux processus physiologiques cellulaires que dans certaines pathologies où leur expression s'en trouve modifiée.

Notre hypothèse de travail est que les intégrines de type RGD sont impliquées dans les processus cellulaires accompagnant l'hypertrophie cardiaque. Pour cette étude, des cellules néonatales de rats ont été utilisées lors des expériences visant à identifier les intégrines présentes, puis à observer l'effet des hormones ET-1 et AII.

Dans un premier temps, il a fallu caractériser les intégrines présentes à la surface des cardiocytes ventriculaires et des fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés par immunobuvardage. La localisation de ces intégrines par rapport aux foyers d'adhésion a ensuite été rendue possible par des expériences d'immunocytochimie. Puis, nous avons regardé par buvardage northern l'expression des ARNm de certaines sous-unités des intégrines (α_v , β_3 , β_1 et α_8) pour confirmer les résultats obtenus par immunobuvardage.

Nous avons ensuite voulu connaître la réponse, *in vitro*, des cellules néonatales après l'addition exogène d'hormones telles que l'AII et l'ET-1. À savoir : a. L'incorporation de traceurs radioactifs a permis d'évaluer le potentiel hyperplasique (d'après l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN) ou hypertrophique (d'après l'incorporation de leucine tritiée dans les protéines) de ces facteurs de croissance sur les cellules cardiaques néonatales. b. Le contenu protéique total a été dosé selon la méthode de Bradford pour observer les changements éventuels causés par les stimulations rendant compte du caractère hypertrophique de l'hormone. c. Parallèlement à ces stimulations, nous avons regardé l'évolution du profil

des intégrines en quantifiant et normalisant (par rapport à la quantité de protéines) les bandes de radioactivité obtenues à partir des gels SDS-PAGE.

d. Chez l'adulte, l'hypertrophie ventriculaire est caractérisée par une fibrose très importante et par la réapparition de l'expression du gène de l'ANP. Nous avons voulu savoir si les mécanismes cellulaires chez un cœur néonatal étaient semblables à ceux d'un cœur adulte. Finalement, pour se faire, nous avons mesuré les niveaux de fibronectine (par méthode ELISA) et d'ANP (par dosage radioimmunologique) sur des cellules cardiaques de rats néonataux en culture, après stimulations par l'Ang II et l'ET-1.

Chapitre II- Méthodologie.

Milieu de culture pour les cardiocytes :

- ✓ CSFM-1 (pH 7,1-7,2) : 14 g/L DMEM et 10,62 g/L F-12; 3,3 mM acide pyruvique; 5 mM Hepes; 25 mM NaHCO₃; 2,5 mM tricine; 64 nM apo-transferrine; antibiotique-antimycotique (100 unités/mL de pénicilline G, 100 µg/mL de streptomycine et 0,25 µg/mL d'amphotéricine B).
- ✓ CSFM-2 : 1500 mL de CSFM-1; 1% BSA (Fatty Acid-Free 98%); 0,025% fétuine; 0,5% vitamine 100X; 0,4 µM acide palmitique; 0,11 mM acide ascorbique; 128 µM sélénium; 0,35 µM insuline; 1,67 µM facteur de croissance épidermique; 0,1 nM tyroxine; 0,2 µM dexaméthasone.
- ✓ JOKLIK (pH 7,4) : 11,2 g/L Joklik; 0,2% NaHCO₃.
- ✓ Milieu de digestion : 110 mL de Joklik pH 7,4; 0,1% Collagénase; 0,01% DNase; antibiotique-antimycotique (10 unités/mL de pénicilline G, 10 µg/mL de streptomycine et 2,5 µg/mL d'amphotéricine B).

Milieu de culture pour les fibroblastes : (pH 7,1-7,2)

1,35% DMEM; 44 mM NaHCO₃; 14,7 mM Hepes; 0,2% BSA; pénicilline-streptomycine (100 unités/mL de pénicilline G et 100 µg/mL de streptomycine); 10% FBS.

Tampon d'échantillon contenant du SDS : 6% Sodium Dodécyl Sulfate; 0,5 M Tris-HCl pH 6,5; 30% glycérol; bleu de bromophénol.

Solution 5-1-5 : 45,5% méthanol; 9% acide acétique; 45,5% eau distillée.

Solution 1-1-9 : 9% méthanol; 9% acide acétique; 82% eau distillée.

Matériels :

Les produits les plus communs viennent de chez Sigma (Toronto, ON) ou Fischer.

- Acide pyruvique : Sigma, Toronto, ON, Ref :P-2256.
- Acrylamide : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15512-031.
- Agarose : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15510-019.
- Antibiotique-antimycotique : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15240-062.
- Anticorps alpha 5 (lapin, polyclonal) : Chemicon, Mississauga, ON, Ref :AB 1928.
- Anticorps alpha v (lapin, polyclonal) : Chemicon, Mississauga, ON, Ref :AB 1930.
- Anticorps alpha 3 (lapin, polyclonal) : Chemicon, Mississauga, ON, Ref :AB 1920.
- Anticorps bêta 1 (hamster, monoclonal) : Pharmingen, Mississauga, ON, Ref :Ha2/5.
- Anticorps bêta 3 (souris, monoclonal) : Pharmingen, Mississauga, ON, Ref :F₁₁.
- Anticorps bêta 1 (lapin, polyclonal) : Don du Dr Hynes R.O., Institut médical Howard Hughes, Cambridge, MA, USA, Ref :130L.
- Anticorps alpha 3 (lapin, polyclonal) : Don du Dr Hynes R.O., Institut médical Howard Hughes, Cambridge, MA, USA, Ref :8-4.
- Anticorps alpha 5 (lapin, polyclonal) : Don du Dr Hynes R.O., Institut médical Howard Hughes, Cambridge, MA, USA, Ref :160C2 et 1300C.
- Anticorps alpha 8 (lapin, polyclonal) : Don du Dr Lynn M. Schnapp, Ecole de Médecine Mount Sinai, New York, USA.
- Anticorps anti-hamster biotinylé : Pharmingen, Mississauga, ON, Ref :12222D.

- Anticorps chèvre anti-souris : Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Ref :SC-2010.
- Anticorps anti-lapin-HRP conjugate : Bio-Rad, Ref :170-6515.
- Anticorps anti-souris : Bio-Rad, Ref :170-6516.
- Anticorps anti-lapin couplé à la rhodamine : Chemicon, Mississauga, ON, Ref :AP187R.
- Anticorps anti-lapin couplé à la fluorescéine : Chemicon, Mississauga, ON, Ref :AP187F.
- Anticorps anti-souris couplé à la rhodamine : Chemicon, Mississauga, ON, Ref :AP181R.
- Anticorps anti-souris couplé au FITC : Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Ref :sc-2010.
- Anticorps marquant l' α -actine sarcomérique issu d'un clone EC5 (souris, monoclonal): Sigma, Toronto, ON, Ref :A-2172.
- Anticorps anti-souris couplé au FITC (pour l' α -actine sarcomérique) : Sigma, Toronto, ON, Ref :F-1010.
- Apo-transferrine : Sigma, Toronto, ON, Ref :T-0178.
- Bacto-agar : Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.
- Bis-acrylamide : ICN Biomedicals Canada Lte, Toronto, ON, Ref :800173.
- Bromophénol : ICN Biomedicals Canada Lte, Toronto, ON, Ref :805732.
- BSA : ICN Biochemicals Canada Lte, Toronto, ON, Ref :160069.
- Collagénase type II : Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ, Ref :4177
- dCTP radioactif : Amersham Pharmacia Biotech., Montréal, QC, Ref : AA005.
- Dexaméthasone : Sigma, Toronto, ON, Ref :D-1756.
- DMEM-high glucose : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :12800-066.
- DNase : Roche Diagnostics, Laval, QC, Ref :104 159.

- Enzymes de restriction : Canadian Life Technologies, Burlington, ON- Eco R_I: Ref :15202-013; Hind III : Ref :15207-020.
- Facteur de croissance épidermique : Roche Diagnostics, Laval, QC, Ref :855-731.
- F-12 Nutrient Mixture : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :21700-075.
- Fétuine : Sigma, Toronto, ON, Ref :F-3385.
- Guanidium isothiocyanate : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15535-016.
- Hepes : Sigma, Toronto, ON, Ref :H-3375.
- Insuline : Sigma, Toronto, ON.
- Joklik : Canadian Life Technologies, Ref :22300-107
- MOPS : Sigma, Toronto, ON, Ref :M-9024.
- NaHCO₃: ACP, St Léonard, QC, Ref :S-2150.
- Pénicilline-streptomycine : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15140-122.
- Phénol : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15509-011.
- Plasmide β_1 : Don du Dr Post M., Département de Pédiatrie, Institut de Recherche pour les enfants malades, Université de Toronto, ON (Am.J.Physiol. 270 :L459,1996).
- Plasmide α_8 : Don du Dr Hartner A., Clinique médicale IV, Université Erlangen-Nurnberg, Erlangen, Allemagne.
- Plasmides β_3 et α_v : Don du Dr Rodan G.A., Département de recherche sur l'ostéoporose et la biologie de l'os, Laboratoire de recherche Merck Sharp et Dohme, West Point, Pennsylvanie (J.Bone Min.Res. 8 :403,1993).
- Plaques de 24 puits PRIMARIA : Falcon, Ref :62406456.
- Plaques de 24 puits : Falcon, Ref :CA62406183.
- Sodium acétate : Sigma, Toronto, ON, Ref :S-2889.
- Sodium citrate : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15584-022.

- Streptavidine-horseradish peroxidase : Amersham Pharmacia Biotech, Montréal, QC, Ref :RPN-1231.
- Super Signal ECL : Pierce, Rockford, IL, Ref :34080.
- TEMED : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15524-010.
- Tricine : Sigma, Toronto, ON, Ref :T-6272.
- Tyroxine : Sigma, Toronto, ON, Ref :T-5516.
- Vitamine 100X : Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :11121-019.
- Xylène cyanol : Fischer Biotechnology, Ref :BP125-50.

TAMPONS.

- Tampon PBS (10X), pH 7,4 : 1,4 M chlorure de sodium (NaCl); 27 mM chlorure de potassium (KCl); 0,1 M sodium phosphate dibasique (Na_2HPO_4); 18 mM potassium phosphate monobasique (KH_2PO_4).
- Tampon sodium phosphate (NaPO_4) 0,5 M, pH 7,4 : 0,5 M Na_2HPO_4 ; 0,5 M NaH_2PO_4 .
- Tampon ELISA : 0,02 M NaPO_4 pH 7,4; 0,9% NaCl; 0,05% Tween 20.
- Tampon RIA : 0,1 M NaPO_4 ; 0,1 M NaCl; 0,1% BSA; 0,1% Triton X-100; 3 nM sodium azide.
- Tampon citrate phosphate 0,1 pH 5.0 : 0,1 M acide citrique; 0,1 M NaPO_4 pH 7,4.
- Tampon de lyse : 0,05 M Hepes pH 7,4; 0,15 M NaCl; 1% NP-40; 1 mM chlorure de magnésium (MgCl_2); 1 mM chlorure de calcium (CaCl_2); 5 μM pepstatine; 5 μM leupeptine; 50 U/mL aprotinine; 0,5 μM PMSF.
- Tampon de transfert : 0,05 M NaPO_4 pH 7,4; 0,9% NaCl; 0,1% Tween 20.
- Tampon d'immunobuvardage : 0,05 M NaPO_4 pH 7,4; 0,9% NaCl; 0,1% Tween 20; 4% sérum de veau.
- Solution dénaturante : 4 M guanidium isothiocyanate; 25 mM sodium citrate pH 7; 0,5% n-laurylsarcosine (Sarkosyl). Il reste à ajouter 0,7% β -mercaptoéthanol.
- Solution T₁₀E₅S₁ : 10 mM Tris; 5 mM EDTA; 1 mM SDS.

- Solution TE (pH 7,5): 1 mM Tris; 1 mM EDTA.
- Tampon de migration 5X: 0,2 M MOPS 10X; 50 mM acétate de sodium; 5 mM EDTA.
- MOPS 10X : solution 1 M, pH 7,0.
- Tampon de chargement : 50% glycérol; 1 mM EDTA; 0,4% bromophénol; 0,4% xylène cyanol.
- 10X SSC (pH 7,0): 1,5 M chlorure de sodium; 1,9 M sodium citrate.
- TBE 1 X : 89 mM Tris-borate (pH 8,3); 2 mM EDTA dihydraté disodé.

Méthodes.

I)- Culture cellulaire.

Les cultures cellulaires ont été effectuées avec des cœurs de rats nouveau-nés âgés de trois jours (Corporation Charles River Canada, Québec). Deux portées de 15 rats sont sacrifiées l'une après l'autre. Tout d'abord, l'anesthésie consiste en l'injection d'un mélange de pentobarbital de sodium (Somnotol®, MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON) et d'héparine (300 µL héparine (Organon Teknika, Toronto) 10 000 U/mL et 2,7 mL saline stérile), respectivement 25 et 50 µL intrapéritonéalement. Les rats nouveau-nés sont décapités et les corps sont plongés dans l'éthanol à 70%. Ensuite, sous la hotte stérile, seuls les ventricules cardiaques sont prélevés à l'aide d'instruments stériles et déposés dans un Pétri stérile (Starstedt, St Léonard, Canada) de 10 cm contenant 10 mL de Joklik et 250 µL d'héparine à 10 000 U/mL. Les appendices ventriculaires sont rincés plusieurs fois avec le Joklik et quand la solution de lavage est claire, les ventricules sont émincés avec des scalpels stériles pour faciliter la digestion cellulaire. Les morceaux ainsi obtenus sont rincés plusieurs fois avec le Joklik et transférés dans un Erlenmeyer de 50 mL stérile. Vingt-cinq mL de la solution de digestion sont ajoutés et l'Erlenmeyer est placé dans un bain-marie (Precision Scientific) pour une incubation de 20 minutes, à 37°C et sous une agitation de 120 cycles par minute.

Après cette première incubation, les cellules sont détachées grâce à des allées et venues dans une pipette stérile de 10 mL (Starstedt, St Léonard, Canada). Alors que le surnageant cellulaire est transféré dans un tube conique stérile de 50 mL (VWR Scientifique du Canada Ltee, Ville Mt Royal, QC), les morceaux restants subissent une deuxième digestion par ajout de 15 mL de milieu contenant la collagénase, à 37°C, pendant 20 minutes et sous une agitation de 120 cycles par minute. Dix mL de FBS (Fetal Bovine Serum, Wisent, St Bruno, Québec) sont ajoutés aux deux surnageants cellulaires

réunis et sont filtrés dans une seringue de 20 mL à travers une membrane de nylon stérile de 100 µm. Suit une centrifugation (IEC Clinical Centrifuge) de trois minutes à vitesse cinq. Après avoir aspiré le surnageant, les cellules sont resuspendues dans un milieu contenant du CSFM-1 et 10% de FBS. Puis, deux pré étalements à 37°C, de 30 minutes chacun, permettent de séparer les fibroblastes des cardiocytes. Les fibroblastes, ayant adhéré aux Pétris, sont ensuite placés dans un milieu contenant le DMEM, FBS 10% et pénicilline/streptomycine 1%, à 37°C et 10% CO₂. La solution, contenant les cardiocytes encore en suspension, est centrifugée trois minutes à vitesse cinq. Les cellules du culot sont resuspendues dans le milieu CSFM-2 et 10% d'ara-C (Cytosine-1-β-D-Arabinofuranoside, Sigma, Toronto, QC, Ref :C-1768). L'ara-C est un agent anti-prolifératif qui, en tant qu'analogue de la cytosine, bloque temporairement la prolifération des fibroblastes. En effet, ces deux pré étalements constituent une méthode grossière de séparation et la solution de cardiocytes obtenue n'est pas pure, il peut exister une contamination des cardiocytes par les fibroblastes. Un compte cellulaire est ensuite effectué avec du bleu trypan 0,4% et les cellules sontensemencées dans des boîtes Primaria de 24 puits et placées à 37°C, 5% CO₂. La densité des cellules est 200 000 cellules/cm². Le traitement avec l'ara-C est maintenu 72 heures et ensuite, les cellules baignent dans le CSFM-2 seul. A titre comparatif, le même protocole a été réalisé sans addition d'ara-C et les densités sont alors 25 000, 50 000 et 100 000 cellules/cm².

Quant aux fibroblastes, un passage cellulaire est effectué huit jours après la culture et les cellules sontensemencées dans des boîtes de 24 puits à des densités de 10 000, 25 000 et 50 000 cellules/cm².

II)- Stimulations cellulaires avec différents facteurs de croissance.

Chaque stimulation est précédée d'une mise à jeûn des cellules pendant 24 heures (milieu CSFM-1 pour les cardiocytes et DMEM, pénicilline/streptomycine 1% pour les fibroblastes). Cette mise à jeûn survient

quatre jours après la culture pour les cardiocytes et trois jours après le passage pour les fibroblastes. Les facteurs de croissance testés sont les suivants : All (10^{-8} M et une courbe dose-réponse allant des concentrations 10^{-11} M à 10^{-7} M), ET-1 (10^{-8} M et une courbe dose-réponse allant des concentrations 10^{-11} M à 10^{-7} M). Le FBS représentera le contrôle positif pour les deux types cellulaires. Dans toutes les expériences, on utilisera la [Sar¹]All, un analogue de l'angiotensine II résistant aux protéases, à la place de l'angiotensine II et on notera All.

III)- Mise en évidence des phénomènes de prolifération cellulaire et synthèse protéique.

La prolifération cellulaire est suivie par l'incorporation de thymidine tritiée (Amersham Pharmacia Biotech, Montréal, QC, Ref :TRK 686) à raison de un μ Ci par puits. La synthèse protéique est suivie par l'incorporation de leucine tritiée (Amersham Pharmacia Biotech, Montréal, QC, Ref :TRK 510) à raison de deux μ Ci par puits. Ces incorporations sont faites stérilement, 24 heures après les stimulations pour la leucine et 48 heures après, pour la thymidine. L'incorporation de ces marqueurs radioactifs est bloquée après 24 heures pour la leucine et après 6 heures pour la thymidine.

IV)- Les dosages.

4.1- Dosage de la thymidine et de la leucine tritiée.

Sur la glace, les plaques sont lavées trois fois avec du PBS (Phosphate Buffer Saline). L'ajout d'un mL de TCA 10% (Trichloroacetic Acid) dans chaque puits permet de précipiter les macromolécules et d'éliminer la leucine et la thymidine non-incorporées. Les plaques sont laissées ainsi pendant trente minutes sur la glace pour faciliter encore le dépôt d'ADN et de protéines. Deux lavages avec du méthanol froid à 95% éliminent le TCA. Après séchage des plaques à l'air, l'ADN et les protéines sont redissous dans 200 μ L de soude

(NaOH) 0,2 M. Les plaques sont fortement agitées pendant 90 minutes, à température ambiante, puis la soude est neutralisée avec 200 μL d'HCl 0,2 M. Pour le comptage radioactif, 200 μL de chaque échantillon sont mélangés avec quatre mL de liquide scintillant (Amersham Pharmacia Biotech, Montréal, QC, Ref :NBCS 104) dans des vials à scintillation, ensuite disposés dans le compteur bêta.

4.2- Dosage de l'ANF par test radio-immunologique (RIA).

4.2.1- Iodation de l'ANF.

La méthode utilisée pour l'iodation est une modification de la méthode décrite par Gutkowska (1987) et Chen (1994). L'iodation est réalisée avec la chloramine T (Sigma, Toronto, ON, Ref :C-9887) et la poudre de verre qui représente le support pour la fixation de l'ANF radioactif.

Sous hotte, 10 μg d'ANF 99-126 lyophilisé et 100 μL de tampon NaPO_4 0,5 M, pH 7,5 sont mélangés et 20 μL de cette solution est déposé dans un tube conique en verre. Un mCi d'iode 125 (Amersham Pharmacia Biotech, Montréal, QC, Ref :IMS 30) y est ajouté. Après reconstitution de la chloramine T par du tampon NaPO_4 0,05 M (10 mg chloramine T pour 4 mL tampon NaPO_4 0,05 M) et de la poudre de verre par ajout de tampon NaPO_4 0,05 M, 0,1% BSA (ICN Biomedicals Canada Lte, Toronto, ON, Ref : 160069) (35 mg de poudre de verre pour 10 mL NaPO_4 0,05 M, 0,1% BSA), 20 μL de chloramine T sont ajoutés dans le tube conique. La solution est mélangée par plusieurs allées et venues avec une pipette. La solution est ensuite transférée dans le tube contenant la poudre de verre reconstituée puis elle est mélangée. Deux fois de suite, la poudre de verre est lavée avec cinq mL d'eau déionisée, après agitation de la solution dix minutes et centrifugation deux minutes, le surnageant très radioactif étant jeté entre chaque séquence de lavage. La poudre de verre est lavée pendant dix minutes avec deux mL d'un mélange

d'acétone 40% et HCl 0,25% puis centrifugée pendant quatre minutes. L'acétone acidifié permet l'élution de l'ANF.

4.2.2- RIA pour l'ANF 99-126.

Le RIA est réalisé avec les milieux de culture recueillis après stimulation des cardiocytes néonataux suivant le protocole de Gutkowska (1987). Toutes les incubations sont faites dans des tubes 12 x 75 mm (Sarstedt, St Léonard, QC), en duplicata. Le tampon RIA est utilisé pour les dilutions sérielles (1 :2) de l'ANF non marqué (de 10 000 fmol/mL à 19,5 fmol/mL). La dilution de l'anticorps 17/14 (1 :8 000) ou 17/18 (1 :10 000) (Gutkowska et al., 1987) dans le tampon RIA se fait juste avant l'utilisation. Pour 100 µL de standard (de 10 000 fmol/mL à 19,5 fmol/mL) ou 5 µL d'inconnue, on ajoute, respectivement, 100 et 195 µL de tampon RIA, 100 µL d'¹²⁵I-ANF (8 000 cpm) et 100 µL de l'anticorps utilisé. La solution est mélangée et incubée 48 heures à 4°C. Le traceur lié à l'anticorps est précipité en ajoutant 100 µL d'anticorps de chèvre dirigé contre les immunoglobulines de lapin (dilution 1 :25) (Medicorp, QC) et 100 µL de sérum normal de lapin (1 :50). Suit une incubation de deux heures à température ambiante. Ensuite, un mL de polyéthylène glycol 8000 (12,5%) est ajouté dans chaque tube et après mélange, les tubes sont centrifugés pendant 20 minutes à 3 000 cycles par minute (Sorvall RT6000B). Le surnageant est aspiré et le culot est mis au compteur gamma pour mesurer la radioactivité.

4.3- Dosage de la fibronectine par méthode ELISA.

Le milieu de culture de chaque puits a été recueilli après stimulation des fibroblastes cardiaques. Cette technique a été modifiée par rapport au protocole décrit précédemment par Rennard (1980). Toutes les réactions sont faites en triplicata. Le tampon ELISA servira, entre autre, pour les dilutions sérielles de fibronectine (1 :3) de manière à réaliser une courbe standard allant

de 0 à 250 ng/200 μ L. La dilution de l'anticorps de rat contre la fibronectine (Calbiochem Corporation, La Jolla, CA, Ref :341654) (1 :1 428.6) se fait dans le tampon ELISA juste avant l'utilisation. Les puits Immulon II (Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :469949) sont enrobés avec de la fibronectine (200 ng/200 μ L) diluée dans le tampon sodium carbonate 0,02 M, pH 9,6 (mélange d'une solution 0,2 M Na_2CO_3 et 0,2 M NaHCO_3). Pour 350 μ L de standard (dilutions 0 à 250 ng/200 μ L) ou pour 20 μ L d'inconnue, on ajoute respectivement 700 et 680 μ L de tampon ELISA additionné de 3% BSA, 10 μ L de l'anticorps de rat contre la fibronectine (1 :7 143). La solution est mélangée et incubée à 4°C pendant 18 heures. Pour les plaques de 96 puits, l'incubation se fait dans une chambre humide à 4°C. Après incubation, les plaques sont lavées plusieurs fois avec le tampon ELISA et les sites non-spécifiques sont bloqués en ajoutant, dans chaque puits, 200 μ L de tampon ELISA additionné de 3% BSA. L'incubation a lieu deux heures à température ambiante. Toutes les étapes qui suivent sont séparées par quatre ou cinq lavages avec le tampon ELISA. Les puits sont remplis par 200 μ L de standard ou d'échantillons et l'incubation se fait pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, une incubation de deux heures à température de la pièce est faite avec 200 μ L d'anticorps secondaire (anti-lapin) lié à la peroxydase (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Ref :170-6515), dilué dans le tampon ELISA et 3% BSA (1 :5 000). La détection du complexe est faite en ajoutant, dans chaque puits, 200 μ L d'une solution composée de deux mL de O-phénylènediamine (20 mg de produit/mL méthanol) (Sigma, Toronto, ON, Ref :P-1526), de 98 mL d'une solution tampon citrate phosphate 0,1 M, pH 5,0 et de 10 μ L de H_2O_2 30% (peroxyde d'hydrogène). La réaction a lieu à la noirceur (le phénylènediamine est photosensible) et est arrêtée au bout de 30 minutes, par l'ajout de 100 μ L H_2SO_4 4N. La densité optique est alors mesurée grâce à un lecteur de plaques (Microplate Auto-Reader, Bio Tek Instruments) à une longueur d'onde de 490 nm.

4.4- Détection des complexes d'intégrines.

4.4.1- Iodation de l'échistatine.

L'iodation de l'échistatine (Bachem California, Torrance, CA, Ref :H-9010) consiste en une catalyse par la lactoperoxydase selon la méthode décrite par Morrison (1970). Dans un tube conique, 15 µg de peptide sont ajoutés à 40 µL de tampon NaPO₄ 0,05 M, pH 7,4. Ensuite, un mCi d'iode radioactif et 15 µL de lactoperoxydase sont placés dans le tube. Successivement, toutes les cinq minutes et trois fois de suite, 15 µL d'H₂O₂ 0,002% (1 :15 000) sont ajoutés. La réaction est bloquée au bout de 15 minutes avec l'injection du mélange iodé sur une colonne C18 d'un appareil HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). L'élution a lieu grâce à un gradient d'acétonitrile de 0 à 50% et les fractions sont collectées dans des tubes 13x75mm (Sarstedt, St Léonard, QC, Ref :55475) préalablement enrobés par 100 µL de BSA 1%.

4.4.2- Visualisation des intégrines par électrophorèse et autoradiographie.

