

Université de Montréal

Analyse fonctionnelle des intégrines de type RGD.

Par

Marie-Josée Lacombe

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.

Juin 2001

© Marie-Josée Lacombe, 2001.



QH

506

U54

2002

V.005

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Analyse fonctionnelle des intégrines de type RGD.

présenté par

Marie-Josée Lacombe

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Christian Deschepper : Président-rapporteur

Dr. Gaétan Thibault : Directeur de recherche

Dr. André De Léan : Membre du jury

Mémoire accepté le :

Sommaire

En changeant ses propriétés d'adhésion, la cellule peut répondre aux stimuli de son environnement. Cette adhésion est permise grâce aux intégrines qui forment une famille de récepteurs hétérodimériques. Les intégrines sont des glycoprotéines composées des sous-unités α et β . Une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) présente sur certaines protéines de la matrice extracellulaire permet la liaison avec les intégrines RGD-dépendantes. Lors d'une activation cellulaire, les intégrines doivent présenter une forte affinité envers différents ligands protéiques. L'affinité des intégrines est dépendante du type cellulaire, du type d'intégrine, du ligand, de la présence de cations divalents ainsi que de la signalisation cellulaire. Ces récepteurs de surface sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques ainsi que dans la pathogenèse de plusieurs maladies.

Par une nouvelle approche utilisant l' ^{125}I -échistatine, cinq intégrines RGD-dépendantes ont été préalablement identifiées comme étant les intégrines $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 3\beta 1/\alpha 5\beta 1/\alpha v\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ et ce, à partir de fibroblastes cardiaques de rats adultes. Provenant du venin de serpent, l'échistatine est une désintégrine avec un motif RGD qui est utilisée comme sonde afin de visualiser et de caractériser les intégrines. L'interaction ^{125}I -échistatine-intégrine résulte en un complexe stable dont la formation est détectée par autoradiographie suite à un SDS-PAGE sous des conditions non dénaturantes.

Notre projet consiste à démontrer que les intégrines sont des récepteurs membranaires dont l'activité est modulable. Après une purification de membranes de fibroblastes cardiaques par une méthode d'un système à deux phases aqueuses, les intégrines sont localisées majoritairement au niveau des membranes en se servant du complexe intégrine-échistatine. De plus, les intégrines ont été localisées grâce à l'immunocytochimie aux foyers d'adhésion.

Des études effectuées par immunobuvardage permettent de connaître l'interaction des intégrines envers l'échistatine suite à la formation du complexe intégrine-échistatine. Suite à une saturation des intégrines par l'¹²⁵I-échistatine, des immunobuvardages avec différents anticorps permettent de détecter les sous-unités libres qui ne sont pas impliquées dans la liaison intégrine-désintégrine. Selon notre modèle proposé, les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ et $\alpha v\beta 1$ sont saturables par l'échistatine et dans un état fonctionnel envers l'échistatine. Les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ semblent être dans un état non fonctionnel. La sous-unité $\beta 1$ serait en excès sur les membranes cellulaires ou dans la formation de complexes hétérodimériques RGD-indépendants. Une augmentation de l'expression des intégrines de la surface cellulaire est observée après une stimulation des fibroblastes cardiaques par l'angiotensine II et le TGF- β . Toutefois, l'affinité des intégrines pour l'échistatine ne change pas suite à ces stimulations. Cette étude a permis de caractériser les différents états d'activité des intégrines envers l'échistatine, selon une nouvelle approche pharmacologique qui détecte la liaison intégrine-échistatine par SDS-PAGE.

Table des Matières

SOMMAIRE	i
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTES DES ABRÉVIATIONS	ix
DÉDICACE	xi
CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION	1
1. Organisation cardiaque	2
1.1 Composition cellulaire du myocarde	2
1.2 Hypertrophie cardiaque	3
1.3 Agents hypertrophiques	5
1.3.1 Angiotensine II	6
1.3.2 Facteurs de croissance transformant- β	8
2. Interstitium cardiaque	9
2.1 Composition de la matrice extracellulaire	10
2.2 Organisation anatomique	11
2.3 Rôles des fibroblastes cardiaques	12
2.4 Composantes de la matrice extracellulaire	13
2.4.1 Collagènes	13
2.4.2 Fibronectine	15
2.4.3 Laminine	16

3. Intégrines	17
3.1 Structure des intégrines	18
3.1.1 Sous-unité α	21
3.1.2 Sous-unité β	23
3.1.3 Domaines cytoplasmiques	24
3.2 Interactions intégrine-ligand	27
3.2.1 Ligands extracellulaires et leurs sites de liaison	27
3.2.2 Les sites de liaison chez les intégrines	32
3.2.3 Rôle des cations divalents	35
3.2.4 Activation de la liaison	39
3.3 Signalisation des intégrines	39
3.3.1 Modulation de l'avidité et de l'affinité	40
3.3.2 Signalisation bidirectionnelle	42
3.3.3 Foyers d'adhésion	43
3.3.4 Voies de signalisation intracellulaire	45
3.3.5 Protéines membranaires associées aux intégrines	50
3.4 Fonctions des intégrines	52
3.5 Régulation de l'expression des intégrines	54
3.6 Désintégrines	57
3.6.1 Échistatine : outil d'étude des intégrines	60
3.6.2 Identification des intégrines sur les fibroblastes cardiaques	63
4. Hypothèse de travail	64
CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES	66
CHAPITRE 3 : RÉSULTATS	87
CHAPITRE 4 : DISCUSSION	112
CONCLUSION	124
RÉFÉRENCES	125
REMERCIEMENTS	xii

Liste des Figures

Chapitre Premier

FIGURE 1	Effets de l'angiotensine II sur les fibroblastes cardiaques.	7
FIGURE 2	Les intégrines.	20
FIGURE 3	Modèle de changements de conformation de l'intégrine régulant la liaison du ligand.	38
FIGURE 4	Modèle du foyer d'adhésion.	45
FIGURE 5	Structure de la kinase du foyer d'adhésion.	47
FIGURE 6	Voies de signalisation de l'intégrine via le complexe FAK-Src.	50
FIGURE 7	Structure de l'échistatine.	61

Chapitre 2

FIGURE 8	Étapes de la purification des membranes plasmiques de fibroblastes cardiaques.	