Après stimulations des cellules (cardiocytes ou fibroblastes), les boîtes de 24 puits sont lavées deux fois avec du tampon Hepes 0,05 M; pH 7,4. Les cellules sont détruites, après 20 minutes, par ajout de 100 µL par puits de tampon de lyse. La liaison intégrine-échistatine iodée se réalise par l'addition de 150 µL par puits d'échistatine marquée (1×10^6 cpm/puits), en présence de Mn²⁺ (5mM) et l'incubation a lieu 90 minutes. Elle est bloquée avec 50 µL de SDS-Sample Buffer par puits. Ensuite, 20 µL de chaque échantillon sont placés sur le gel d'électrophorèse (Laemmli, *Nature*, 1970, 227, 680-685) à 6% de polyacrylamide. La migration électrophorétique a lieu à température ambiante pendant deux heures à 130 volts. Les positions des complexes protéiques sont repérées par coloration au Bleu de Coomassie 0,05% pendant 45 minutes. Le surplus de colorant est retiré avec la solution 5-1-5 (lavages de

15 minutes), et avec la solution 1-1-9 (lavages de 30 minutes). Le gel est séché avec un sécheur de gels (BioRad). Les bandes correspondants au complexe intégrines-échistatine iodée sont détectées par l'impression d'un film autoradiographique Kodak XAR-5 (VWR Scientifique du Canada Ltee, Ville Mt Royal, QC, Ref :IB1651496) après incubation à l'obscurité et à -80°C . La quantité de radioactivité présente dans chaque bande peut être aussi être quantifiée grâce à un écran de phosphore et au logiciel Phosphor-Imager.

4.4.3- Immunobuvardages.

Après l'électrophorèse, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond (Amersham Pharmacia Biotech, Montréal, QC, Ref :RPN303D). Le transfert dure une heure à 100 volts à 4°C . La membrane est exposée sur film Kodak XAR-5 pour visualiser le profil des intégrines. Les sites non-spécifiques sont bloqués pendant une heure, à température ambiante et sous faible agitation, en faisant tremper les membranes dans le tampon de blocage avec 4% de sérum de veau (Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :26140-079). Les étapes suivantes sont séparées par quatre lavages de cinq minutes pour enlever l'excès de produit. Sous agitation et à température ambiante, les membranes sont incubées pendant 90 minutes avec le premier anticorps (lapin : 130L, AB1920, 8-4, 160C2, AB1928, 1300C, L.S., AB1930; souris : β_3 ; et hamster : β_1) dilué 1 :1 000 dans le tampon d'immunobuvardage (t.i.), puis avec l'anticorps secondaire. La dilution est différente selon la cible de l'anticorps : les anticorps faits chez le lapin sont dilués 1 :25 000 et incubés 60 minutes; l'anticorps fait chez la souris est dilué 1 :10 000 et incubé 90 minutes. Les dilutions sont faites dans le t.i. avec 2% de sérum de veau. L'anticorps fait chez le hamster, lié à la biotine, est dilué 1 :1 000 dans le t.i. seul et incubé pendant 90 minutes. Pour cet anticorps, une incubation supplémentaire de 30 minutes est nécessaire avec la solution de streptavidine conjuguée à la peroxydase (1 :1 000). Les membranes sont ensuite incubées dans le Super-

Signal (Pierce, Rockford, IL, Ref :34080) une minute en agitant, égouttées et placées dans un acétate pour l'exposition sur un film.

4.5- Dosage des protéines par la méthode de Bradford.

Après stimulation des deux types cellulaires, les puits sont lavés deux fois avec une solution d'Hepes 0,05 M pH 7,4. Les cellules sont éclatées, par agitation forte, en ajoutant 200 μ L par puits d'une solution de NaOH 1M, neutralisée par 100 μ L d'une solution d'HCl 2N. On ajoute ensuite un mL du réactif de Bradford (BioRad Laboratories, Mississauga, ON, Ref :500-0006) dilué 1 :5 directement dans les puits et, après une faible agitation, les échantillons sont transférés dans des tubes 12x75mm dans lesquels on verse un mL du réactif de Bradford. Les tubes sont vortexés et, une fois la réaction stabilisée, au bout de cinq minutes, la densité optique est mesurée avec un spectrophotomètre à 595 nm (Shimadzu, UV160U).

4.6- Extraction d'ARNm et northern-blot.

4.6.1- Extraction d'ARNm à partir des cardiocytes et des fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés.

Le protocole et les densités cellulaires utilisés sont identiques à ce qui a été utilisé pour les stimulations cellulaires (parties I et II).

La moitié des boîtes contenant les cellules cardiaques est mise à jeun pendant que l'autre moitié est stimulée soit avec de l'angiotensine II à une concentration de 10^{-7} M pour les fibroblastes cardiaques, soit avec de l'endothéline-1 à une concentration de 10^{-7} M pour les cardiocytes néonataux. Le facteur de croissance est laissé pendant 48 heures puis l'ARNm des cellules stimulées et à jeun est extrait. Le protocole utilisé, adapté de la méthode décrite par Chomczynski et Sacchi (1987), est identique pour les deux types cellulaires. Tout le matériel utilisé est stérile.

Les pétris sont d'abord lavés avec du PBS pour enlever toute trace de milieu de culture. La solution dénaturante est ensuite ajoutée puis un lysat visqueux (macromolécules et débris cellulaires) est récolté dans un tube de 15 mL et homogénéisé au polytron. 300 μ L de sodium acétate 2 M, pH 5,2, trois mL de phénol saturé en eau et 600 μ L de chloroforme/isoamyl (49 :1) sont ajoutés successivement dans chaque tube, chaque ajout étant séparé par une inversion manuelle permettant une homogénéisation totale. Les tubes sont mis sur la glace pendant 15 minutes, puis centrifugés 20 minutes à 8 000 cycles par minute à 4°C et la phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube. Un volume équivalent d'isopropanol est ajouté et après agitation, une incubation de 30 minutes à -20°C a lieu. Suit une centrifugation de 10 minutes à 8 000 cycles par minute à 4°C après laquelle le surnageant est jeté. Le culot constitué par l'ARN est resuspendu dans 800 μ L de chlorure de lithium 4 M. Le chlorure de lithium précipite l'ARN de haut poids moléculaire comme l'ARNr et l'ARNm et dissout le glycogène. La solution, placée dans un eppendorf, est centrifugée à 10 000 cycles par minute pendant 10 minutes à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 400 μ L d'une solution T₁₀E₅S₁, pH 7,5, suivi par 400 μ L de chloroforme. Une centrifugation de deux minutes à 10 000 cycles par minute à 4°C permet de récupérer la phase aqueuse contenant l'ARN qui sera précipité par ajout successif de 40 μ L d'acétate de sodium 3 M, pH 5,2, et 900 μ L d'éthanol 100%. Après une incubation allant de 12 à 16 heures à -80°C, les tubes contenant l'ARN précipité sont centrifugés 10 minutes à 10 000 cycles par minute à 4°C. Le lavage du culot avec 500 μ L d'éthanol 70% est suivi par une centrifugation d'au moins 5 minutes à 4°C à 10 000 cycles par minute. L'éthanol est retiré et le culot, lyophilisé. Le culot obtenu est resuspendu dans 50 μ L de T₁₀E₅S₁ pour les fibroblastes cardiaques et dans 20 μ L de cette même solution pour les cardiocytes. La concentration d'ARN est estimée après lecture de la densité optique à 260 et 280 nm, en effectuant une dilution 1 :100 de l'ARN dans une solution de TE, pH 7,5. L'ARN sera conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

4.7.2- Analyse des ARNm par buvardage northern.

Le protocole utilisé est une adaptation de la méthode décrite par Lehrach et al (1977).

20 μ L d'une solution composée de 120 μ L de tampon de migration 5X, 100 μ L de formaldéhyde, 300 μ L de formamide (Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15515-026) et deux μ L de bromure d'éthidium (Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Ref :15585-011) sont ajoutés à 10 μ g d'ARN de chaque échantillon. Tout le mélange est chauffé à 65°C pendant 15 minutes. Deux μ L de tampon de chargement sont ajoutés à chaque échantillon et les tubes sont mis sur la glace jusqu'à leur chargement sur un gel d'agarose 1% contenant de la formaldéhyde (Maniatis, 1989, p.6.9-6.13). Après migration des échantillons, le gel est photographié à l'aide de l' α -imager puis lavé plusieurs fois avec de l'eau déionisée. Suite à un lavage d'une heure dans une solution 10X SSC (pH 7,0), les échantillons du gel sont transférés (Maniatis, 1989, p.7.46-7.48) par capillarité sur une membrane de nylon Gene Screen Plus (New life science products, Boston, MA, Ref :NEF988). Ce transfert dure 48 heures. La membrane obtenue est photographiée, lavée trois fois pendant 15 minutes dans une solution 2X SSC (pH 7,0), séchée dans un four à étuve à 80°C pendant deux heures puis conservée à température de la pièce entre deux feuilles de papier filtre (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA, Ref :10427742).

4.7.3- Transformation bactérienne.

Les bactéries compétentes utilisées sont des souches d'E. coli. Le protocole utilisé est une adaptation de celui décrit par Maniatis (Molecular cloning, 1989, p.1.76 à 1.81).

Dix à 50 ng de plasmide sont ajoutés aux bactéries, le tout étant laissé sur la glace pendant 30 minutes. L'entrée du plasmide dans les bactéries se fait grâce à un choc thermique d'exactly 45 secondes à 42°C. Une incubation

sur la glace de deux minutes précisément permet aux pores bactériens de se refermer. Les tubes sont laissés à 37°C pendant une heure, sous agitation, après un ajout de 900 µL de LB (Sigma, Toronto, ON, Ref :L-7658). Un volume approprié du mélange est étalé sur l'agar et les pétris sont placés à 37°C, en position inversée. Les colonies apparaissent en 12 à 16 heures. Ces pétris sont ensuite placés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Une colonie bactérienne est prélevée et déposée dans un tube stérile de 50 mL avec du milieu de culture LB et de l'ampicilline (Sigma, Toronto, ON, Ref :A-0166) à une concentration de 50 µg/mL . Ceci est suivi d'une incubation de 17 heures à 37°C, sous une agitation de 250 cycles par minute. Le kit "Concert High Purity Plasmid Maxiprep System" (Life Technologies, Burlington, ON, Ref :11452-018) permet d'isoler l'ADN; le protocole utilisé est basé sur la méthode décrite par Birnboim et Doly (1979). 20 µg du plasmide obtenu sont coupés par les enzymes de restriction appropriées pendant 12 à 16 heures, à 37°C : le plasmide contenant l'insert α_v et celui contenant l'insert β_3 sont coupés par Eco R_I et Hind III. Les plasmides contenant les inserts β_1 et α_8 respectivement sont coupés avec l'enzyme de restriction Eco R_I. Les inserts sont ensuite isolés sur un gel d'agarose 1%, 0,5X TBE. La purification de l'insert se fait en utilisant le kit GeneClean II (Bio/Can Scientific, Mississauga, ON, Ref :1001-400) et le résultat obtenu est testé sur gel d'agarose 1%, 0,5X TBE.

4.7.4- Préparation de la sonde d'ADN radioactive et hybridation.

L'ADN obtenu après purification sert à préparer la sonde radioactive selon le protocole classique d'amorce aléatoire (Feinberg et Vogelstein, 1983; Maniatis, 1989, p.10.13-10.17). Après une préhybridation de deux à trois heures à 42°C, l'hybridation entre la membrane de nylon contenant l'ARNm et la sonde radioactive a lieu pendant 12 à 16 heures à 42°C. Des lavages successifs avec plusieurs solutions (2X SSC à température ambiante; 2X SSC à 42°C; 2X SSC additionné de 1% SDS) permettent d'enlever toute la

radioactivité résiduelle. Le résultat est obtenu en exposant la membrane dans une cassette de phosphor-imager. Une quantification des bandes obtenues est ensuite effectuée par densitométrie.

4.8- Immunocytochimie.

Les cellules issues des cultures sont réparties dans des chambres sur des lames de verre Lab Tek (Nunc, Ref :177399B) préalablement enrobées de fibronectine ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; Roche Molecular Biochemicals; Ref :838 039). Pour les cardiocytes, la densité cellulaire est de $125\,000 \text{ cellules}/\text{cm}^2$. La moitié des lames est soumise à un traitement avec l'ara-C alors que l'autre moitié ne reçoit aucun traitement. Le traitement est supprimé après 72 heures et les cellules baignent dans le CSFM-2 pendant 24 heures. Puis, pour toutes les lames, les cellules sont mises à jeun pendant 24 heures, puis fixées soit dans un mélange acétone/méthanol (1 :1) à -20°C soit dans une solution 4% de paraformaldéhyde à température de la pièce. Pour les fibroblastes, l'étalement sur les lames intervient après un passage primaire et la densité cellulaire est de $15\,000 \text{ cellules}/\text{cm}^2$. La fixation est réalisée de la même manière que pour les cardiocytes. La perméabilisation des membranes est faite avec une solution de PBS et de Triton X-100 (0,2%). Une solution de PBS, 0,05% Triton X-100, 3% NGS et 3% BSA bloque les sites non-spécifiques. L'incubation des lames dans cette solution dure 30 minutes dans une chambre humide à température de la pièce. Les cellules sont ensuite incubées pendant 24 heures, à 4°C et dans une chambre humide, avec l'anticorps primaire. Une dilution 1 :100 est utilisée pour les anticorps α_8 , β_1 (130L), ANF; l'anticorps marquant la vinculine est utilisé à une dilution (1 :300). L'emploi de la phalloïdine marquée à la rhodamine (1 :3 000) (Sigma, Toronto, ON, Ref :P-1951) permet de réaliser le marquage de l'actine; l'actine sarcomérique des cardiocytes est marqué avec un anticorps de souris dilué 1 :3 000. La liaison de l'anticorps primaire est révélée par une incubation d'une heure, dans une chambre humide et à température de la pièce, avec un deuxième anticorps

anti-lapin (dilution 1 :1 000) ou anti-souris (dilution 1 :1 000) couplé à la rhodamine ou à la fluorescéine. L'immunofluorescence est observée avec un microscope Zeiss Axiovert 100M.

Chapitre III- Résultats.

❖ Identification des intégrines à motif RGD portées par les fibroblastes cardiaques et par les cardiocytes ventriculaires néonataux.

Nous avons tout d'abord identifié les intégrines présentes sur les fibroblastes cardiaques (adultes et nouveau-nés) et les cardiocytes ventriculaires de rats nouveau-nés par immunobuvardage.

A partir des cellules en culture, un lysat protéique est obtenu et 20 µg de protéines couplées à ^{125}I -échistatine sont chargées sur un gel de polyacrylamide 6%. Après migration, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de nitrocellulose et visualisées par autoradiographie (a). Le résultat de l'immunobuvardage est présenté en (b).

Les figures 1 et 2 montrent les intégrines trouvées respectivement sur les fibroblastes cardiaques (fig. 1) et les cardiocytes ventriculaires néonataux (fig. 2). En utilisant des anticorps spécifiques, nous avons pu déterminer plusieurs bandes correspondant à plusieurs complexes d'intégrines : en conséquence, chez les fibroblastes cardiaques néonataux, la première bande correspond à l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ (poids moléculaire de 220 kDa), la deuxième bande (210 kDa) est un mélange hétérogène des trois intégrines $\alpha_3/\alpha_5/\alpha_v\beta_1$ tandis que le complexe $\alpha_v\beta_3$ (troisième bande) a un poids moléculaire de 180 kDa.

En revanche, chez les cardiocytes ventriculaires néonataux, on ne trouve que deux complexes d'intégrines : un mélange hétérogène (bande à 210 kDa), constitué des deux intégrines $\alpha_3/\alpha_5\beta_1$ alors que la troisième bande à 180 kDa est reconnue comme étant le complexe $\alpha_v\beta_3$.

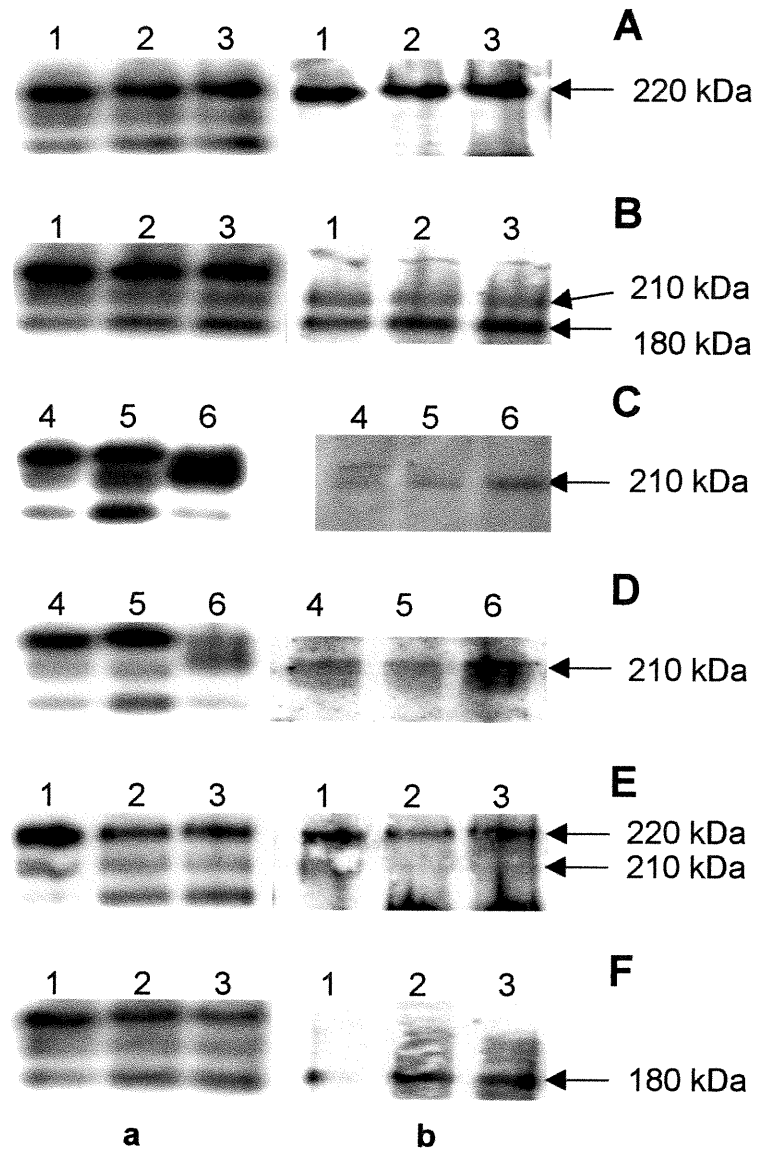


Figure 1: Identification des intégrines présentes sur les fibroblastes cardiaques néonataux par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques: anti α_8 (1:1000) (**A**), anti α_v (1:1000) (**B**), anti α_3 (1:500) (**C**), anti α_5 (1:500) (**D**), anti β_1 (1:1000) (**E**) et anti β_3 (1:1000) (**F**).

a: autoradiographie; b: immunobuvardage; 1 et 4: fibroblastes cardiaques adultes; 2 et 5: fibroblastes cardiaques néonataux à jeun; 3: fibroblastes cardiaques néonataux stimulés avec FBS; 6: cardiocytes ventriculaires néonataux.

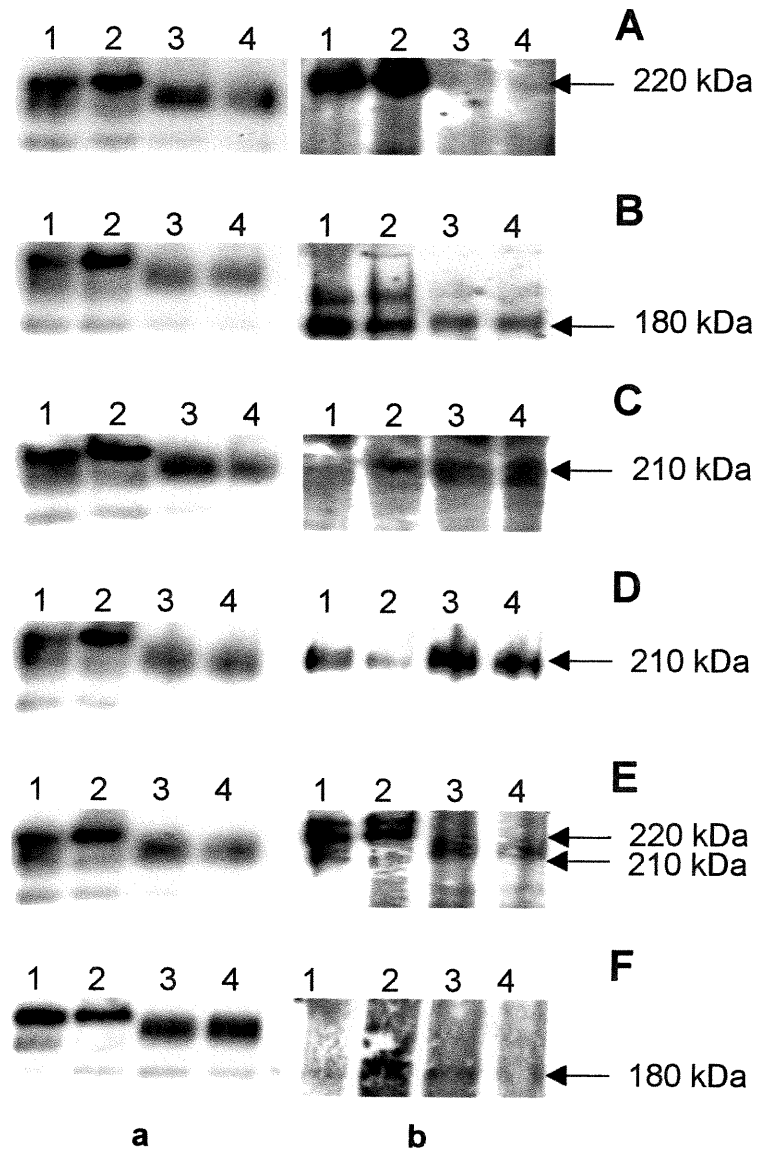


Figure 2: Identification des intégrines présentes sur les cardiocytes ventriculaires néonataux par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques: anti α_8 (1:1000) (A), anti α_v (1:1000) (B), anti α_3 (1:1000) (C), anti α_5 (1:1000) (D), anti β_1 (1:1000) (E) et anti β_3 (1:500) (F).

a: autoradiographie; b: immunobuvardage; 1: fibroblastes cardiaques adultes; 2: fibroblastes cardiaques néonataux; 3: cardiocytes ventriculaires néonataux à jeun; 4: cardiocytes ventriculaires néonataux stimulés avec FBS.

❖ Stimulations des fibroblastes par différents facteurs de croissance et quantification des différents complexes d'intégrines.

Nous avons ensuite stimulé ces cellules pendant 48 heures avec l'angiotensine II (All, 10^{-8} M), l'endothéline-1 (ET-1, 10^{-8} M). Les effets ont été observés sur la prolifération cellulaire en dosant la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée (deux $\mu\text{Ci}/\text{mL}$), sur le taux de synthèse protéique par incorporation de leucine tritiée (un $\mu\text{Ci}/\text{mL}$) et sur la quantité totale de protéines présentes, par dosage de Bradford. Le FBS est utilisé dans toutes les expériences comme contrôle positif.

L'angiotensine II (10^{-8} M) a un effet hyperplasique (fig. 3A) c'est-à-dire qu'il provoque une augmentation de la synthèse d'ADN, un effet hypertrophique (fig. 3B) c'est-à-dire qu'il stimule la synthèse protéique et augmente la quantité des protéines (fig. 3C) chez les fibroblastes néonataux. L'endothéline-1 (10^{-8} M), quant à elle, ne semble pas avoir d'effet significatif (fig. 3A, 3B et 3C) par rapport aux cellules contrôle, laissées à jeun.

Les cellules, après avoir été stimulées avec plusieurs facteurs de croissance pendant 48 heures, sont lysées. Les protéines sont incubées pendant 90 minutes avec de l'échistatine iodée puis un volume fixe (20 μL) de chaque puits est chargé sur un gel de polyacrylamide 6%. L'autoradiographie (fig. 4A) permet de visualiser les complexes intégrines/désintégrines. Les résultats sont ensuite quantifiés par phosphor-imager et normalisés selon la quantité de protéines dosée par méthode de Bradford (fig. 4B).

L'image d'autoradiographie (A) suggère que l'All et le FBS augmentent l'expression de chaque intégrine. L'ET-1 aurait plutôt tendance à diminuer cette expression par rapport aux cellules non stimulées. En quantifiant les bandes de radioactivité obtenues et en normalisant les résultats, tous les complexes voient leur expression modifiée à la hausse en présence d'All (10^{-8} M). L'ET-1, quant à elle, ne semble pas affecter l'expression de ces intégrines.

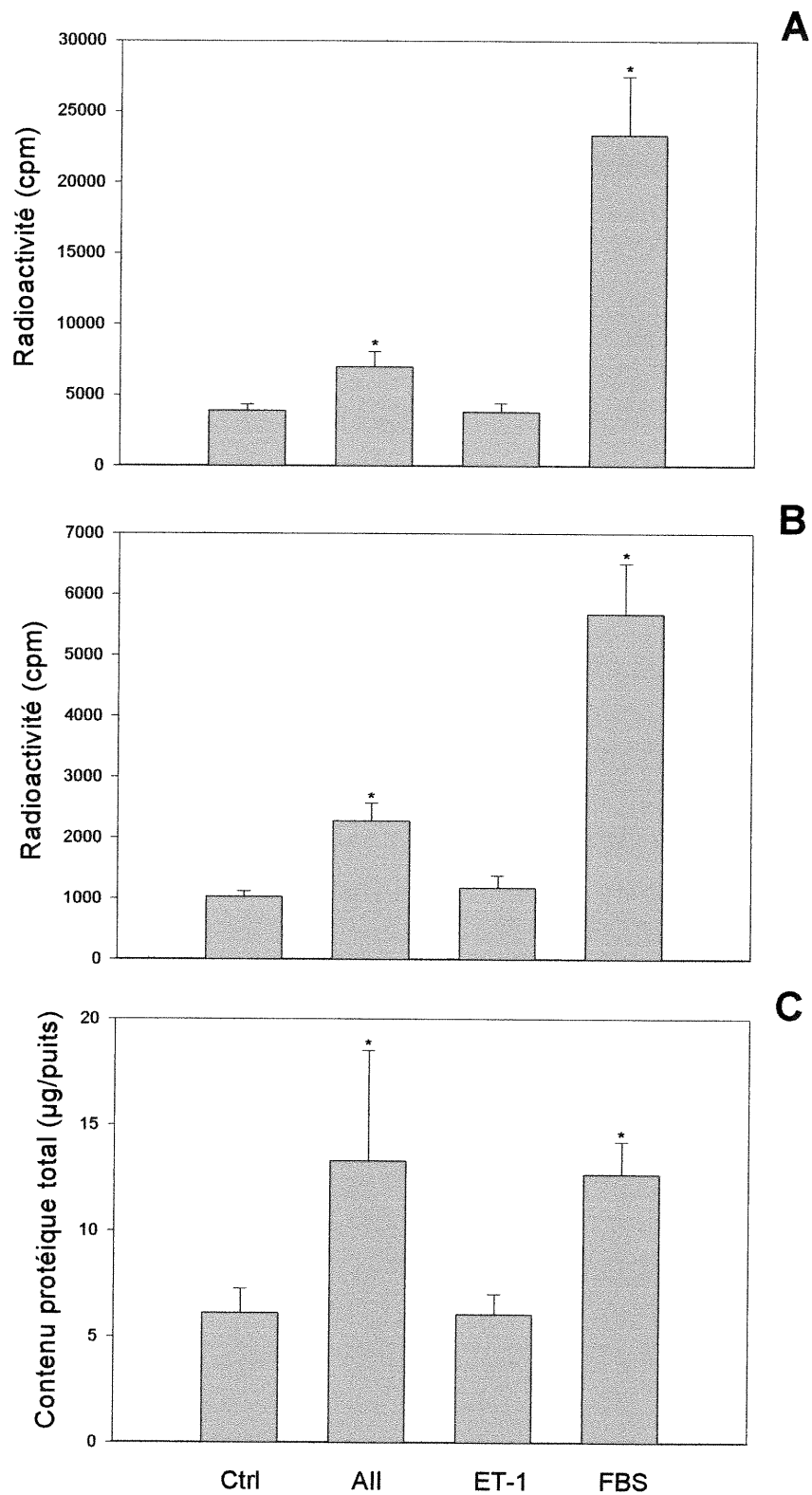


Figure 3: Stimulations des fibroblastes cardiaques néonataux par différents facteurs de croissance et effets sur l'incorporation de thymidine tritiée (A), de leucine tritiée (B) et sur le contenu protéique total (C).

Moyennes \pm E.T. * Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,05). (N=6)

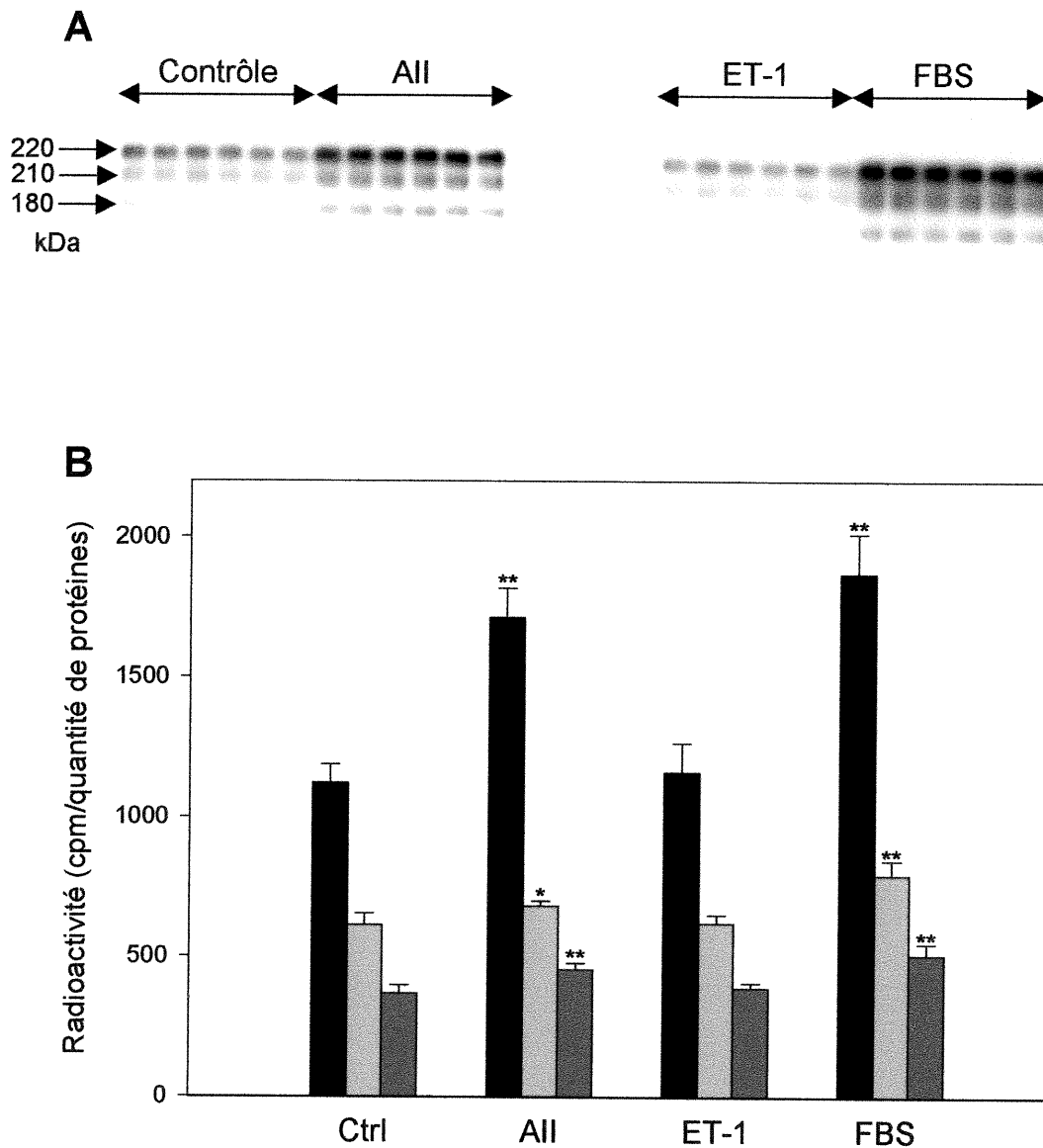


Figure 4: Profil des intégrines présentes sur les fibroblastes cardiaques néonataux après quantification au phosphor-imager et normalisation par rapport à la quantité de protéines dosée par Bradford. **A=** autoradiographie réalisée à partir du gel d'électrophorèse; **B=** quantification.

Complexé $\alpha_8\beta_1$: bandes noires; Complexé $\alpha_{3/5/\nu}\beta_1$: bandes gris clair; Complexé $\alpha_\nu\beta_3$: bandes gris foncé. (N=6)

* Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,05).

** Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,01).

Il y a une augmentation au niveau de tous les complexes pour les stimulations avec le FBS ce qui confirme que cet agent est bien un contrôle positif.

❖ Stimulations des cardiocytes par différents facteurs de croissance et quantification des différents complexes d'intégrines.

Les cellules ont été stimulées avec l'angiotensine II (All, 10^{-8} M) l'endothéline-1 (ET-1, 10^{-8} M). Les effets ont été observés sur la prolifération cellulaire en mesurant la synthèse d'ADN par incorporation de thymidine tritiée (deux $\mu\text{Ci/mL}$), sur le taux de synthèse protéique par incorporation de leucine tritiée (un $\mu\text{Ci/mL}$) et sur le contenu protéique total en dosant les protéines par la méthode de Bradford. Cette expérience a été réalisée une fois.

Sur les cardiocytes ventriculaires néonataux non traités, l'All exerce également un effet hyperplasique (fig. 5A), hypertrophique (fig. 5B) et augmente la quantité totale de protéines (fig. 5C). Bien qu'elle n'engendre aucun effet hyperplasique (fig. 5A), l'ET-1 montre un effet hypertrophique (fig. 5B) et augmente la quantité des protéines (fig. 5C).

Vue la réponse élevée obtenue en stimulant par le FBS (fig. 5), nous avons décidé de traiter les cardiocytes avec un agent anti-prolifératif des fibroblastes, le 1- β -D cytosine arabinofuranoside ou Ara-C. La préparation des cellules cardiaques néonatales implique une séparation des fibroblastes et des cardiocytes réalisée par deux pré étalements. En théorie, cette méthode permet d'obtenir des cultures quasiment pures de cardiocytes; cependant, en pratique, il y a une possibilité de contamination des cardiocytes par les fibroblastes car ces derniers n'ont pas tous adhéré à la surface du Pétri pendant les deux pré étalements. L'ara-C va empêcher la prolifération des fibroblastes pendant la durée du traitement (72 heures), en s'incorporant dans l'ADN et en bloquant le mécanisme de réplication (Gmeiner et al., 1998;

Kawagushi et al., 1999). Cependant, dès l'arrêt du traitement, les fibroblastes peuvent à nouveau proliférer.

Dans le cas d'un traitement avec l'ara-C (un mg/ml), l'ET-1 (10^{-8} M) exerce un effet hyperplasique (fig. 6A), hypertrophique (fig. 6B) sur les cardiocytes néonataux et augmente la quantité totale de protéines (fig. 6C). L'All (10^{-8} M), quant à elle, n'exerce plus aucun effet significatif sur ces cellules (fig. 6A, 6B, 6C). Les mêmes résultats ont été reproduits trois fois.

Comme précédemment avec les fibroblastes, nous avons quantifié l'expression de chaque complexe d'intégrine présent sur les cardiocytes néonataux non traités à l'ara-C. Les résultats sont présentés en figure 7.

L'autoradiographie (A) semble montrer que seuls l'All et le FBS augmentent l'expression de toutes les intégrines présentes sur les cardiocytes non traités. Quand nous quantifions les bandes de radioactivité et que nous normalisons les résultats obtenus par rapport à la quantité de protéine totale (B), nous pouvons voir que l'expression des intégrines $\alpha_8\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ est augmentée par tous les facteurs de croissance testés. En ce qui concerne le complexe $\alpha_3\beta_1$, il ne semble y avoir aucun effet des facteurs et le FBS semble même diminuer l'expression de cette intégrine par rapport au contrôle.

Pour ce qui est des cardiocytes traités avec l'ara-C, les résultats sont présentés à la figure 8. L'autoradiographie (A) suggère que les cardiocytes traités par l'ara-C perdent la première bande de radioactivité qui correspond à l' $\alpha_8\beta_1$ (voir poids moléculaires caractérisant les bandes obtenues). Nous pouvons également voir que les bandes sont nettement moins bien séparées par rapport aux fibroblastes voire même aux cardiocytes non traités. Aucune explication ne peut être fournie pour expliquer ce phénomène. Néanmoins, on peut écarter une erreur de manipulation ou de migration car les mêmes observations ont été faites sur trois expériences différentes. Seul le FBS semble avoir un effet sur l'expression des intégrines. Après quantification et normalisation (B), seule l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est augmentée après stimulation des cellules avec les facteurs de croissance testés.

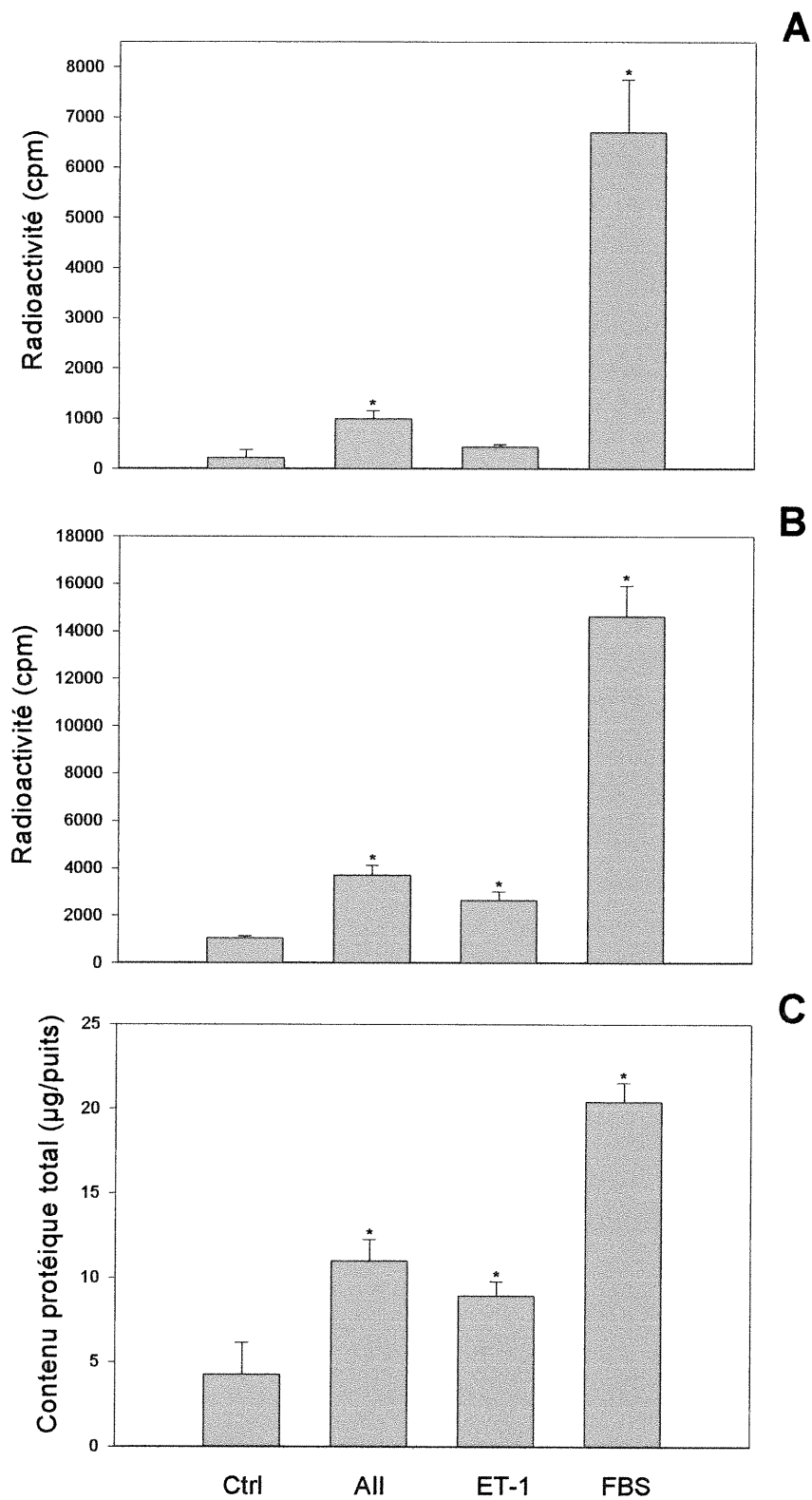


Figure 5: Stimulations des cardiocytes ventriculaires néonataux par différents facteurs de croissance et effets sur l'incorporation de thymidine tritiée (A), de leucine tritiée (B) et sur le contenu protéique total (C).

Moyennes \pm E.T. * Effets significatifs par rapport au contrôle ($P < 0,05$). (N=6)

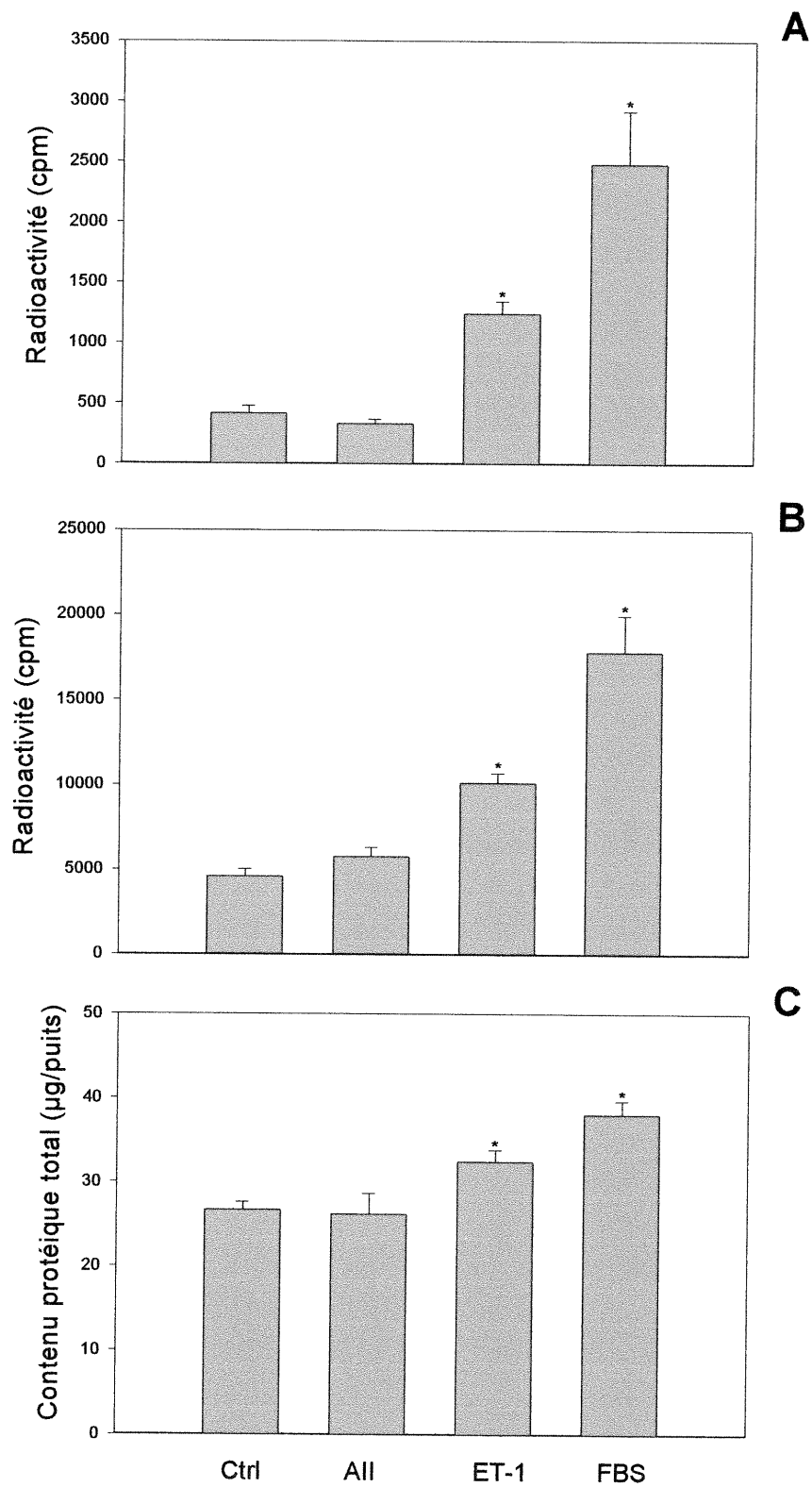


Figure 6: Stimulations des cardiocytes ventriculaires néonataux traités par l'ara-C avec différents facteurs de croissance et effets sur l'incorporation de thymidine tritiée (**A**), de leucine tritiée (**B**) et sur le contenu protéique total (**C**). Moyennes \pm E.T. * Effets significatifs par rapport au contrôle ($P < 0,05$). (N=6)

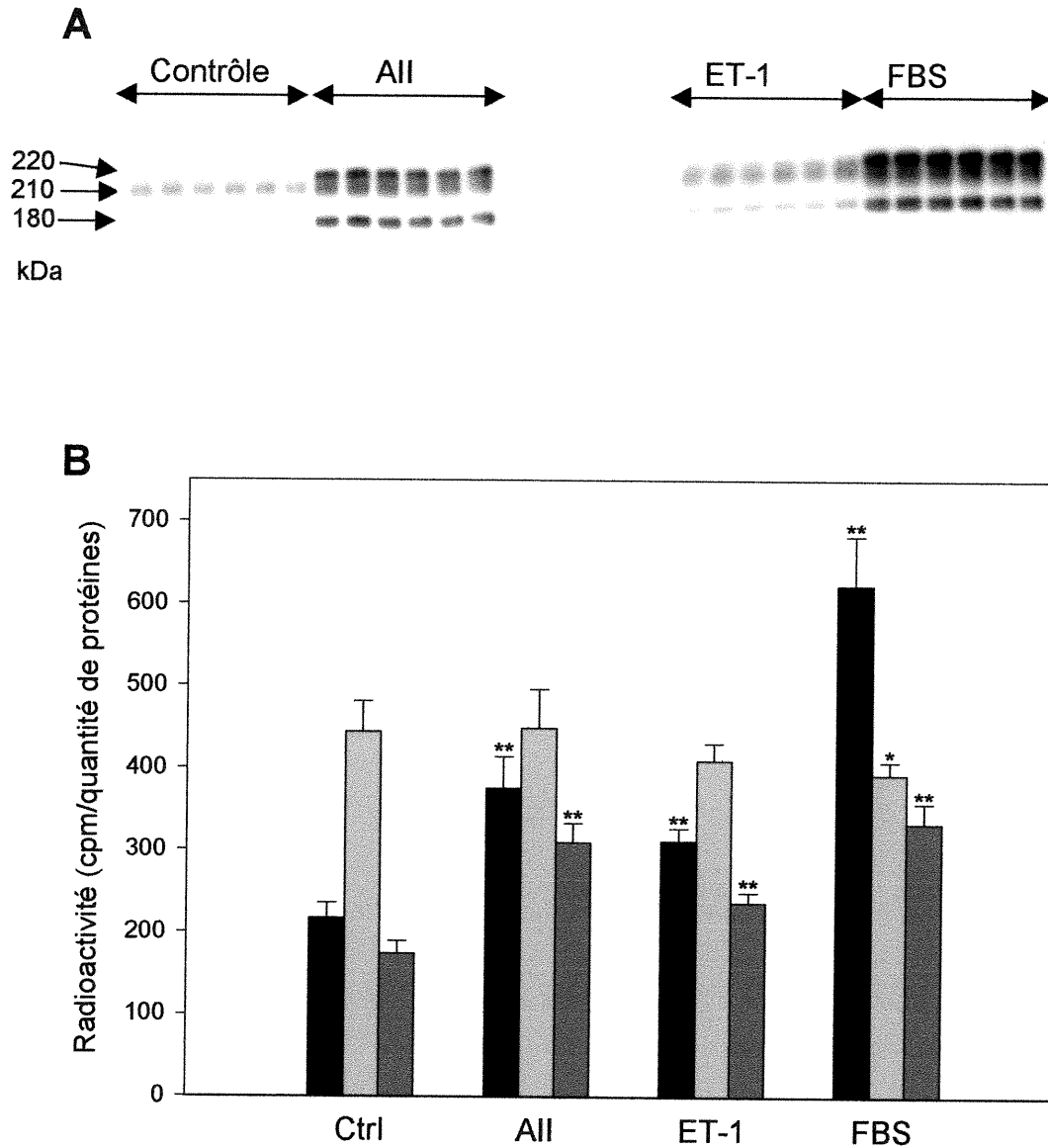


Figure 7 : Profil des intégrines présentes sur les cardiocytes ventriculaires néonataux non traités par l'ara-C. La quantification des bandes du gel d'électrophorèse est faite au phosphor-imager et la normalisation se fait par rapport à la quantité de protéines dosée par Bradford. **A=** autoradiographie réalisée à partir du gel d'électrophorèse; **B=** quantification.

Complexe $\alpha_8\beta_1$: bandes noires; Complexe $\alpha_{3/5}\nu\beta_1$: bandes gris clair; Complexe $\alpha\nu\beta_3$: bandes gris foncé. (N=6)

* Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,05).

** Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,01).

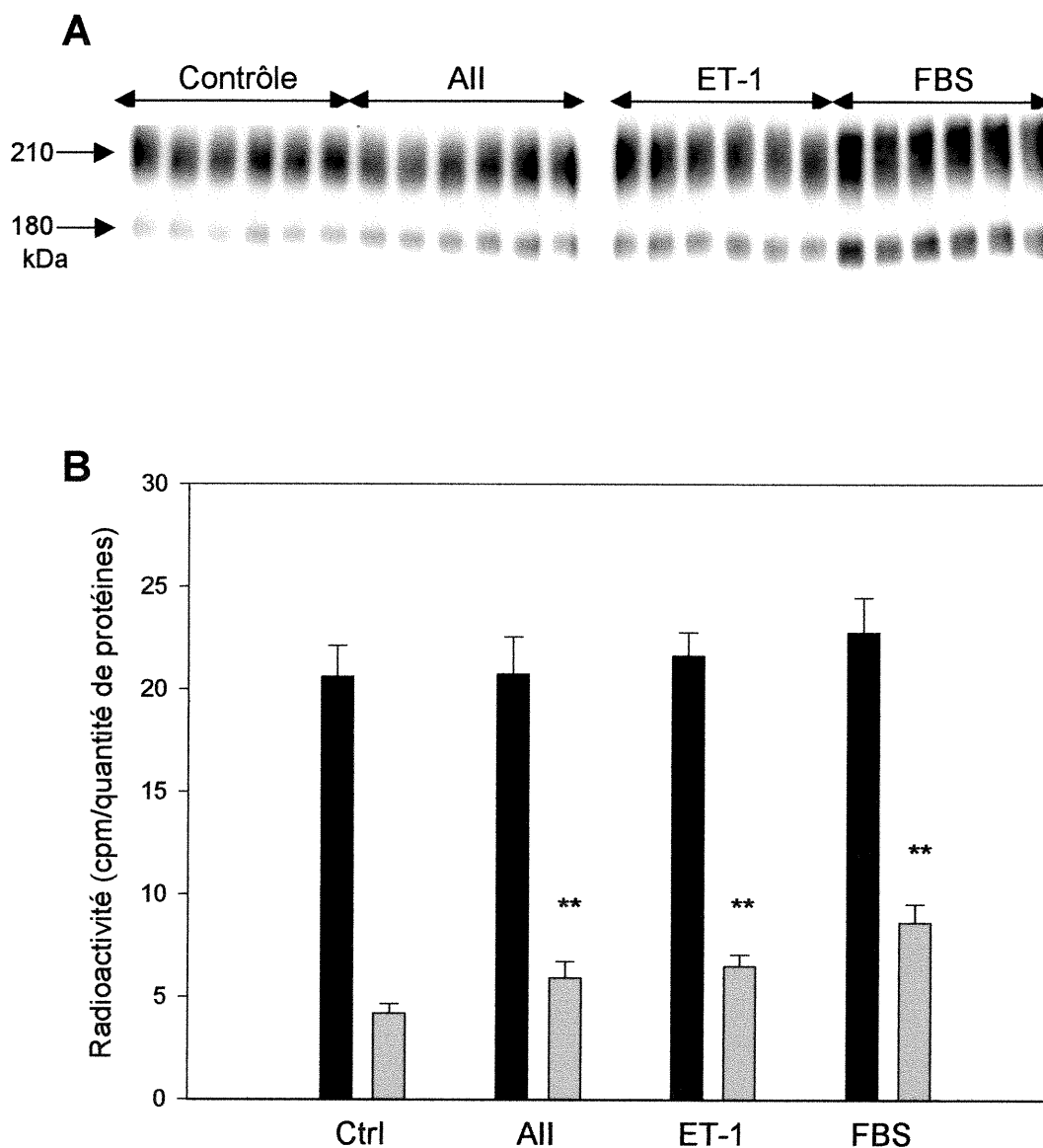


Figure 8 : Profil des intégrines présentes sur les cardiocytes ventriculaires néonataux traités par l'ara-C. La quantification des bandes du gel d'électrophorèse est faite au phosphor-imager et la normalisation se fait par rapport à la quantité de protéines dosée par Bradford. **A**= autoradiographie réalisée à partir du gel d'électrophorèse; **B**= quantification.

Complexe $\alpha_3/5\beta_1$: bandes noires; Complexe $\alpha_V\beta_3$: bandes gris clair. (N=6)

** Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,01)

❖ Courbes dose-réponse de l'angiotensine II (10^{-11} à 10^{-7} M) chez les fibroblastes cardiaques néonataux.

Nous avons ensuite stimulé les fibroblastes néonataux avec différentes concentrations d'angiotensine II (de 10^{-11} M à 10^{-7} M) et nous avons regardé les effets hyperplasique, hypertrophique et une augmentation éventuelle de la quantité totale de protéines. Les mêmes résultats ont été reproduits cinq fois.

L'hyperplasie des fibroblastes est visible pour de faibles concentrations d'All (10^{-11} M) alors qu'il y a une inhibition de la synthèse d'ADN pour les plus fortes concentrations (10^{-8} et 10^{-7} M) (fig. 9A). La figure 9B montre que l'All exerce un effet hypertrophique sur les fibroblastes pour toutes les concentrations supérieures à 10^{-11} M. La quantité des protéines augmente légèrement suite aux stimulations avec l'All (fig. 9C); mais aucun effet significatif n'est observé.

Nous avons ensuite quantifié l'expression de chaque intégrine par phosphor-imager et normalisé par rapport à la quantité de protéines dosée par Bradford. En regardant l'autoradiographie (fig. 10A), il semblerait que seul le complexe $\alpha_v\beta_3$ voit son expression augmenter suite à une stimulation de 10^{-8} et 10^{-7} M d'All. Après quantification et normalisation des résultats, l'All semble exercer un effet biphasique sur l'expression des intégrines des fibroblastes. En effet, le maximum d'expression est obtenu pour une concentration de 10^{-9} M (effet significatif pour tous les complexes). Pour les intégrines $\alpha_8\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$, l'augmentation d'expression est encore significative pour les concentrations de 10^{-8} et 10^{-7} M d'All.

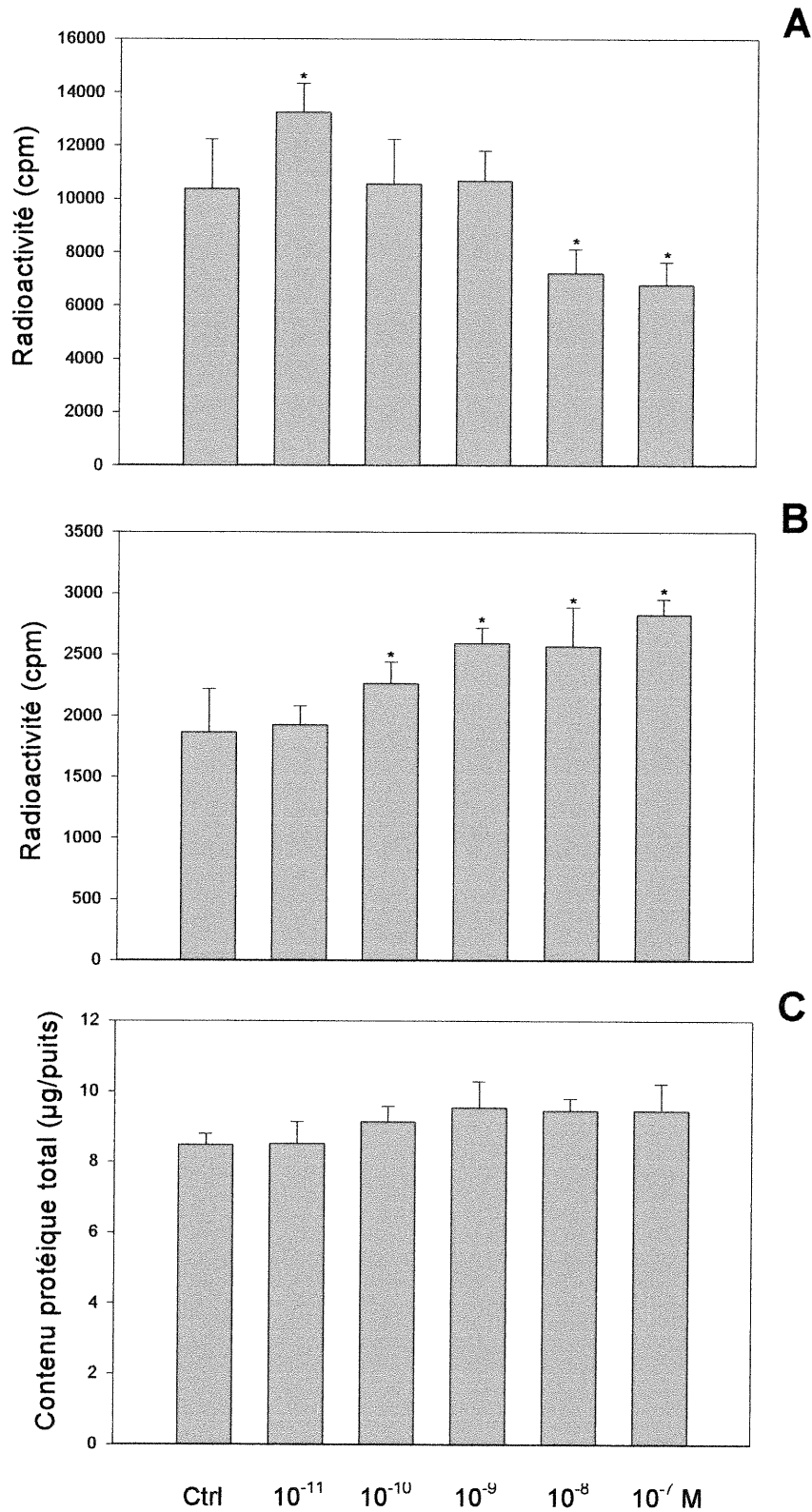


Figure 9: Courbe dose-réponse d'angiotensine II et effets sur l'incorporation de thymidine tritiée (**A**), de leucine tritiée (**B**) et sur le contenu protéique total (**C**) chez les fibroblastes cardiaques néonataux.

Moyennes \pm E.T. * Effets significatifs par rapport au contrôle ($P < 0,05$). (N=4)

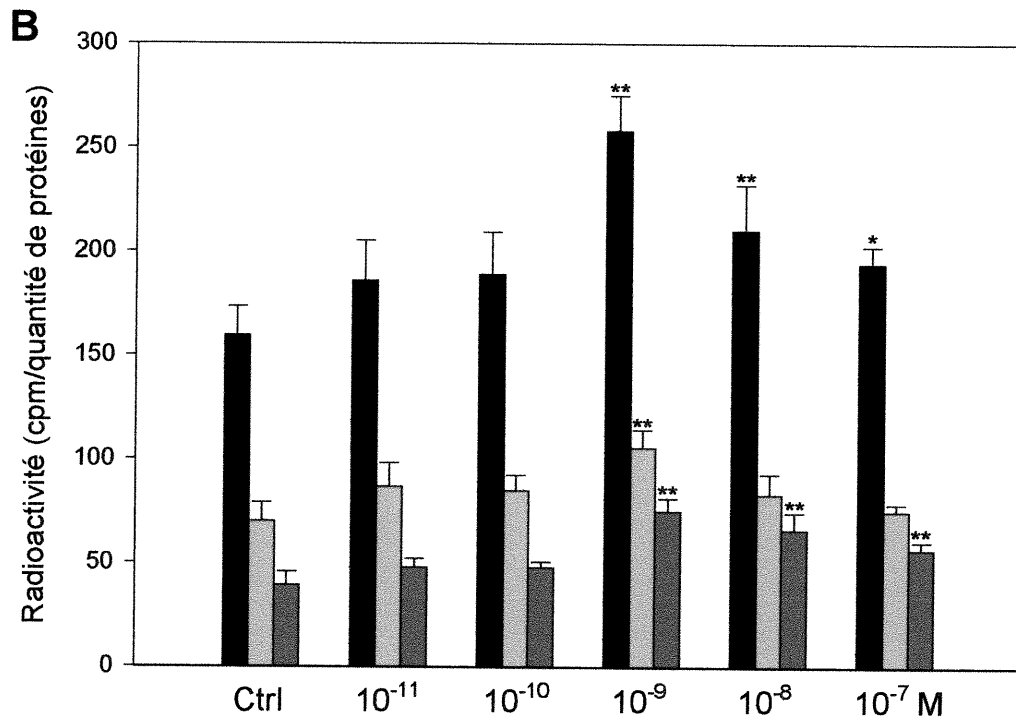
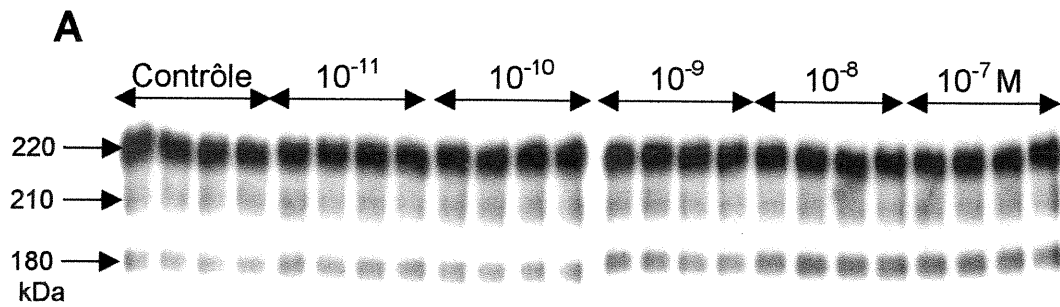


Figure 10 : Profil des intégrines présentes sur les fibroblastes cardiaques néonataux stimulés par différentes concentrations d'angiotensine II. La quantification des bandes du gel d'électrophorèse est faite au phosphorimager et la normalisation se fait par rapport à la quantité de protéines dosée par Bradford. **A**= autoradiographie réalisée à partir du gel d'électrophorèse; **B**= quantification.

Complexe $\alpha_8\beta_1$: bandes noires; Complexe $\alpha_{3/5}\nu\beta_1$: bandes gris clair; Complexe $\alpha_\nu\beta_3$: bandes gris foncé. (N=4)

* Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,05).

** Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,01).

❖ Courbes dose-réponse de l'endothéline-1 (10^{-11} à 10^{-7} M) chez les cardiocytes ventriculaires néonataux traités avec l'ara-C.

Les cardiocytes néonataux traités avec l'ara-C sont stimulés avec des concentrations croissantes d'endothéline-1 (de 10^{-11} à 10^{-7} M) et les effets obtenus concernent l'hyperplasie, l'hypertrophie et le contenu protéique total. Les mêmes résultats ont été reproduits quatre fois.

L'ET-1 exerce un effet hyperplasique (fig. 11A) et hypertrophique (fig. 11B) dès les plus faibles concentrations (10^{-10} M), avec un maximum atteint pour une concentration de 10^{-9} M, puis une stagnation de cet effet pour les plus fortes concentrations (fig. 11A et B). Néanmoins, la concentration la plus faible de 10^{-11} M ne semble pas exercer d'effet significatif hyperplasique (fig. 11A) ou hypertrophique (fig. 11B) par rapport aux cellules contrôle. La quantité de protéines (fig. 11C) augmente de manière linéaire à partir des concentrations 10^{-10} à 10^{-8} M d'ET-1, la concentration la plus faible (10^{-11} M) montrant une légère augmentation non significative de la quantité des protéines. Il semblerait y avoir une diminution de la quantité des protéines pour la concentration la plus forte d'ET-1 (fig. 11C).

Nous avons ensuite quantifié l'expression de chaque intégrine par phosphor-imager et normalisé par rapport à la quantité de protéines dosée par Bradford. En regardant l'autoradiographie (fig. 12A), il semblerait que l'endothéline-1, quelque soit sa concentration, ait un effet sur l'expression des intégrines. Après quantification et normalisation par rapport à la quantité de protéines (fig. 12B), les deux intégrines subiraient une augmentation de leur expression par ET-1 des plus basses aux plus fortes concentrations.

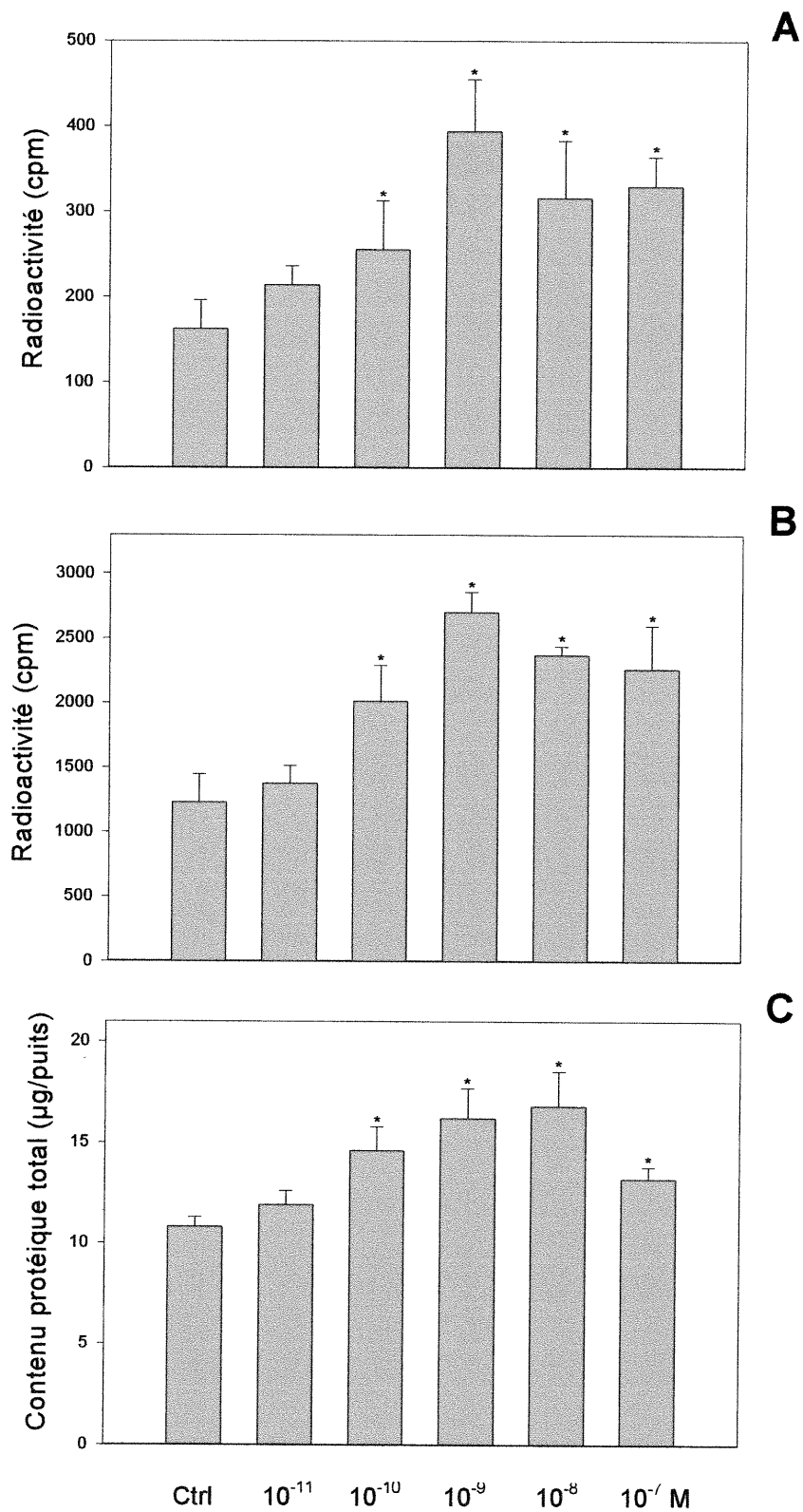


Figure 11: Courbe dose-réponse d'endothéline-1 et effets sur l'incorporation de thymidine tritiée (**A**), de leucine tritiée (**B**) et sur le contenu protéique total (**C**) chez les cardiocytes ventriculaires néonataux traités par l'ara-C.

Moyennes \pm E.T. * Effets significatifs par rapport au contrôle ($P < 0,05$). (N=4)

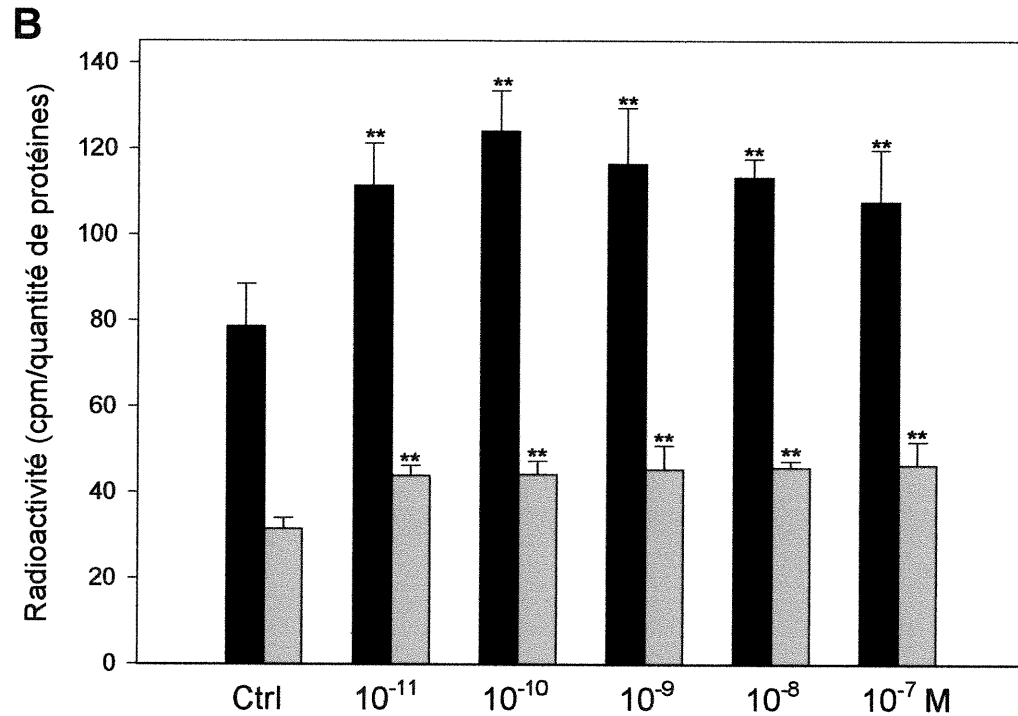
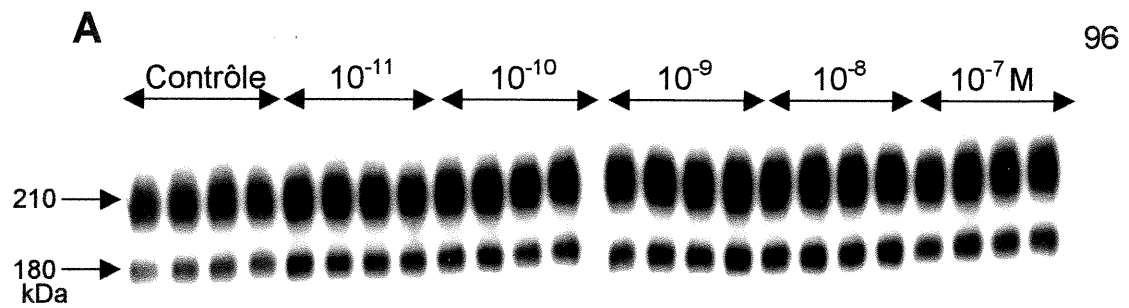


Figure 12 : Profil des intégrines présentes sur les cardiocytes ventriculaires néonataux, traités par l'ara-C, stimulés par différentes concentrations d'endothéline-1. La quantification des bandes du gel d'électrophorèse est faite au phosphor-imager et la normalisation se fait par rapport à la quantité de protéines dosée par Bradford. **A**= autoradiographie réalisée à partir du gel d'électrophorèse; **B**= quantification.

Complexe $\alpha_3/5\beta_1$: bandes noires; Complexe $\alpha_v\beta_3$: bandes gris clair. (N=4)

** Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,01).

❖ Stimulations des fibroblastes cardiaques avec l'angiotensine II et un bloqueur du récepteur AT₂, le PD123319.

Comme le montre la figure 3A, une concentration de 10⁻⁸ M d'All exerce un effet hyperplasique chez les fibroblastes néonataux cardiaques. Cependant, la figure 9A montre que, pour cette même concentration d'angiotensine II, il y a une inhibition de la synthèse d'ADN.

Les fibroblastes cardiaques et cardiocytes ventriculaires néonataux possèdent tous deux des récepteurs AT₁ et AT₂ et le nombre des récepteurs AT₂ décroît ensuite de telle sorte que les cellules cardiaques adultes ne possèdent plus que des récepteurs AT₁ (van Kesteren et al., 1997). Cependant, le récepteur AT₂ semble être impliqué dans des effets anti-prolifératifs (van Kesteren et al., 1997; Nouet et al., 2000; de Gasparo et al., 1999) et, dans certaines conditions, il va engendrer une inhibition de la synthèse d'ADN chez les fibroblastes cardiaques. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que le récepteur AT₂ est lié à une protéine G inhibitrice. L'activation de ce récepteur va alors provoquer des effets anti-prolifératifs (van Kesteren et al., 1997).

Nous avons alors décidé de stimuler les fibroblastes cardiaques avec de l'angiotensine II et le bloqueur des récepteurs AT₂ appelé PD123319. Cette expérience a été réalisée une fois.

Les cellules sont traitées avec de l'angiotensine II seule (10⁻⁸ M) (barres noires- fig. 13) ou avec de l'angiotensine II (10⁻⁸ M) en présence de PD123319 (10⁻⁵ M) (barres grises- fig 13).

La figure 13A montre qu'il y a une inhibition de la synthèse d'ADN pour une concentration d'All de 10⁻⁸ M et que l'inhibition est conservée quand on ajoute le PD123319. La synthèse des protéines (fig. 13B), comme la quantité totale des protéines (fig. 13C) sont stimulées par l'All avec ou sans PD123319.

Cependant, les résultats de cette expérience ne permettent pas de conclure que les différences trouvées entre les figures 3 et 9 viennent de la présence des récepteurs AT₁ et/ou AT₂.

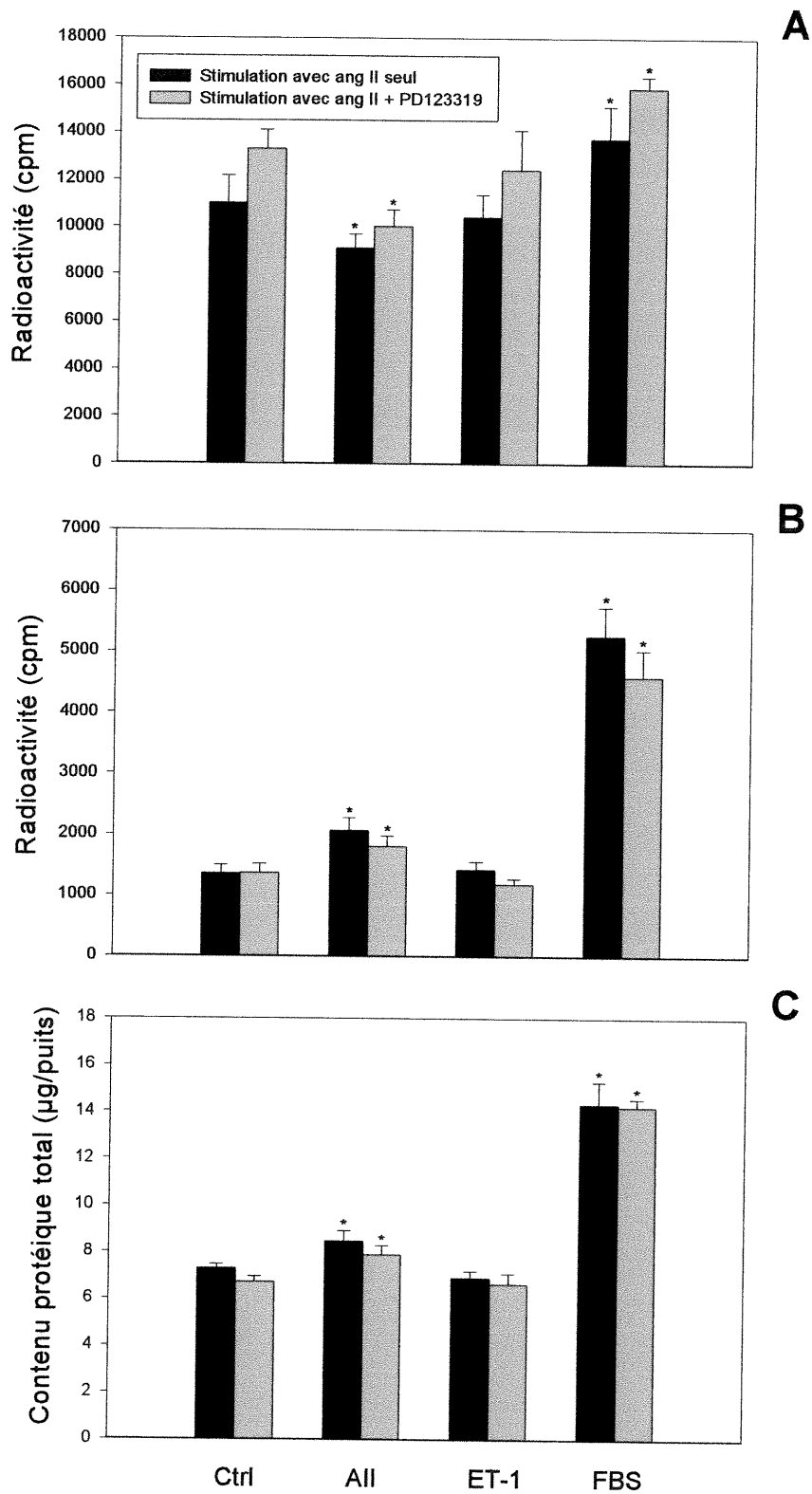


Figure 13: Effets des facteurs de croissance sur l'incorporation de thymidine tritiée (**A**), de leucine tritiée (**B**) et sur le contenu protéique total (**C**) chez les fibroblastes cardiaques néonataux. Moyennes \pm E.T. * Effets significatifs par rapport au contrôle ($P < 0,05$). (N=6)

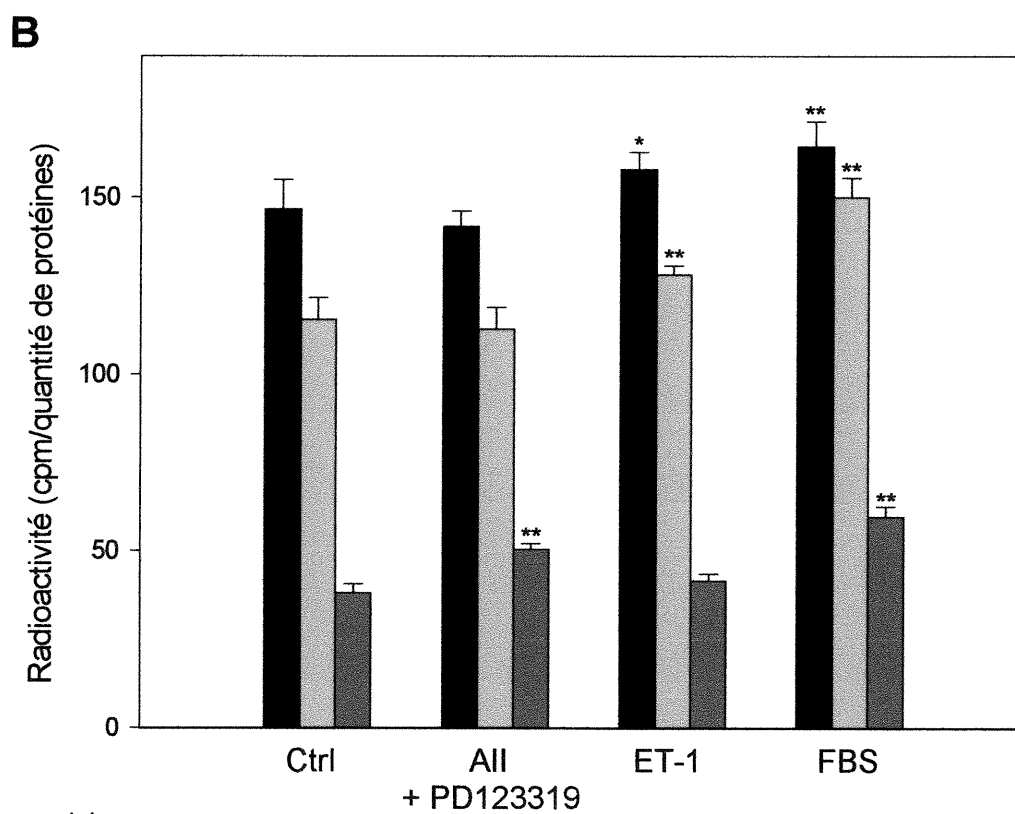
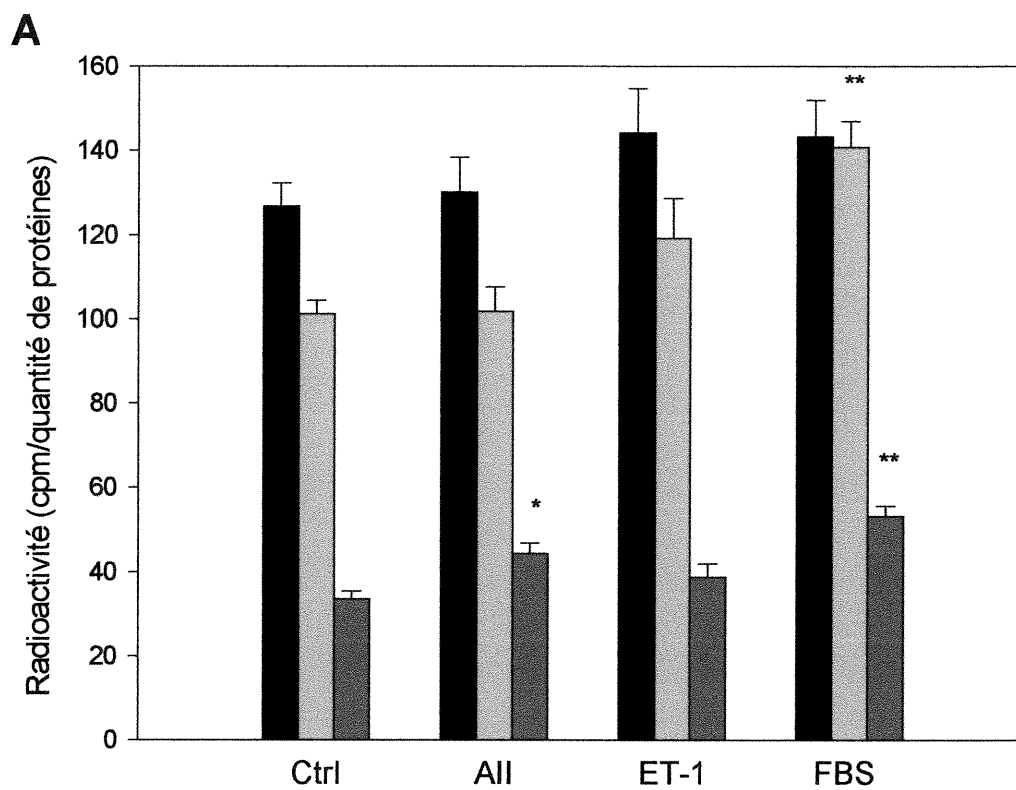


Figure 14.

Figure 14 : Profil des intégrines présentes sur les fibroblastes cardiaques néonataux. Ces cellules ont été préalablement stimulées avec l'angiotensine II (10^{-8} M) seule (fig. **A**) ou de l'angiotensine II couplée à un antagoniste des récepteurs AT₂, le PD123319 (10^{-5} M) (fig. **B**). La quantification des bandes du gel d'électrophorèse est faite au phosphor-imager et la normalisation se fait par rapport à la quantité de protéines dosée par Bradford. Complexe $\alpha_8\beta_1$: bandes noires; Complexe $\alpha_{3/5}/\beta_1$: bandes gris clair; Complexe $\alpha_v\beta_3$: bandes gris foncé. (N=6)

* Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,05).

** Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,01).

L'autoradiographie n'est pas représentée ici car elle est identique à celle montrée en figure 4A. La figure 14 montre les résultats obtenus après quantification des bandes de radioactivité au phosphor-imager et normalisation par rapport à la quantité de protéines. Les intégrines $\alpha_8\beta_1$ et $\alpha_3/5/\nu\beta_1$ ont une augmentation de leur expression suite aux stimulations par l'ET-1 et le FBS. L'AII n'exerce plus un effet significatif que sur l'expression de l'intégrine $\alpha_\nu\beta_3$.

❖ Dosage de la fibronectine présente dans le milieu de culture des fibroblastes cardiaques néonataux.

Les fibroblastes sont stimulés pendant 48 heures avec les facteurs de croissance (AII et ET-1; 10^{-8} M) et avec des concentrations croissantes d'angiotensine II (de 10^{-11} à 10^{-7} M). Ils vont alors reconstituer leur matrice extracellulaire. Par conséquent, les cellules rejettent dans le milieu de culture de la fibronectine que nous avons dosé par méthode Elisa.

Il y a une augmentation de la quantité de fibronectine sécrétée quand les cellules sont stimulées avec l'AII à une concentration de 10^{-8} M (fig. 15A). L'endothéline-1 n'induit aucune augmentation de la quantité de fibronectine dosée. Quand on réalise une courbe dose-réponse avec l'angiotensine II (fig. 15B), on remarque que, pour les concentrations les plus faibles d'angiotensine II (de 10^{-11} à 10^{-9} M), on a une augmentation croissante, voire linéaire de la quantité de fibronectine. Pour les plus fortes concentrations, à 10^{-8} et 10^{-7} M, la quantité de fibronectine est maximale.

Le dosage de la fibronectine pour les cellules stimulées avec AII, ET-1 et FBS a été fait une fois. Les mêmes résultats ont été reproduits cinq fois pour le dosage de la fibronectine avec les cellules stimulées par des concentrations croissantes d'AII.

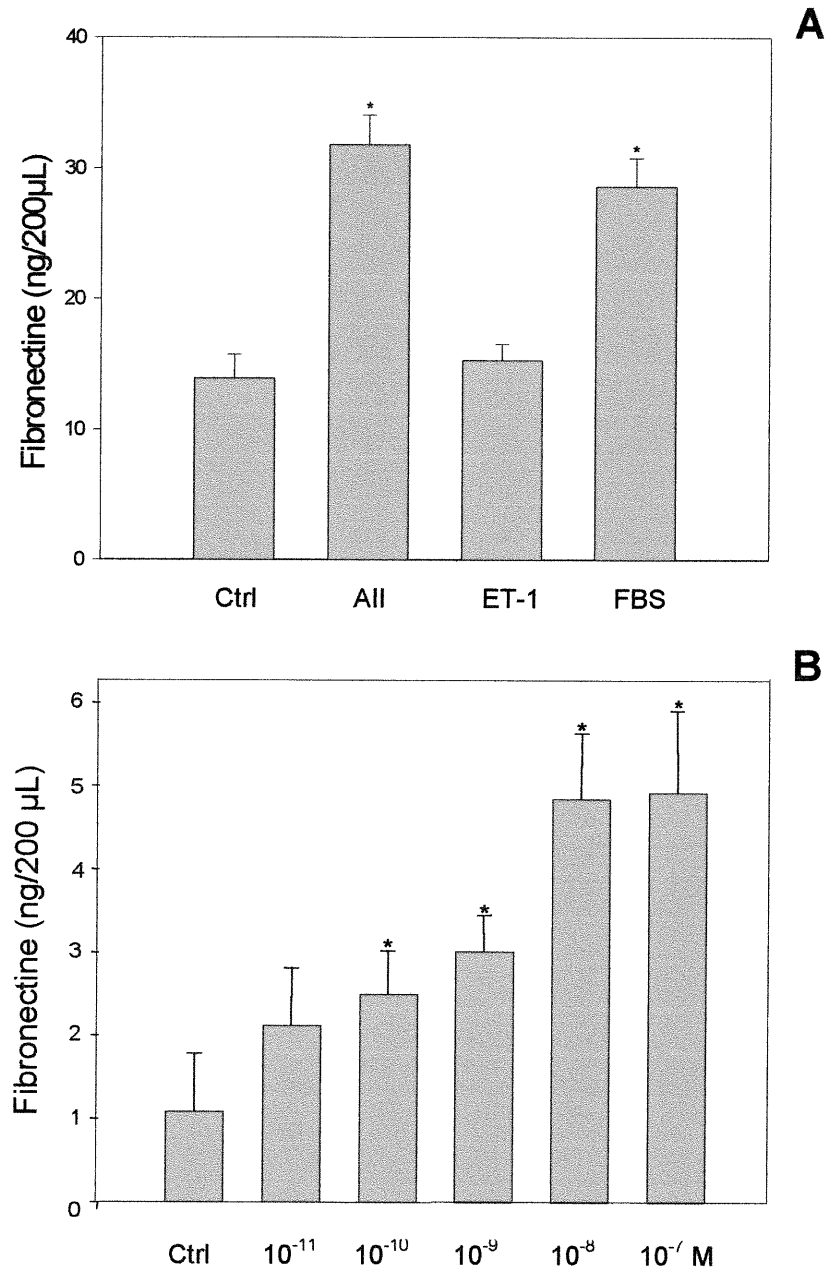


Figure 15: Dosage de la fibronectine par méthode ELISA après stimulations des fibroblastes cardiaques néonataux par différents facteurs de croissance (**A**), (N=6) et par une courbe dose-réponse d'angiotensine II (**B**), (N=4). Moyennes \pm E.T. * Effets significatifs par rapport au contrôle (P<0,05).

❖ Dosage de l'ANF présent dans le milieu de culture des cardiocytes ventriculaires néonataux.

Comme les fibroblastes, les cardiocytes ventriculaires néonataux sont stimulés par les facteurs de croissance pendant 48 heures. Dans le cœur adulte, l'ANF est présent uniquement au niveau des oreillettes alors que chez le nouveau-né, pendant la période pré natale, l'expression de l'ANF est majoritaire dans les ventricules (Brenner et al., 1990). Nous avons voulu doser l'ANF excrété par les cardiocytes dans le milieu de culture pour voir si cette hypothèse se confirmait. La méthode utilisée est un dosage radio-immunologique.

Chez des cardiocytes ventriculaires non traités avec l'ara-C, la quantité d'ANF dosée est augmentée, par rapport aux cellules contrôle, quel que soit le facteur de croissance utilisé (fig. 16A). Cette expérience a été réalisée une fois.

Par contre, chez des cardiocytes traités avec l'ara-C, seul l'ET-1 augmente significativement la quantité d'ANF (fig. 16B). Les mêmes résultats ont été reproduits trois fois.

Pour des cardiocytes traités à l'ara-C et stimulés avec des concentrations croissantes d'endothéline-1 (fig. 16C), la quantité d'ANF augmente dès les stimulations les plus basses (10^{-10} M). Le maximum d'ANF est obtenu pour la concentration de 10^{-9} M. Il est à noter que les quantités d'ANF plafonnent même si les concentrations d'ET-1 augmentent (pour 10^{-8} et 10^{-7} M). Les mêmes résultats ont été reproduits quatre fois.

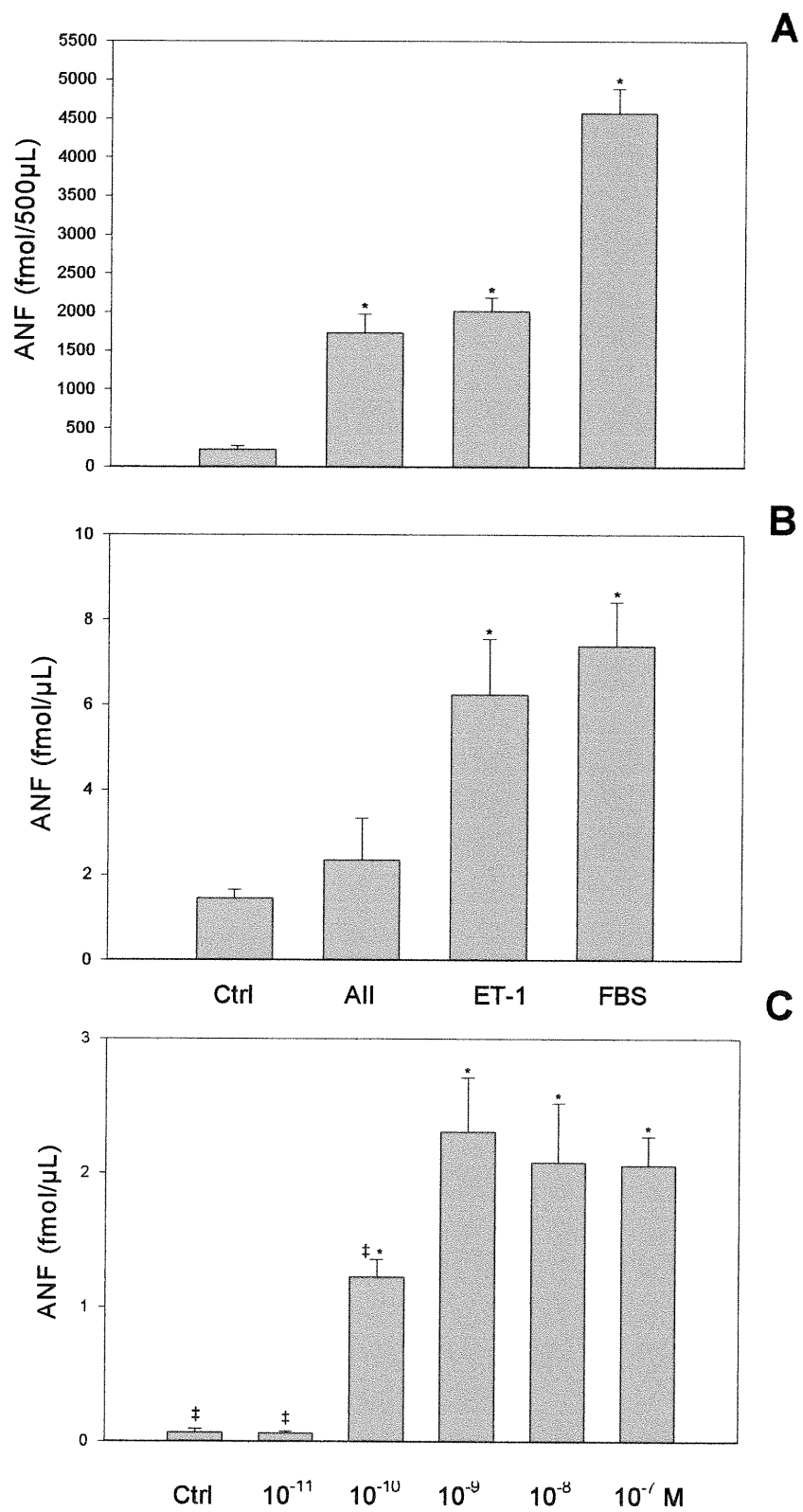


Figure 16.

Figure 16: Dosage de la quantité d'ANF par dosage radioimmunologique chez des cardiocytes néonataux non traités (**A**), (N=6) et traités par l'ara-C (**B**), (N=6) après stimulations par différents facteurs de croissance. Dosage de la quantité d'ANF chez les cardiocytes traités après stimulations par des concentrations croissantes d'endothéline-1 (**C**), (N=4).

Moyennes \pm E.T.

* Effets significatifs par rapport au contrôle ($P < 0,05$).

‡ Effets significatifs par rapport à la concentration d'endothéline-1 de 10^{-9} M ($P < 0,05$).

❖ Immunocytochimie : localisation les différentes intégrines.

Après digestion des tissus, les cellules sont ensemencées sur des lames de verre Nunc, traitées (le cas échéant), fixées dans une solution de paraformaldéhyde 4%. Une double immunocytochimie a ensuite été réalisée avec les anticorps anti α_8 (1 :100), anti β_1 (1 :100) et anti ANF (1 :100). Les foyers d'adhésion sont visualisés par l'anticorps anti-vinculine (1 :300) car cette protéine est une des composantes majeures des zones de contacts focaux.

Les résultats obtenus, pour les fibroblastes cardiaques néonataux, montrent que les intégrines α_8 et β_1 ont une localisation diffuse dans la cellule (fig. 17A-17D) néonatale. La phalloïdine marque tous les filaments d'actine sans distinction (fig. 17 et 18B, 17 et 18D) et la vinculine se localise aux mêmes endroits que les zones d'adhésion focales, à l'extrémité des cellules (fig. 18A-18D). Les figures 18 montrent bien que les adhésions focales sont des zones de contact entre deux cellules, des sites d'ancrage de la surface de la cellule sur un substrat.

Pour les cardiocytes ventriculaires, l'immunocytochimie a permis de montrer qu'il existait bien une contamination des cardiocytes par les fibroblastes.

Les figures 19A et B montrent ce que nous avons obtenu avec des cellules sans traitement. Le marquage de l'actine sarcomérique est spécifique aux cardiocytes alors que celui de l'anticorps anti- β_1 permet de visualiser les fibroblastes. Il y a donc plus de fibroblastes que de cardiocytes dans des cultures de cardiocytes non-traités à l'ara-C. Nous voyons donc que les deux pré étalements réalisés pendant la culture cellulaire ne permettent pas l'adhésion de tous les fibroblastes.

Les figures 19C et D montrent les résultats pour des cultures traitées à l'ara-C. Le marquage étant le même (α_8 marque les fibroblastes), nous voyons que

même avec un traitement, il y a également une contamination des cardiocytes par les fibroblastes. Nous pouvons aussi dire que les cardiocytes sont peu nombreux par rapport aux fibroblastes (figure 19). Toutefois, il semble qu'il y ait moins de marquage avec l'anti α_8 donc moins de fibroblastes auraient proliféré suite au traitement de 72 heures. En fait, que l'on traite ou non les cellules, le rendement total pour les cardiocytes est d'environ 35% (soit 65% de fibroblastes) (données non montrées).

Les figures 20A, C et 21A montrent que l'actine sarcomérique permet de visualiser uniquement et spécifiquement l'actine des sarcomères des cardiocytes. Nous voyons que l'ANF a une localisation périnucléaire (fig 20C et D) et est caractéristique des cardiocytes. L'intégrine β_1 a une localisation diffuse dans la cellule (fig. 21B).

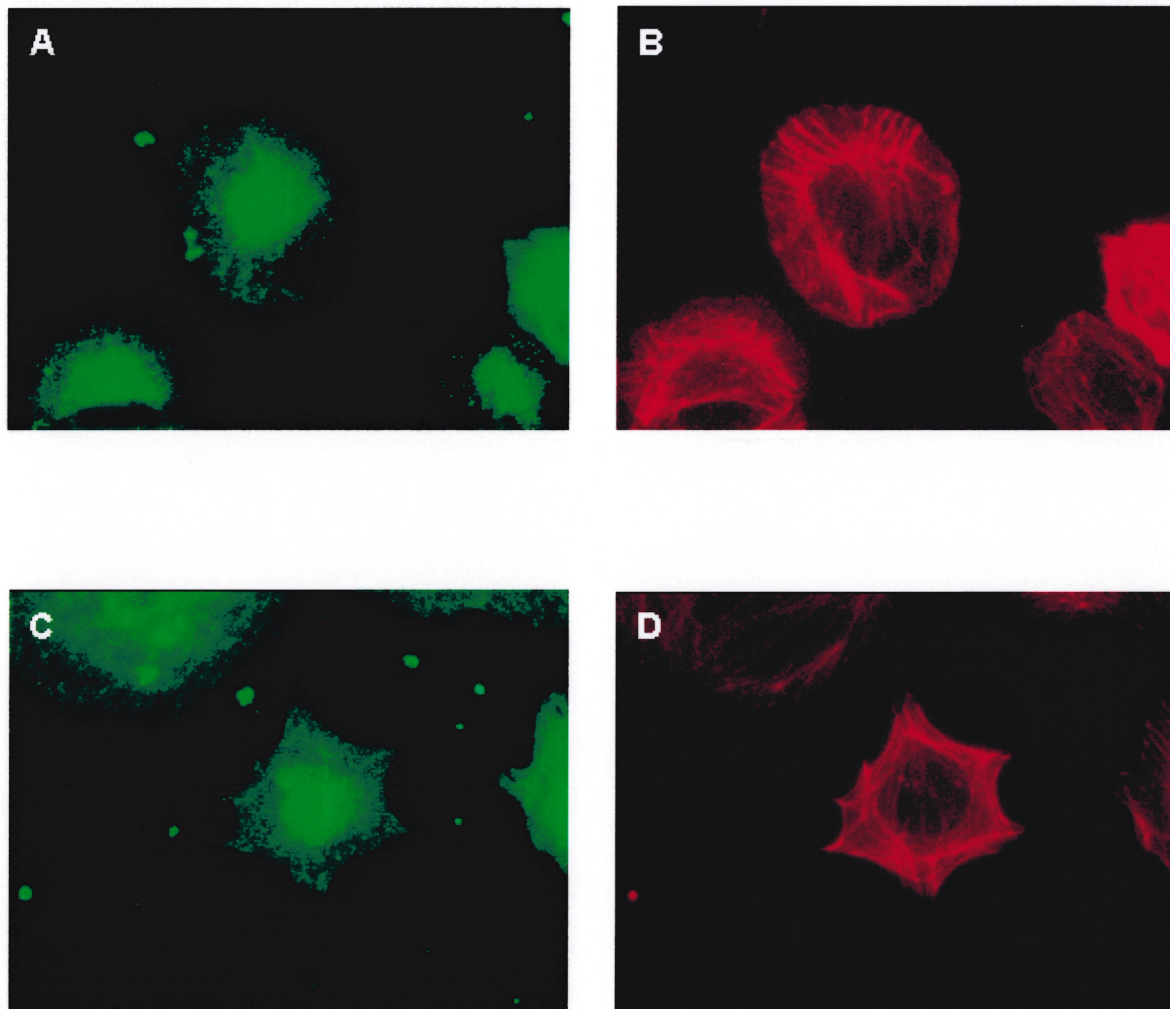


Figure 17 : Double immunocytochimie sur les fibroblastes cardiaques néonataux.

Les marquages ont été faits avec les anticorps suivants : anti α_8 /phalloïdine (fig. 17A et B), anti β_1 /phalloïdine (fig. 17C et D). Les anticorps anti- α_8 et anti- β_1 marquent les fibroblastes de manière diffuse (localisation dans toute la cellule) alors que la phalloïdine permet la visualisation des filaments d'actine. Grossissement x200.

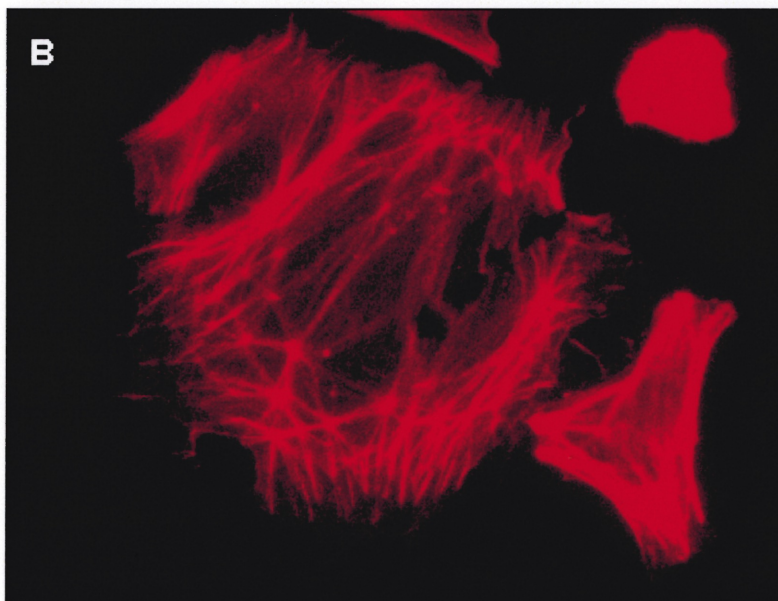
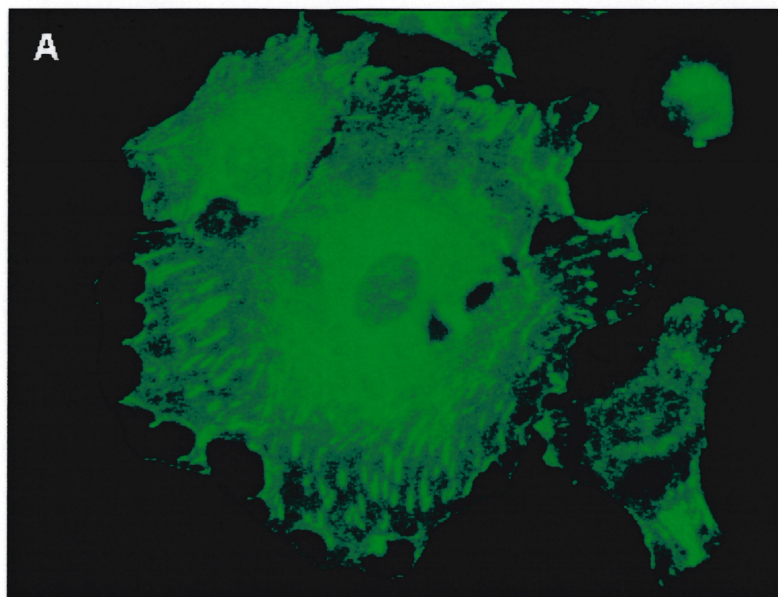


Figure 18 : Double immunocytochimie chez les fibroblastes cardiaques néonataux avec des anticorps spécifiques. Les foyers d'adhésion sont visualisés en utilisant un anticorps anti-vinculine (fig. A) qui va marquer spécifiquement les zones d'ancrage des cellules au substrat. Le marquage à la phalloïdine permet de mettre en évidence les filaments d'actine (fig. B) qui se terminent au niveau des plaques d'adhésion.

Grossissement x200.

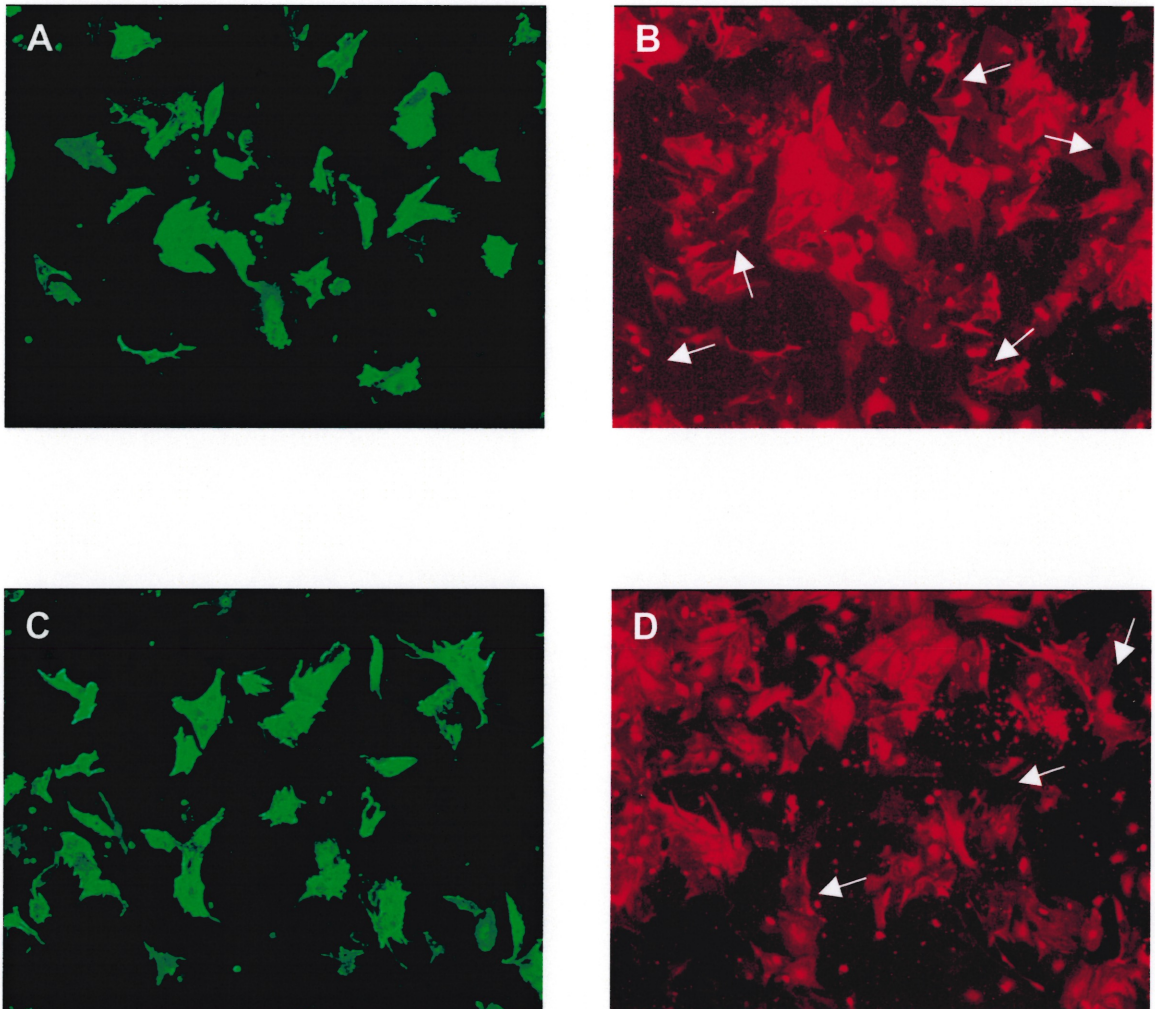


Figure 19 : Double immunocytochimie sur les cardiocytes ventriculaires sans ara-C (fig. 19A et B) et traités avec l'ara-C (fig. 19C et D).

Nous avons utilisé les anticorps anti-β₁ (fig. 19B) et anti-α₈ (fig. 19D) pour visualiser les deux types cellulaires tandis que l'anticorps anti-actine sarcomérique (fig. 19A et C) marque spécifiquement l'actine sarcomérique présente chez les cardiocytes.

Les flèches blanches indiquent la contamination par les fibroblastes, avec ou sans traitement. Grossissement x25.

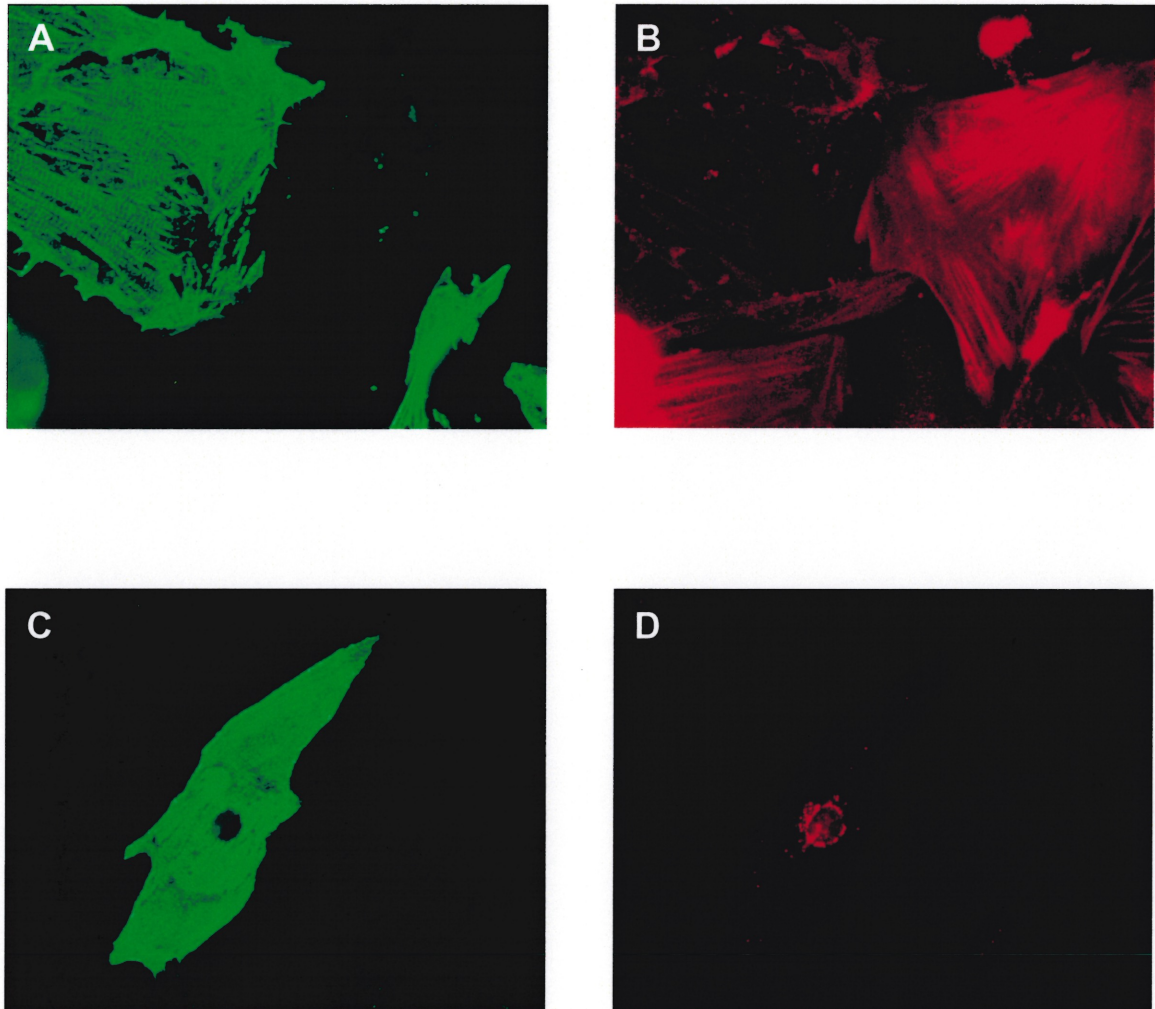


Figure 20: Double immunocytochimie sur les cardiocytes ventriculaires néonataux traités par l'ara-C.

Nous avons réalisé deux marquages : l'anti- α_8 permet de visualiser les fibroblastes néonataux exclusivement (fig. B) alors que l'anti-actine sarcomérique montre la présence des cardiocytes (fig. A et C). L'anti-ANF (fig. D) est également un marqueur des cellules contractiles.

Grossissement x200.

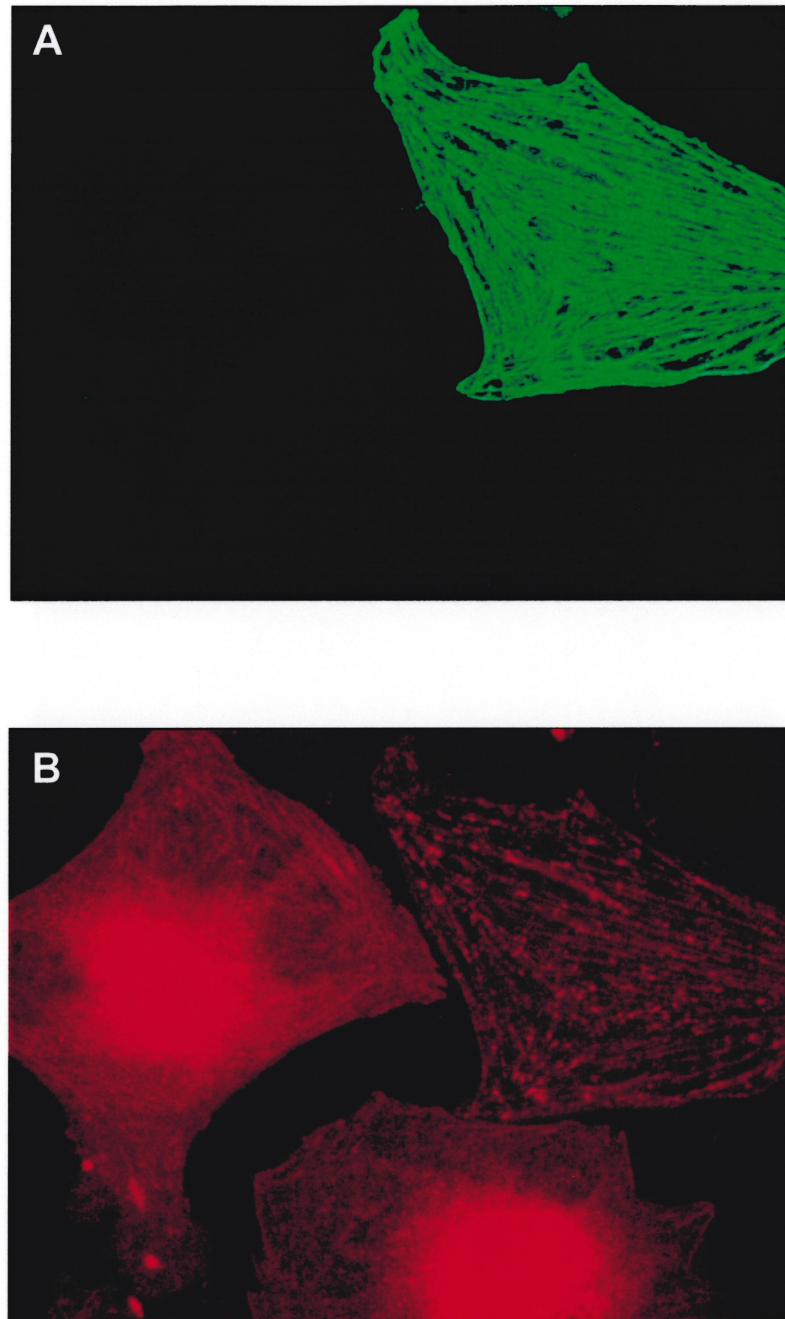


Figure 21: Double immunocytochimie sur les cardiocytes ventriculaires néonataux. Le marquage spécifique de l'anticorps anti-actine sarcomérique (fig. A) permet de détecter les cardiocytes alors que celui réalisé avec l'anticorps anti- $\beta 1$ n'est pas spécifique et met en évidence les deux types cellulaires (fig. B). Grossissement x200.

❖ Vérification de la présence des ARNm des intégrines par buvardage northern.

Chaque plasmide est transformé par culture bactérienne dans des souches d'E. coli. Ensuite, il est coupé par la ou les enzyme(s) de restriction adéquate(s) (Eco R_I ou Hind III) de manière à relâcher l'insert incorporé dans le plasmide. Le résultat obtenu après coupure est chargé sur un gel d'agarose 1%, 0,5% TBE pour vérifier la taille de l'insert. Le gel est ensuite photographié sous UV grâce à l' α -imager, la photo du gel est présentée à la figure 22. Nous avons ensuite hybridé la membrane porteuse des ARNm des cardiocytes et des fibroblastes (à jeun ou stimulés respectivement par l'endothéline-1 ou l'angiotensine II, toutes deux à des concentrations de 10^{-7} M) avec les sondes radioactives générées à partir des inserts obtenus et purifiés. Cette hybridation, à 42°C pendant 12 à 16 heures, a été réalisée pour les intégrines α_v , β_1 , β_3 et α_8 . Les membranes sont ensuite lavées pour éliminer le plus de radioactivité possible puis exposées pendant trois ou quatre heures au phosphor-imager. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 23.

L'ARNm de l'intégrine α_v est présent dans les deux types cellulaires, que les cellules soient stimulées ou non. Les mêmes observations peuvent être faites pour les ARNm des intégrines β_1 et β_3 . Pour l'ARNm de l'intégrine α_8 , seules deux bandes apparaissent au niveau des pistes une et deux : l'ARNm est présent chez les fibroblastes à jeûn (piste 1 ou F₁) et stimulés (piste 2 ou F₂) mais n'existe pas chez les cardiocytes traités à l'ara-C (pistes 3 et 4 ou C₁ et C₂ respectivement).

Les bandes obtenues par phosphor-imager sont ensuite quantifiées et normalisées par rapport à la quantité d'ARNr présente sur la membrane de nylon. Les résultats obtenus montrent que, chez les cardiocytes néonataux, l'ARNr de l'intégrine β_1 voit sa quantité diminuer de deux fois quand nous stimulons les cellules avec l'endothéline-1. Chez les fibroblastes

cardiaques, la quantité de l'ARNr de cette intégrine β_1 est trois fois plus importante chez les cellules stimulées par l'All que chez les cellules à jeun. Pour les complexes α_v et β_3 , il n'y a pas de différence significative notable au niveau du comportement de l'ARNr des cellules stimulées par rapport aux cellules à jeûn.

Pour l'intégrine α_8 , l'ARNr est seulement présent chez les fibroblastes cardiaques néonataux. Nous ne notons pas la présence de l'ARNr de cette intégrine sur les cardiocytes de rats nouveau-nés.

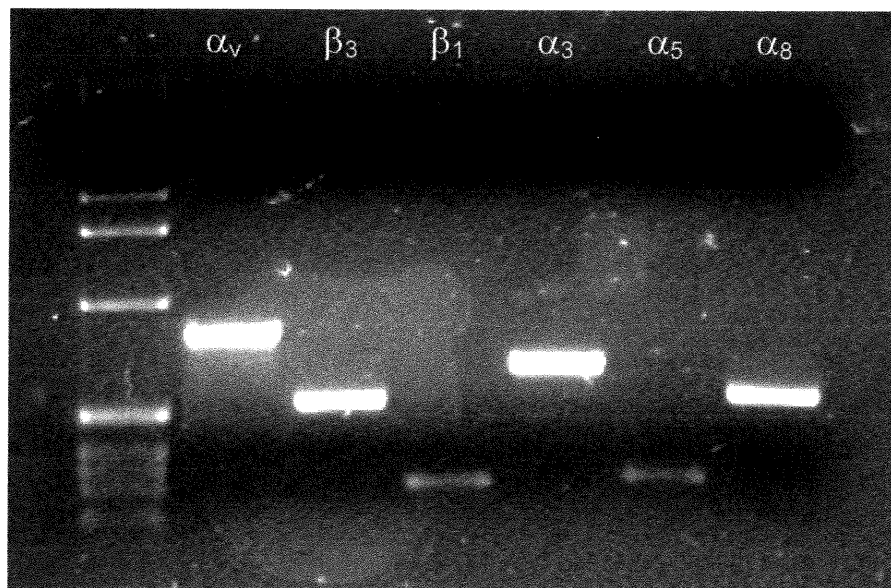


Figure 22 : Photo du gel d'agarose 1% obtenue après la coupure du plasmide par les enzymes de restriction.

Les plasmides α_v et β_3 ont été coupés avec les enzymes de restriction Eco R_I et Hind III. Les plasmides β_1 , α_5 , α_3 et α_8 ont été coupés avec Eco R_I.

Les tailles des inserts obtenues sont les suivantes : α_v = 850 pb (paires de bases); β_3 = 580 pb; β_1 = α_5 = 340 pb; α_3 = 275 pb; α_8 = 610 pb.

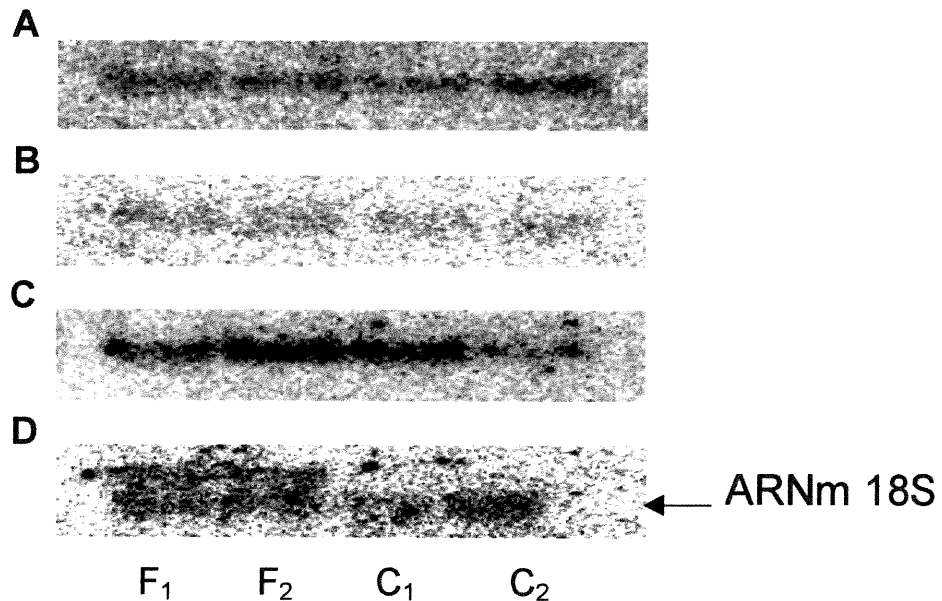


Figure 23 : Buvardages northern obtenus après exposition des membranes de nylon au phosphor-imager. Les membranes de nylon contenant l'ARNm des intégrines ont été hybridées avec une sonde d'ADN radioactive. Après une hybridation de 12 à 16 heures, les membranes sont lavées et exposées au phosphor-imager pendant trois à quatre heures.

A = intégrine α_v , **B** = intégrine β_3 , **C** = intégrine β_1 , **D** = intégrine α_8 .

F₁ représentent les pistes chargées avec des fibroblastes néonataux non stimulés. F₂ représentent les pistes chargées avec les fibroblastes néonataux stimulés par l'AII (10^{-7} M). Les pistes C₁ et C₂ correspondent respectivement aux pistes chargées avec les cardiocytes ventriculaires néonataux à jeûn et avec les cardiocytes stimulés par l'ET-1 (10^{-7} M).

Chapitre IV- Discussion

Identification et localisation des intégrines.

Notre étude a d'abord visé à caractériser les intégrines de type RGD à la surface des fibroblastes cardiaques et des cardiocytes ventriculaires de rats nouveau-nés. Comme de telles observations ont récemment été faites sur les fibroblastes de rats adultes (Thibault et al., 2000), notre étude permet ainsi la comparaison d'expression entre l'animal néonatal et adulte.

Nous venons de montrer, par immunobuvardage, que les fibroblastes cardiaques et les cardiocytes ventriculaires néonataux possèdent différents complexes d'intégrines spécifiques à leur surface. En effet, chez les fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés, on trouve les intégrines $\alpha_8\beta_1$ (220 kDa), $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ (dans un complexe de 210 kDa) et $\alpha_v\beta_3$ (180 kDa) alors que les cardiocytes ventriculaires, eux, ne possèdent que deux complexes d'intégrines : $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ (210 kDa) et $\alpha_v\beta_3$ (180 kDa). Par ailleurs, l'immunocytochimie a confirmé que la sous-unité β_1 est présente chez les deux types cellulaires alors que l' α_8 n'est présente que dans les fibroblastes (fig. 1 et 2). Par buvardage northern, les ARNm des intégrines β_1 , β_3 et α_v ont été identifiés chez les cardiocytes ventriculaires et les fibroblastes (fig. 23A, B et C); l'ARNm de la sous-unité α_8 (fig. 23D) n'a été détecté que chez les fibroblastes (indépendamment de la présence ou non de facteurs de stimulation).

Les intégrines semblent être présentes aussi bien chez les fibroblastes de rat néonatal (trois jours) que de rat adulte (Thibault et al., 2000). Néanmoins, il apparaît que les niveaux d' $\alpha_8\beta_1$ et du complexe $\alpha_3/5/v\beta_1$ chez l'adulte soient en proportion égale. Chez le rat nouveau-né, le niveau de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ est environ deux fois supérieur à celui des intégrines $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$

et $\alpha_v\beta_1$ (fig. 4B). L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, aussi bien chez l'adulte que chez le rat nouveau-né, est minoritaire (30% de la valeur d' $\alpha_8\beta_1$ chez le rat nouveau-né et environ 50% d' $\alpha_8\beta_1$ chez le rat adulte). Ces variations pourraient être le résultat de régulation différentielle des intégrines entre l'adulte et le nouveau-né.

Toutes ces intégrines sont de type RGD et elles sont capables de reconnaître (grâce à la région extracellulaire des sous-unités) des protéines de la MEC à motif RGD comme la fibronectine, la vitronectine, l'ostéopontine, le fibrinogène,...(Ruoslahti et al., 1986; Haas et al., 1994; Berman et al., 2000). Parmi les intégrines que nous avons identifiées, certaines sont impliquées dans les phénomènes de mobilité (comme $\alpha_v\beta_3$) alors que d'autres, comme le récepteur de la fibronectine, $\alpha_5\beta_1$, vont contrôler les mécanismes d'adhésion. L'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ à la surface des cellules requiert l'adhésion au substrat (Dalton et al., 1995). L'intégrine $\alpha_8\beta_1$, quant à elle, est associée à la différenciation des fibroblastes pulmonaires et hépatiques en myofibroblastes et également à un dépôt de tissu fibrotique (Thibault et al., 2000; Schnapp et al., 1995; Levine et al., 2000).

Le travail d'immunocytochimie avec un anticorps dirigé contre la vinculine (fig. 18) a mis en évidence que les intégrines chez le rat nouveau-né sont organisés en foyers d'adhésion focaux, comme cela a déjà été observé précédemment chez l'adulte (Thibault et al., 2000). En effet, la vinculine est la protéine du cytosquelette la plus abondante au niveau des contacts focaux (Vuori, 1998). De plus, les sous-unités β_1 et α_8 sont apparues diffuses à travers toute la cellule chez le nouveau-né (fig. 17A, 17C, 20B, 21B) comme chez l'adulte (Thibault et al., 2000). Mais notre travail ne permet pas de déterminer clairement que les sous-unités α_8 et β_1 participent à la formation des foyers d'adhésion focaux.

Stimulations des fibroblastes cardiaques et des cardiocytes ventriculaires néonataux par l'angiotensine II.

Chez les fibroblastes cardiaques de rats nouveau-nés, nous avons démontré que l'All (10^{-8} M) entraînait un effet hyperplasique (augmentation de la synthèse d'ADN) et hypertrophique (augmentation du taux de synthèse protéique et du contenu protéique total) (fig. 3). La courbe dose-réponse de l'angiotensine II (fig. 9) montre des effets biphasiques sur la synthèse d'ADN chez les fibroblastes c'est-à-dire une hyperplasie des fibroblastes pour une concentration d'All de 10^{-11} M, aucun changement de la synthèse d'ADN pour les concentrations 10^{-10} et 10^{-9} M puis une diminution de la synthèse d'ADN pour les concentrations de 10^{-8} et 10^{-7} M. L'allure biphasique peut peut-être s'expliquer par la présence des deux récepteurs AT_1 et AT_2 dans les cellules néonatales (Fareh et al., 1995; Fareh et al., 1996).

Les fibroblastes cardiaques et cardiocytes ventriculaires néonataux possèdent tous deux des récepteurs AT_1 et AT_2 et le nombre des récepteurs AT_2 décroît ensuite de telle sorte que les cellules cardiaques adultes ne possèdent plus que des récepteurs AT_1 (van Kesteren et al., 1997). Le récepteur AT_2 est couplé à une protéine G inhibitrice et peut entraîner des effets contraires à la croissance (van Kesteren et al., 1997; de Gasparo et al., 1999). Chez l'adulte, seuls quelques organes comme le cerveau, l'ovaire ou la glande adrénérergique expriment encore ce récepteur (Nouet et al., 2000). Pour mieux concevoir notre hypothèse, il aurait fallu disposer des affinités de l'All pour chacun des deux récepteurs et de leur densité respective au stade néonatal. Il se peut que, pour des concentrations inférieures à 10^{-10} M, les récepteurs AT_1 aient plus d'effet que les récepteurs AT_2 (AT_1 a peut-être une affinité plus grande aux basses concentrations et/ou une plus grande densité cellulaire que AT_2). Aux concentrations 10^{-10} et 10^{-9} M, les effets positifs sur la synthèse d'ADN et de protéines seraient contrebalancés par les effets médiés par les récepteurs AT_2 . Aux plus fortes concentrations, les effets inhibiteurs par AT_2 prennent le dessus sur ceux passant par le récepteur AT_1 .

Quant à l'hypertrophie, elle a lieu pour des concentrations d'angiotensine II allant de 10^{-10} à 10^{-7} M (l'effet est dépendant de la dose administrée). Par contre, il n'y a aucun changement du contenu protéique total.

Dans la littérature, les effets obtenus sont variables. Selon les travaux de Schorb, il y a augmentation des protéines et de l'ADN total pour des concentrations d'Ang II allant de 10^{-9} à 10^{-6} M (l'effet maximum étant obtenu pour une concentration de 1 nM d'Ang II) (Schorb et al., 1993). De façon similaire, Sadoshima a également montré une hyperplasie et une hypertrophie des fibroblastes cardiaques avec un effet mitogénique (augmentation de la synthèse d'ADN, du nombre de cellules et des protéines) pour une concentration de 10 nM (soit 10^{-8} M) d'Ang II (Sadoshima et al., 1993). Cependant, les travaux de van Kesteren, quant à eux, démontrent que les stimulations avec des concentrations d'Ang II de 10^{-8} M conduisent à une hypertrophie, sans hyperplasie et sans augmentation du contenu protéique cellulaire total (van Kesteren et al., 1997).

L'augmentation de la quantité de protéines totales est variable d'une étude à l'autre. Néanmoins, le taux de métabolisme protéique (mesuré par incorporation de leucine ou de phénylalanine tritiée) semble bien augmenter avec l'Ang II. Mais si le contenu protéique total est initialement élevé, il est difficile de voir une augmentation (relative) en dépit d'une augmentation du taux de synthèse.

Toutes ces différences peuvent aussi être le fruit des conditions expérimentales : le taux de confluence des cellules parmi plusieurs cultures cellulaires successives peut également jouer un rôle c'est-à-dire qu'il y a de la variabilité au sein des expériences. Nous avons essayé de toujours stimuler les cellules à environ 80% de confluence mais aucune mesure ne nous permet de déterminer concrètement la confluence exacte des cellules au sein d'une boîte de Pétri et de comparer avec le contenu des autres boîtes. De plus, des travaux faits récemment montrent que le nombre de cellulesensemencées est très important et déterminant pour la réponse à obtenir (Simm et al., 1999). En effet, pour une concentration cellulaire inférieure à 2 x

10^4 cellules/cm², l'Angiotensin II (Ang II) induit une prolifération des fibroblastes cardiaques alors que cet effet n'est plus observé pour une concentration supérieure à 1×10^5 cellules/cm².

Le phénomène d'inhibition de croissance peut aussi jouer un rôle: les contacts cellules-cellules peuvent avoir des effets négatifs sur la croissance cellulaire.

Chez l'adulte, l'Ang II (3×10^{-8} M) a un effet hypertrophique et pas d'effet hyperplasique (Thibault et al., 2000). L'effet hypertrophique chez l'adulte pourrait être dû à la seule expression du récepteur AT₁. Chez l'adulte, le récepteur AT₂ a disparu ce qui pourrait expliquer qu'à 10^{-8} M, il n'y a plus l'inhibition que l'on voyait chez le sujet néonatal.

Nous avons obtenu des effets contraires en stimulant les fibroblastes avec 10^{-8} M d'Ang II (fig. 3A et 9A). En répétant cinq fois la courbe dose-réponse (fig. 9A) avec l'Ang II, nous avons conclu à l'inhibition de la synthèse d'ADN pour 10^{-8} M. Dans une autre expérience (fig. 3A), l'Ang II était hyperplasique pour cette même concentration de 10^{-8} M. Comme nous l'avons dit, l'existence de récepteurs AT₁ et AT₂ peut encore expliquer cette incohérence. Le rapport entre les récepteurs AT₁ et AT₂ est très variable notamment à cause la suppression rapide du récepteur AT₂ (de Gasparo et al., 1999). Dans ces conditions, il faut rigoureusement contrôler l'âge des rats nouveau-nés qui sont commandés.

Nous avons donc décidé de faire les stimulations en ajoutant un bloqueur des récepteurs AT₂ appelé PD123319. Les résultats sont présentés à la figure 13 : une concentration de 10^{-8} M d'Ang II seule entraîne une diminution de la synthèse d'ADN, effet conservé quand nous ajoutons 10^{-5} M de PD123319.

Ces résultats ne sont pas concluants et ne permettent pas de prouver que les différences trouvées entre les figures 3 et 9 viennent de la présence des récepteurs AT₁ et/ou AT₂. Il aurait été bon de réaliser la même expérience avec un bloqueur du récepteur AT₁ (tel le losartan) pour montrer que les effets obtenus se font via ce récepteur et aussi d'employer des concentrations

stimulatrices et inhibitrices d'All en présence des inhibiteurs. Il faut également noter que les expériences de la figure 3 ont été réalisées à partir de cultures faites sur des plaques Primaria alors que, pour les expériences de la figure 13, les cultures ont été faites sur des plaques Cell Plus. La différence de revêtement des plaques et donc de substrat peut entraîner une différence de réponse de la part des cellules. Suite à des cultures sur les deux types de plaques, nous avons remarqué que les réponses cellulaires diminuent de 20% quand on passe des Primaria aux Cell Plus (données non montrées).

Les résultats proposés par van Kesteren montrent qu'en présence de PD123319, à une concentration de 10^{-6} M, l'All a un effet hypertrophique, mais pas hyperplasique sur les fibroblastes cardiaques néonataux. En outre, il faut noter que les effets anti-prolifératifs du récepteur AT_2 peuvent dépendre du type cellulaire, du stade de prolifération (de Gasparo et al., 1999).

Chez les fibroblastes de rat néonatal, l'angiotensine II (à 10^{-8} M) augmente fortement l'expression du complexe $\alpha_8\beta_1$ (52%) et $\alpha_v\beta_3$ (21%) et à un moindre degré, celle du complexe $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_1$ (8%) (fig. 4B). Kawano et al. et de Graf et al. avaient déjà constaté que l'All augmentait l'expression de l' $\alpha_v\beta_3$ sur les fibroblastes cardiaques adultes et néonataux respectivement. Thibault et ses collègues ont démontré que l'expression de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ est aussi augmentée (34%) par l'All (3×10^{-8} M) et le TGF- β_1 chez le rat adulte (Thibault et al., 2000). Par contre, dans ces conditions, l'All réduit l'expression des intégrines $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_1$ alors que l' $\alpha_v\beta_3$ reste à un niveau stable. Il apparaît donc, entre le rat néonatal et le rat adulte, que l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ est toujours la plus sensible à l'augmentation par l'All; les autres complexes d'intégrines des fibroblastes sont influencés différemment par l'All à l'âge adulte.

Schnapp et al. et Levine et al. ont montré que la présence de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ et sa sur-expression dans les fibroblastes pulmonaires et hépatiques sont associées à une différenciation des cellules en myofibroblastes et à un dépôt tissulaire du matériel fibrotique. La figure 15 ne montre pas la présence de ces

myofibroblastes mais suggère leur existence par la forte augmentation du contenu extracellulaire en fibronectine: en effet, l'All (10^{-8} M) entraîne une forte augmentation (129%) de la quantité de fibronectine sécrétée par les cellules et donc une accumulation de fibronectine extracellulaire (fig. 15A) proportionnelle à la dose d'All administrée (fig. 15B).

Chez le rat adulte, l'All (10^{-8} M) augmente aussi la synthèse de fibronectine mais en moins grande quantité (49%) que chez les nouveau-nés (Thibault et al., 2000).

L'augmentation de l' $\alpha_5\beta_1$ concomitante avec l'augmentation de fibronectine a sûrement pour effet de favoriser l'adhésion des fibroblastes à la MEC. Cependant, l' $\alpha_8\beta_1$ peut aussi médier un rôle de liaison aux protéines de la MEC d'après son augmentation dans les multiples cas de fibrose observés.

L'interprétation de l'influence de l'All sur les cardiocytes de rats nouveau-nés a été plus délicate suite à la contamination par les fibroblastes.

La disparition d' $\alpha_8\beta_1$ dans les autoradiographies (fig. 7A) et les immunobuvardages (fig. 2A) garantit que l'ara-C réduit les fibroblastes à une proportion mineure. Cependant, l'ara-C va empêcher la contamination de s'accroître mais ne l'élimine pas. Si nous comptons les noyaux des cellules grâce au logiciel Northern Eclipse, nous arrivons à un rendement d'environ 33% donc un tiers seulement des cellules sont des cellules contractiles dans des cultures sensées être quasiment pures. Ce faible rendement obtenu par immunocytochimie peut être dû à une meilleure adhésion des fibroblastes à la fibronectine (enrobant les puits) par rapport aux cardiocytes et aussi à une plus grande perte de cardiocytes pendant les différents traitements d'immunocytochimie (utilisation du détergent triton X-100 et multiples lavages).

A ce sujet, il faut noter que les immunocytochimies ont été réalisées à partir de cellules cultivées sur des lames de verre recouvertes de fibronectine alors que les cellules servant aux stimulations ont été cultivées sur des boîtes Primaria (substrat adéquat pour l'attachement spécifique des cardiocytes). Les

résultats de l'immunocytochimie ne sont donc peut-être pas représentatifs de la composition des cellules stimulées et ne permettent donc pas de déterminer réellement l'étendue des contaminations. En effet, la fibronectine est le substrat de choix pour l'attachement et la prolifération des fibroblastes. Il aurait peut-être mieux valu utiliser des lames de verre recouvertes de collagène (Kessler-Icekson et al., 1984) ou encore "une matrice extracellulaire dérivée des fibroblastes appelée cardiogel" (Bick et al., 1998) pour que les cardiocytes néonataux s'attachent mieux .

Il se peut également que le BSA que nous avons utilisé lors des cultures cellulaires présente une toxicité anormale importante vis à vis des cardiocytes ventriculaires (communication personnelle de Pierre Paradis).

Qui plus est, l'ara-C n'est pas le meilleur produit pour éviter une contamination par les fibroblastes : en plus de modifier passablement les réponses des cellules, il pourrait entraîner une toxicité plus importante pour les cardiocytes que pour les fibroblastes (effets toxiques non-spécifiques). En effet, les cardiocytes perdent la faculté de se diviser trois semaines après la naissance (Itoh et al., 1991) mais les cœurs que nous utilisons sont issus de rats âgés de trois jours et les cardiocytes ne sont pas encore complètement différenciés. Il est donc tout à fait possible qu'ils se divisent encore au moment du traitement. Ils subirait ainsi l'effet de l'ara-C comme les fibroblastes, mais comme ce sont des cellules plus fragiles, le traitement les ferait mourir ce qui diminuerait davantage le rendement cardiocytes/fibroblastes (Simpson et al., 1982; Gmeiner et al., 1998; Kawaguchi et al., 1999).

L'immunocytochimie indique seulement une diminution des fibroblastes après traitement à l'ara-C mais cette technique est quantitativement moins fiable que l'autoradiographie et l'immunobuvardage.

Chez les cardiocytes non traités avec l'ara-C, la stimulation par l'All entraîne des effets hyperplasique et hypertrophique. Ceci pourrait provenir de leur contamination par les fibroblastes; ce serait alors l'effet de l'All sur les fibroblastes que nous visualiserions et non plus l'effet direct de l'All sur les cardiocytes. Cette hypothèse peut être vérifiée par les quantifications. En

effet, sur l'autoradiographie (fig. 7A), il y a apparition de trois bandes de radioactivité. La bande à 220 kDa soit l' $\alpha_8\beta_1$, caractéristique de la présence des fibroblastes, est présente et les complexes $\alpha_8\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ voient leur expression augmenter (fig. 7B) suite à la stimulation (comme chez les fibroblastes cardiaques stimulés par l'All). Chez les cardiocytes traités, il n'y a aucun effet significatif observé, aussi bien sur les cellules que sur les intégrines elles-mêmes.

Stimulations des fibroblastes cardiaques et des cardiocytes ventriculaires par l'endothéline-1.

Nous n'avons remarqué aucun effet de l'ET-1 (10^{-8} M) sur les fibroblastes cardiaques néonataux (fig. 3). Nos résultats coïncident avec les travaux de van Kesteren (1997) qui ne démontre aucun effet significatif de ce facteur de croissance du fait du faible nombre des récepteurs ET_A chez les fibroblastes cardiaques nouveau-nés. Par contre, chez les fibroblastes de rats adultes, ces deux récepteurs sont présents en quantité égale (Fareh et al., 1996).

Chez les cardiocytes néonataux, les deux récepteurs ET_A et ET_B existent mais seuls les effets du récepteur ET_A prédominent. Le récepteur ET_B est présent en faible quantité chez les animaux nouveau-nés (Thibault et al., 1994). Cette prédominance des récepteurs ET_A est également observée chez les cardiocytes de rats adultes et des travaux montrent que plus de 90% des récepteurs sont des récepteurs ET_A (Fareh et al., 1996).

Nos résultats montrent que l'ET-1 exerce un effet hypertrophique en augmentant le contenu protéique total des cardiocytes non-traités à l'ara-C (fig. 5). Piacentini montre aussi de tels résultats (Piacentini et al., 2000). L'ET-1 entraîne une augmentation d'expression pour les complexes $\alpha_8\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ (fig. 7B).

Chez les cardiocytes traités avec l'ara-C, nous obtenons un effet hyperplasique, hypertrophique pour des stimulations à 10^{-8} M d'ET-1. L'équipe

de Itoh a démontré que la croissance des cardiocytes est surtout due à une hypertrophie plutôt qu'à une hyperplasie (Itoh et al., 1991). En effet, d'après leurs recherches, les stimulations par l'ET-1 augmentent l'aire de surface des cardiocytes, la quantité d'ADN et la synthèse protéique sans qu'il n'y ait de prolifération cellulaire. L'hyperplasie que nous observons peut alors venir de deux phénomènes : d'une part, les cellules contractiles néonatales perdent la capacité de se diviser environ trois semaines après la naissance (van Kesteren et al., 1997) mais nos nouveau-nés sont seulement âgés de trois jours. Les cellules sont donc encore capables de se diviser. D'autre part, certains cardiocytes sont binucléés d'après nos observations immunocytochimiques de marquage d'ANF périnucléaire (résultats non présentés). De ce fait, le contenu nucléaire en ADN peut augmenter sans que la cellule ne se divise, sans qu'il n'y ait de mitose (Itoh et al., 1991). Par ailleurs, Itoh et ses collaborateurs (Itoh et al., 1991) observent que l'hypertrophie survient pour des stimulations aux concentrations d'ET-1 que nous avons utilisé (comprises entre 10^{-7} à 10^{-9} M) (fig. 11).

Suzuki et ses collaborateurs montrent que l'hypertrophie des cardiocytes s'accompagne également d'autres changements comme une augmentation du nombre des sarcomères, de l'activité contractile des cellules et bien sur, de la taille des cellules (Suzuki et al., 1990). Pour eux, l'effet maximum de stimulation est obtenu pour une concentration de 10^{-8} M d'ET-1 et les augmentations d'incorporation de phénylalanine tritiée (marqueur du taux de synthèse protéique) sont dépendantes de la dose administrée. Les effets que nous observons sont maximum à une concentration de 10^{-9} M (fig. 11).

Pour ce qui est du profil des intégrines (fig. 12), toutes les concentrations utilisées d'ET-1 entraînent une augmentation de l'expression des deux complexes d'intégrines ($\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$) présents à la surface des cardiocytes ventriculaires traités par l'ara-C. L'augmentation des intégrines $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ par l'ET-1 est capable de mener à la prolifération cellulaire après formation des foyers d'adhésion focaux (Kumar, 1998).

Dosage de l'ANF chez les cardiocytes ventriculaires non traités et traités avec l'ara-C.

Chez les cellules néonatales, l'ANF est synthétisé par les cardiocytes dans les compartiments ventriculaires et auriculaires (Brenner et al., 1990; Nemer et al., 1986). Les ventricules adultes sains ont perdu leur capacité à relâcher de l'ANF. Dans le cas pathologique de l'hypertrophie ventriculaire, il y a réapparition d'une synthèse d'ANF par les ventricules à tel point que l'ANF est considéré comme un marqueur de l'hypertrophie ventriculaire.

Dans un premier temps, nous avons visualisé l'ANF contenu dans les granules de sécrétion périnucléaires des cardiocytes (fig. 20D), ceci étant en accord avec la littérature (de Bold, 1985). Cependant, le marquage obtenu lors de l'immunocytochimie est faible. Les cardiocytes auriculaires contiennent beaucoup plus de granules de sécrétion à l'ANF que les cardiocytes ventriculaires (Nemer et al., 1986). Comme nos cultures ne contiennent que des cardiocytes ventriculaires, il est normal que le marquage de l'ANF soit peu intense.

L'ANF peut être considérablement augmenté par l'ET-1 de façon dépendante de la dose (fig. 16C). Par conséquent, l'ET-1 semble être un facteur critique qui module l'ANF dans les cas d'hypertrophies ventriculaires.

Nous avons cherché à voir les effets des facteurs de croissance intervenant dans l'hypertrophie ventriculaire sur les deux principaux types de cellules cardiaques. Cependant, l'interaction fibroblastes/cardiocytes est nécessaire à de nombreux niveaux physiologiques. En effet, il semblerait qu'il existe un facteur de croissance, synthétisé par les fibroblastes, qui agirait sur les cardiocytes ventriculaires pour déclencher leur hypertrophie (Harada et al., 1997; Harada et al., 1998). Ces chercheurs ont démontré que l'All n'induit pas l'hypertrophie des cardiocytes sans la présence des cellules non contractiles. Par contre, l'All induit une réponse hypertrophique chez les cardiocytes et la production d'ET-1 en co-culture, en présence des fibroblastes. Cette production d'ET-1 entraîne donc une production d'ANF. De plus, *in vivo*, les

cardiocytes et les fibroblastes cohabitent dans le cœur et l'apparition de pathologies fait intervenir les deux types cellulaires.

La méthode de séparation entre les deux populations cellulaires est plutôt grossière (cf. pré étalements). Pour améliorer le rendement au niveau initial de la culture, nous aurions pu utiliser une méthode de séparation des cellules par centrifugation et utilisation d'un gradient de Percoll (Harada et al., 1997; Harada et al., 1998). Cependant, l'inconvénient de cette méthode est qu'elle nécessite de grosses quantités de rats nouveau-nés et que, proportionnellement, le rendement cellulaire obtenu est faible même si la proportion de cardiocytes est plus importante. Les nombreuses centrifugations risquent également d'endommager les cellules.

Afin d'améliorer la pureté des cultures de cardiocytes, le BrdU (bromodéoxyuridine) aurait pu être employé à la place de l'ara-C. Selon les travaux de Simpson, un traitement des cultures pendant trois jours avec 0,1 mM de BrdU conduit à un rendement de 75 à 80% en cellules contractiles (Simpson et al., 1982). Les chercheurs ont aussi remarqué que le synchronisme des battements des cellules est affecté ce qui suggère "une absence de couplage électrique entre les réseaux des cellules non contractiles et des cardiocytes". Il y a donc bien une diminution importante du nombre de fibroblastes.

Des études récentes ont montré qu'il pourrait exister une relation étroite entre l'ANP et les intégrines. Ogawa et son équipe (2000) ont montré que la quantité d'ANP sécrétée par les cardiocytes de rats nouveau-nés augmentait de façon dose-dépendante avec la concentration de fibronectine utilisée comme substrat. De plus, les effets hypertrophiques provoqués par la fibronectine passent par des interactions fibronectine-intégrine RGD. Par conséquent, la synthèse d'ANP accrue par la fibronectine pourrait découler de l'activation des intégrines de type RGD.

D'autres travaux ont mis en évidence que la sur-expression des domaines cytoplasmiques libres de l'intégrine β_{1D} augmente l'expression de l'ANP

endogène et la taille des cellules (Pham et al., 2000). De plus, un blocage de la signalisation des intégrines mène à une sous-régulation de l'ANP.

Effet du FBS sur les cellules par rapport aux autres facteurs de croissance.

Le FBS a été utilisé dans toutes les expériences comme contrôle positif. L'effet résultant de la stimulation des cellules par le FBS est toujours beaucoup plus fort que celui de l'All ou de l'ET-1. Récemment, des chercheurs ont montré que le FBS avait des effets stimulants sur la prolifération d'îlots de cellules pancréatiques de rats adultes et que ces effets sont dépendants de la dose de FBS utilisée (Jun-Seop et al., 1999).

La composition du sérum n'est pas bien connue; elle peut varier de manière négligeable mais contient généralement une grande variété de macromolécules (protéines), des nutriments de bas poids moléculaire, des hormones telles que l'insuline, la thyroxine, la testostérone, la progestérone, le 17 β -estradiol, des facteurs d'attachements et de nombreux oligoéléments comme le magnésium. Tous ces éléments, nécessaires à la croissance *in vitro*, permettent d'obtenir des effets stimulants supérieurs à ceux observés avec l'All ou l'ET-1.

Conclusion

Notre étude, réalisée chez les rats nouveau-nés, permet de mieux appréhender le rôle des intégrines dans le développement cardiaque et leur participation à ces mêmes maladies.

En conclusion, différentes intégrines de type RGD ont été identifiées et localisées à la surface des fibroblastes cardiaques et des cardiocytes ventriculaires néonataux. Sur les fibroblastes cardiaques néonataux, nous retrouvons les mêmes complexes d'intégrines que sur les fibroblastes adultes c'est-à-dire $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$. Par contre, seuls deux complexes d'intégrines, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$, caractérisent les cardiocytes ventriculaires néonataux.

Lors de l'apparition de l'hypertrophie ventriculaire, *in vivo*, il y a une modification des concentrations d'angiotensine II et d'endothéline-1 circulantes. Nous avons démontré, en accord avec la littérature, que ces hormones sont aussi des agents prolifératifs *in vitro* : elles engendrent une hypertrophie et/ou une hyperplasie selon le type cellulaire cardiaque. Nous avons également montré que l'angiotensine II augmente la synthèse de fibronectine chez les fibroblastes néonataux et adultes et l'endothéline-1 augmente le relargage de l'ANF par les cardiocytes ventriculaires néonataux. Ces données sont confortées par la littérature déjà existante sur le sujet. Chacun de ces facteurs de croissance va moduler, plus ou moins, l'expression des intégrines présentes sur les cellules cardiaques. Les propriétés d'adhésion, de croissance et de prolifération sont alors modifiées.

Par conséquent, les intégrines sont associées aux processus de changements morphologiques des cellules cardiaques, de remodelage de la matrice extracellulaire qui peuvent mener à l'hypertrophie ventriculaire.

Bibliographie

1. Aceto J.F. and Baker K.M. [Sar¹]angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells. *American Journal of Physiology* 258: H806-H813, 1990.
2. Agabiti-Rosei E. and Lorenza Muiesan M. Cardiac hypertrophy and hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 7: 211-216, 1998.
3. Ahumada G.G. and Saffitz J.E. Fibronectin in rat heart: a link between cardiac myocytes and collagen. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 32: 383-388, 1984.
4. Albelda S.M. and Buck C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB Journal* 4: 2868-2880, 1990.
5. Aoki H., Richmond M., Izumo S., and Sadoshima J. Specific role of the extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy *in vitro*. *Biochemical Journal* 347: 275-284, 2000.
6. Aoki H., Sadoshima J., and Izumo S. Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy *in vitro*. *Nature Medicine* 6: 183-188, 2000.
7. Baker K.M. and Aceto J.F. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. *American Journal of Physiology* 259: H610-H618, 1990.

8. Battistini B., Chailier P., D'Orléans-Juste P., Brière N., and Sirois P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 14: 385-399, 1993.
9. Berman A.E. and Kozlova N.I. Integrins: structure and functions. *Membrane and Cell Biology* 13: 207-244, 2000.
10. Bick R.J., Snuggs M.B., Poindexter B.J., Buja M., and van Winkle W.B. Physical, contractile and calcium handling properties of neonatal cardiac myocytes cultured on different matrices. *Cell Adhesion and Communication* 6(4): 301-316, 1998.
11. Birnboim H.C. and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523, 1979.
12. Bishop J.E. and Laurent G.L. Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *European Heart Journal* 16: 38-44, 1995.
13. Booz G.W., Dostal D.E. and Baker K.M. Paracrine actions of cardiac fibroblasts on cardiomyocytes : Implications for the cardiac renin-angiotensin system. *American Journal of Cardiology* 83 : 44H-47H, 1999.
14. Borg T.K., Rubin K., Carver W., Samarel A., and Terracio L. The cell biology of the cardiac interstitium. *Trends in Cardiovascular Medicine* 6: 65-70, 1996.
15. Braunwald E. (Ed.) Chapitre 48. *Heart disease. A textbook of cardiovascular medicine.* (1997, 5^e édition). Compagnie W.B. Saunders, p.1639-1644.

16. Brecher P. Angiotensin II and cardiac fibrosis. *Trends in Cardiovascular Medicine* 6: 193-198, 1996.
17. Brenner B.M., Ballermann B.J., Gunning M.E., and Zeidel M.L. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. *Physiological Reviews*. 70: 665-699, 1990.
18. Byzova T.V., Rabbani R., D'Souza S.E., and Plow E.F. Role of integrin $\alpha v \beta 3$ in vascular biology. *Thrombosis and Haemostasis* 80: 726-734, 1998.
19. Cao L. and Gardner D.G. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 25: 227-234, 1995.
20. Carretero O.A. and Scicli G. Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension* 18: I-58-I-69, 1991.
21. Carver W., Price R.L., Raso D.S., Terracio L., and Borg T.K. Distribution of β -1 integrin in the developing rat heart. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 42: 167-175, 1994.
22. Cary L.A. and Guan J-L. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Frontiers in Bioscience* 4: d102-d113, 1999.
23. Chen P., Hussain A., and Tai H-H. An improved method of radioiodination with chloramine T. *Analytical Biochemistry* 219: 159-161, 1994.
24. Chomczynski P. and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159, 1987.

25. Clark E.A., King W.G., Brugge J.S., Symons M., and Hynes R.O. Integrin-mediated signals regulated by members of the Rho family of GTPases. *Journal of Cell Biology* 142: 573-586, 1998.
26. Clemetson K.J. and Clemetson J.M. Integrins and cardiovascular disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 502-513, 1998.
27. Coppolino M.G. and Dedhar S. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 32: 171-188, 2000.
28. Critchley D.R. Focal adhesions- the cytoskeletal connection. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 133-139, 2000.
29. Dalton S.L., Scharf E., Briesewitz R., Marcantonio E.E., and Assoian R.K. Cell adhesion to extracellular matrix regulates the life cycle of integrins. *Molecular Biology of the Cell* 6: 1781-1791, 1995.
30. Danser J.A.H., Saris J.J., Schuijt M.P., and van Kats J.P. Is there a local renin-angiotensin system in the heart? *Cardiovascular Research* 44: 252-265, 1999.
31. de Bold A.J. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science* 230: 767-770, 1985.
32. de Gasparo M. and Siragy H.M. The AT₂ receptor: fact, fancy and fantasy. *Regulatory Peptides* 81: 11-24, 1999.
33. Denda S., Reichardt L.F., and Müller U. Identification of osteopontin as a novel ligand for the integrin $\alpha_8\beta_1$ and potential roles for this integrin-ligand interaction in kidney morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* 9: 1425-1435, 1998.

34. Dollery C.M., McEwan J.R., and Henney A.M. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Circulation Research* 77: 863-868, 1995.
35. Dostal D.E. and Baker K.M. Angiotensin II stimulation of left ventricular hypertrophy in adult rat heart. Mediation by the AT₁ receptor. *American Journal of Hypertension*. 5: 276-280, 1992c.
36. Dostal D.E. and Baker K.M. Evidence for a role of an intracardiac renin-angiotensin system in normal and failing hearts. *Trends in Cardiovascular Medicine* 3: 67-74, 1993.
37. Dostal D.E., Rothblum K.N., Chernin M.I., Cooper G.R., and Baker K.M. Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. *American Journal of Physiology*. 263: C838-C850, 1992b.
38. Dostal D.E., Rothblum K.N., Conrad K.M., Cooper G.R., and Baker K.M. Detection of angiotensin I and II in cultured rat cardiac myocytes and fibroblasts. *American Journal of Physiology*. 263: C851-C863, 1992a.
39. Eghbali M. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Research in Cardiology* 87: 183-189, 1992.
40. Eghbali M., Czaja M.J., Zeidel M., Weiner F.R., Zern M.A., Seifter S., and O.O.Blumenfeld. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 20: 267-276, 1988.

41. Elices M.J., Urry L.A., and Hemler M.E. Receptor functions for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by ARG-GLY-ASP peptide and by divalent cations. *Journal of Cell Biology* 112: 169-181, 1991.
42. Fareh J., Touyz R.M., Schiffrin E.L., and Thibault G. Endothelin-1 and angiotensin II receptors in cells from rat hypertrophied heart. Receptor regulation and intracellular Ca^{2+} modulation. *Circulation Research* 78: 302-311, 1996.
43. Fareh J., Touyz R.M., Thibault G., and Schiffrin E.L. Basal and angiotensin II-induced cytosolic free calcium in adult rat cardiomyocytes and fibroblasts after volume overload. *Hypertension* 26: 1149-1153, 1995.
44. Farhadian F., Contard F., Corbier A., Barrieux A., Rappaport L., and Samuel J.L. Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27: 981-990, 1995.
45. Farhadian F., Contard F., Sabri A., Samuel J.L., and Rappaport L. Fibronectin and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. *Cardiovascular Research* 32: 433-442, 1996.
46. Faull R.J. and Ginsberg M.H. Inside-out signaling through integrins. *Journal of the American Society of Nephrology* 7: 1091-1097, 1996.
47. Fässler R. and Meyer M. Consequences of lack of $\beta 1$ integrin gene expression in mice. *Genes and Development* 9: 1896-1908, 1995.

48. Feinberg A.P. and Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* 132: 6-13, 1983.
49. Friedlander M., Theesfeld C.L., Sugita M., Fruttiger M., Thomas M.A., Chang S., and Cheresh D.A. Involvement of integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ in ocular neovascular diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 9764-9769, 1996.
50. Fujisaki H., Ito H., Hirata Y., Tanaka M., Hata M., Lin M., Adachi S., Akimoto H., Marumo F. and Hiroe M. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *Journal of Clinical Investigation* 96 : 1059-1065, 1995.
51. Giancotti F.G. Complexity and specificity of integrin signaling. *Nature Cell Biology* 2: E13-E14, 2000.
52. Giancotti F.G. and Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032, 1999.
53. Gmeiner W.H., Skradis A., Pon R.T., and Liu J. Cytarabine-induced destabilization of a model Okazaki fragment. *Nucleic Acids Research* 26: 2359-2365, 1998.
54. Gotwals P.J., Chi-Rosso G., Lindner V., Yang J., Ling L., Fawell S.E., and Koteliensky V.E. The $\alpha_1\beta_1$ integrin is expressed during neointima formation in rat arteries and mediates collagen matrix reorganization. *Journal of Clinical Investigation*. 97: 2469-2477, 1996.
55. Gould R.J., Polokoff M.A., Friedman P.A., Huang T-F., Holt J.C., Cook J.J., and Niewiarowski S. Disintegrins: a family of integrin inhibitory

- proteins from viper venoms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 195: 168-171, 1990.
56. Graf K., Neuss M., Stawowy P., Hsueh W.A., Fleck E., and Law R.E. Angiotensin II and $\alpha_v\beta_3$ integrin expression in rat neonatal cardiac fibroblasts. *Hypertension* 35: 978-984, 2000.
 57. Gray M.O., Long C.S., Kalinyak J.E., Li H.-T., and Karlner J.S. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF- β_1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovascular Research* 40 : 352-363, 1998.
 58. Gutkowska J., Genest J., Thibault G., Garcia R., Larochelle P., Cusson J.R., Kuchel O., Hamet P., De Léan A., and Cantin M. Circulating forms and radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 16: 183-198, 1987.
 59. Haas T.A. and Plow E.F. Integrin-ligand interactions: a year in review. *Current Opinion in Cell Biology* 6: 656-662, 1994.
 60. Harada M., Saito Y., Kuwahara K., Ogawa E., Ishikawa M., Nakagawa O., Miyamoto Y., Kamitani S., Hamanaka I., Kajiyama N., Takahashi N., Masuda I., Itoh H., and Nakao K. Interaction of myocytes and nonmyocytes is necessary for mechanical stretch to induce ANP/BNP production in cardiocytes culture. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 31: S357-S359, 1998.
 61. Harada M., Saito Y., Nakagawa O., Miyamoto Y., Ishikawa M., Kuwahara K., Ogawa E., Nakayama M., Kamitani S., Hamanaka I., Kajiyama N., Masuda I., Itoh H., Tanaka I., and Nakao K. Role of cardiac nonmyocytes in cyclic mechanical stretch-induced myocyte hypertrophy. *Heart Vessels* 12: 198-200, 1997a.

62. Harada M., Itoh H., Nakagawa O., Ogawa Y., Miyamoto Y., Kuwahara K., Ogawa E., Igaki T., Yamashita J., Masuda I., Yoshimasa T., Tanaka I., Saito Y., and Nakao K. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy- Evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes. *Circulation* 96 : 3737-3744, 1997b.
63. Hartner A., Schöcklmann H., Pröls F., Müller U., and Sterzel R.B. α_8 integrin in glomerular mesangial cells and in experimental glomerulonephritis. *Kidney International* 56: 1468-1480, 1999.
64. Hilenski L.L., Xuehui M., Vinson N., Terracio L., and Borg T.K. The role of β_1 integrin in spreading and myofibrillogenesis in neonatal rat cardiomyocytes in vitro. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 21: 87-100, 1992.
65. Hillis G.S. and MacLeod A.M. Integrins and disease. *Clinical Science* 91: 639-650, 1996.
66. Hsueh W.A., Law R.E., and Do Y.S. Integrins, adhesion, and cardiac remodeling. *Hypertension* 31: 176-180, 1998.
67. Humphries M.J. and Newham P. The structure of cell adhesion molecules. *Trends in Cell Biology* 8: 78-83, 1998.
68. Hynes R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554, 1987.
69. Hynes R.O. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in cell adhesion. *Cell* 69: 11-25, 1992.

70. Hynes R.O. The dynamic dialogue between cells and matrices: implications of fibronectin's elasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 2588-2590, 1999.
71. Hynes R.O., Destree A.T., and Wagner D.D. Relationships between microfilaments, cell-substratum adhesion, and fibronectin. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 46: 659-670, 1982.
72. Itoh H., Hirata Y., Hiroe M., Tsujino M., Adachi S., Takamoto T., Nitta M., Taniguchi K., and Marumo F. Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circulation Research* 69: 209-215, 1991.
73. Iwai N., Shimoike H., and Kinoshita M. Cardiac renin-angiotensin system in the hypertrophied heart. *Circulation* 92: 2690-2696, 1995.
74. Jun-Seop S., Chang H.-I., Sung H.-C. and Kim C.-W. The effects of fetal bovine serum, epidermal growth factor, and retinoic acid on adult rat islets embedded in collagen gels. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 9(2) : 150-156, 1999.
75. Jones J.L. and Walker R.A. Integrins: a role as cell signaling molecules. *Molecular Pathology* 52: 208-213, 1999.
76. Ju H. and Mc Dixon I. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Canadian Journal of Cardiology* 12: 1259-1267, 1996.
77. Katz A.M. Chapitre1. Katz A .M. (Ed.) (1977). *Physiology of the heart*. New York. Raven Press.

78. Kawaguchi T., Ichikawa T., Hasegawa T., Saneyoshi M., Yukita A., Asano M., Wakayama T., Kato H., and Nagata T. Cytotoxicity and pharmacokinetics of 1- β -D-arbinofuranosyl-2-thiocytosine, a 2-sulphur substituted derivative of cytarabine. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 22: 100-102, 1999.
79. Kawano H., Cody R.J., Graf K., Goetze S., Kawano Y., Schnee J., Law R.E., and Hsueh W.A. Angiotensin II enhances integrin and α -actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension* 35: 273-279, 2000a.
80. Kawano H., Do Y.S., Kawano Y., Starnes V., Barr M., Law R.E., and Hsueh W.A. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Hypertension* 101: 1130-1137, 2000b.
81. Kern A., Eble J., Golbik R., and Kühn K. Interaction of type IV collagen with the isolated integrins $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$. *European Journal of Biochemistry* 215: 151-159, 1993.
82. Kessler-Icekson G., Sperling O., Rotem C., and Wasserman L. Cardiomyocytes cultured in serum-free medium. Growth and creatine kinase activity. *Experimental Cell Research* 155: 113-120, 1984.
83. Koller K.J. and Goeddel D.V. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 86: 1081-1088, 1992.
84. Kreidberg J.A. Functions of $\alpha_3\beta_1$ integrin. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 548-553, 2000.
85. Kueng W., Silber E., and Eppenberger U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry* 182: 16-19, 1989.

86. Kumar C.C. Signaling by integrin receptors. *Oncogene* 17: 1365-1373, 1998.
87. Lehrach H., Diamond D., Wozney J.M., and Boedtke H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* 16: 4743-4751, 1977.
88. Lembo G., Hunter J.J., and Chien K.R. Signaling pathways for cardiac growth and hypertrophy. Recent advances and prospects for growth factor therapy. *Annals New York Academy of Sciences*. 752: 115-127, 1995.
89. Levine D., Rockey D.C., Milner T.A., Breuss J.M., and Schnapp L.M. Expression of the integrin alpha8 beta1 during pulmonary and hepatic fibrosis. *American Journal of Pathology* 156: 1927-1935, 2000.
90. Long C.S., Henrich C.J., and Simpson P.C. A growth factor for cardiac myocytes is produced by cardiac nonmyocytes. *Cell Regulation* 2: 1081-1095, 1991.
91. Longhurst C.M. and Jennings L.K. Integrin-mediated signal transduction. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 514-526, 1998.
92. Lusinskas F.W. and Lawler J. Integrins as dynamic regulators of vascular function. *FASEB Journal* 8: 929-938, 1994.
93. McKenna D., Summerour S.R., and Villareal F.J. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovascular Research* 46: 257-263, 2000.

94. McLane M.A., Marcinkiewicz C., Vijay-Kumar S., Wierzbicka-Patynowski I., and Niewiarowski S. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 219: 109-119, 1998.
95. Meredith Jr.J.E., Winitz S., McArthur Lewis J., Hess S., Ren X-D., Renshaw M.W., and Schwartz M.A. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocrine Reviews* 17: 207-220, 1996.
96. Methot D., LaPointe M.C., Touyz R.M., Yang X-P., Carretero O.A., Deschepper C.F., Schiffrin E.L., Thibault G., and Reudelhuber T.L. Tissue targeting of angiotensin peptides. *Journal of Biological Chemistry* 272: 12994-12999, 1997.
97. Mizejewski G.J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proceedings of the Society for Experimental Biology & Medicine* 222: 124-138, 1999.
98. Morgan H.E. and Baker K.M. Cardiac hypertrophy- Mechanical, neural, and endocrine dependence. *Circulation* 83: 13-25, 1991.
99. Morrison M. and Sisco Bayse G. Catalysis of iodination by lactoperoxidase. *Biochemistry* 9: 2995-3000, 1970.
100. Müller U., Wang D., Denda S., Meneses J.J., Pederson R.A., and Reichardt L.F. Integrin $\alpha_8\beta_1$ is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell* 88: 603-613, 1997.

101. Nemer M., Lavigne J.P., Drouin J., Thibault G., Gannon M., and Antakly T. Expression of atrial natriuretic factor gene in heart ventricular tissue. *Peptides* 7: 1147-1152, 1986.
102. Nemoto S., Sheng Z., and Lin A. Opposing effects of Jun Kinase and p38 mitogen-activated protein kinases on cardiomyocyte hypertrophy. *Molecular and Cellular Biology* 18: 3518-3526, 1998.
103. Nouet S. and Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor. *TEM* 11: 1-6, 2000.
104. Ogawa E., Saito Y., Harada M., Kamitani S., Kuwahara K., Miyamoto Y., Ishikawa M., Hamanaka I., Kajiyama N., Takahashi N., Nakagawa O., Masuda I., Kishimoto I., and Nakao K. Outside-in signalling of fibronectin stimulates cardiomyocyte hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32 : 765-776, 2000.
105. Pankov R., Cukierman E., Katz B-Z., Matsumoto K., Lin D.C., Lin S., Hahn C., and Yamada K.M. Integrin dynamics and matrix assembly: tensin-dependent translocation of $\alpha 5\beta 1$ integrins promotes early fibronectin fibrillogenesis. *The journal of Cell Biology* 148: 1075-1090, 2000.
106. Parise L.V. Integrin $\alpha IIb\beta 3$ signaling in platelet adhesion and aggregation. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 597-601, 1999.
107. Pelouch V., Dixon I.M.C., Golfman L., Beamish R.E., and Dhalla N.S. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Molecular and Cellular Biochemistry* 129: 101-120, 1994.

108. Pham C.G., Harpf A.E., Keller R.S., Vu H.T., Shai S.-Y., Loftus J.C., and Ross R.S. Striated muscle-specific β_{1D} -integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. *American Journal of Physiology- Heart and Circulation Physiology* 279 : H2916-H2926, 2000.
109. Piacentini L., Gray M., honbo N.Y., Chentoufi J., Bergman M., and Karliner J.S. Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32: 565-576, 2000.
110. Pönicke K., Heinroth-Hoffmann I., Becker K., and Brodde O-E. Trophic effect of angiotensin II in neonatal rat cardiomyocytes: role of endothelin-1 and non-myocyte cells. *British Journal of Pharmacology* 121: 118-124, 1997.
111. Price R.L., Nakagawa M., Terracio L., and Borg T.K. Ultrastructural localization of laminin on *in vivo* embryonic, neonatal, and adult rat cardiac myocytes and in early rat embryos raised in whole-embryo culture. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 40: 1373-1381, 1992.
112. Rennard S.I., Berg R., Martin G.R., Foidart J.M., and Gehron Robey P. Enzyme-Linked Immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Analytical Biochemistry* 104: 205-214, 1980.
113. Roberts A.B., Sporn M.B., and Lefer A.M. Cardioprotective actions of transforming growth factor- β . *Trends in Cardiovascular Medicine* 3: 77-81, 1993.
114. Ross R.S., Pham C., Shai S.Y., goldhaber J.I., Fenczik C., Glembotski C.C., Ginsberg M.H., and Loftus J.C. β_1 integrins participate in the

- hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circulation Research* 82: 1160-1172, 1998.
115. Ruoslahti E. Integrins. *Journal of Clinical Investigation*. 87: 1-5, 1991.
116. Ruoslahti E., Hayman E.G., Pierschbacher M., and Engvall E. Fibronectin: purification, immunological properties, and biological activities. *Methods in Enzymology* 82: 803-831, 1982.
117. Ruoslahti E. and Pierschbacher M.D. Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. *Cell* 44: 517-518, 1986.
118. Sadoshima J. and Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT₁ receptor subtype. *Circulation Research* 73: 413-423, 1993.
119. Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T. Tomes 1, 2, 3. Ed. Ford N., Nolan C., Ferguson M. (1989). *Molecular cloning- A laboratory manual*.
120. Santoro S.A. and Zutter M.M. The $\alpha_2\beta_1$ integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thrombosis and Haemostasis* 74: 813-821, 1995.
121. Schaper J., Froede R., Hein St., Buck A., Hashizume H., Speiser B., Friedl A., and Bleese N. Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy. *Circulation* 83: 504-514, 1991.
122. Schaper J. and Speiser B. The extracellular matrix in the failing human heart. *Basic Research in Cardiology* 87: 303-309, 1992.

123. Schlaepfer D.D. and Hunter T. Integrin signaling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends in Cell Biology* 8: 151-157, 1998.
124. Schnapp L.M., Breuss J.M., Ramos D.M., Sheppard D., and Pytela R. Sequence and tissue distribution of the human integrin α_8 subunit: A β_1 -associated α subunit expressed in smooth muscle cells. *Journal of Cell Science* 108: 537-544, 1995.
125. Schorb W., Booz G.W., Dostal D.E., Conrad K.M., Chang K.C., and Baker K.M. Angiotensin II is mitogenic in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Circulation Research* 72: 1245-1254, 1993.
126. Schorb W., Conrad K.M., Singer H.A., Dostal D.E., and Baker K.M. Angiotensin II is a potent stimulator of MAP-kinase activity in neonatal rat cardiac fibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27: 1151-1160, 1995.
127. Schwarzbauer J.E. and Sechler J.L. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 11: 622-627, 1999.
128. Sen P.S.S. Angiotensin II and myocyte growth- Role of fibroblasts. *Hypertension* 30 : 209-216, 1997.
129. Shattil S.J., Ginsberg M.H., and Brugge J.S. Adhesive signaling in platelets. *Current Opinion in Cell Biology* 6: 695-704, 1994.
130. Shiraishi I., Simpson D.G., Carver W., Price R., Hirozane T., Terracio L., and Borg T.K. Vinculin is an essential component for normal myofibrillar arrangement in fetal mouse cardiac myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29: 2041-2052, 1997.

131. Simm A., Diez C. Density dependent expression of PDGF-A modulates the angiotensin II dependent proliferation of rat cardiac fibroblasts. *Basic Research in Cardiology* 94: 464-471, 1999.
132. Simpson D.G., Terracio L., Terracio M., Price R.L., Turner D.C., and Borg T.K. Modulation of cardiac myocyte phenotype in vitro by the composition and orientation of the extracellular matrix. *Circulation Research* 16: 38-44, 1994.
133. Simpson P. and Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells. *Circulation Research* 50: 101-116, 1982.
134. Stewart M. and Hogg N. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *Journal of Cellular Biochemistry* 61: 554-561, 1996.
135. Suzuki T., Hoshi H., and Mitsui Y. Endothelin stimulates hypertrophy and contractility of neonatal rat cardiac myocytes in a serum-free medium. *FEBS Letters* 268: 149-151, 1990.
136. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological Reviews* 79: 215-262, 1999.
137. Thibault G. Sodium dodecyl sulfate-stable complexes of echistatin and RGD-dependent integrins: a novel approach to study integrins. *Molecular Pharmacology*. 58: 1-9, 2000.
138. Thibault G., Amiri F., and Garcia R. Regulation of natriuretic peptide secretion by the heart. *Annual Review of Physiology* 61: 193-217, 1999.

139. Thibault G., Doubell A.F., Garcia R., Larivière R., Schiffrin E.L. Endothelin-stimulated secretion of natriuretic peptides by rat atrial myocytes is mediated by endothelin A receptors. *Circulation Research* 74 : 460-470, 1994.
140. Thibault G., Lacombe M.J., Lacasse A., and Lapalme G. $\alpha 8\beta 1$ integrin expression on rat cardiac fibroblasts: upregulation by angiotensin II and transforming growth factor $\beta 1$ and localization at focal adhesion sites. *En soumission, 2000.*
141. Thibault G., Murthy K.K., Gutkowska J., Seidah N.G., Lazure C., Chrétien M., and Cantin M. NH₂-terminal fragment of rat pro-atrial natriuretic factor in the circulation: identification, radioimmunoassay and half-life. *Peptides* 9: 47-53, 1988.
142. Thibault G., Nemer M., Drouin J., Lavigne J.P., Ding J., Charbonneau C., Garcia R., Genest J., Jasmin G., Sole M., and Cantin M. Ventricles as a major site of atrial natriuretic factor synthesis and release in cardiomyopathic hamsters with heart failure. *Circulation Research* 65: 71-82, 1989.
143. Touyz R.M., Fareh J., Thibault G., Tolloczko B., Larivière M., and Schiffrin E.L. Modulation of Ca²⁺ transients in neonatal and adult rat cardiomyocytes by angiotensin II and endothelin-1. *American Journal of Physiology*. 270: H857-H868, 1996.
144. Urbain R., Michel J.B., Bouveret P., Wisnewsky C., Schwartz K., and Mercadier J.J. Accumulation ventriculaire gauche de l'acide ribonucléique messenger codant pour le facteur atrial natriurétique dans divers modèles expérimentaux d'hypertrophie cardiaque chez le rat. *Archives des Maladies du Coeur* 82: 1089-1092, 1989.

145. van Kesteren C.A., van Heugten H.A.A., Lamers J.M.J., Saxena P.R., Schalekamp M.A.D.H., and Danser A.H.J. Angiotensin II-mediated growth and antigrowth effects in cultured neonatal rat cardiac myocytes and fibroblasts. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 29: 2147-2157, 1997.
146. Vuori K. Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *Journal of Membrane Biology* 165: 191-199, 1998.
147. Weber K.T. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *Journal of the American College of Cardiology* 13: 1637-1652, 1989.
148. Weber K.T. Cardiac interstitium: extracellular space of the myocardium. (1992). *The heart and the cardiovascular system*. Ed. H.A. Fozzard et al. New York, Raven Press, p. 1465-1480.
149. Weber K.T. and Brilla C.G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. *Circulation* 83: 1849-1865, 1991.
150. Weber K.T., Sun Y., Tyagi S.C., and Cleutjens J.P.M. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 26: 279-292, 1994.
151. Yang J.T., Rayburn H., and Hynes R.O. Embryonic mesodermal defects in α_5 integrin-deficient mice. *Development* 119: 1093-1105, 1993.
152. Yurchenco P.D. and Schittny J.C. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB Journal* 4: 1577-1590, 1990.

153. Zheng D.Q., Fornaro M., Bofetiado C.J.M., Tallini G., Bosari S., and Languino L.R. Modulation of cell proliferation by the integrin cytoplasmic domain. *Kidney International* 51: 1434-1440, 1997.

Remerciements

Je remercie le Dr Thibault de m'avoir confié un projet aussi intéressant. Ma maîtrise a été l'occasion d'apprendre des techniques performantes et le comportement dans un laboratoire de recherche.

Geneviève a été un soutien primordial pour le bon déroulement de mes expériences. Elle a montré beaucoup de patience au cours de mon apprentissage.

Merci à Sandro et à Sylvie pour avoir beaucoup amélioré mon intégration à l'IRCM et pour leur conseil et leur aide, de grande qualité, lors des expériences de biologie moléculaire.

Gary a donné généreusement de son temps pour faire progresser mon esprit critique et pour me conseiller. Plus qu'un collègue étudiant, il sait faire partager son expérience de manière amicale.

Merci à toi, Vincent, pour l'extrême patience dont tu fais preuve et pour tous les précieux conseils que tu me donnes en quelque situation que ce soit.

La Maîtrise m'a donné plus de goût pour la recherche et m'a appris de grandes qualités humaines des autres et de moi même.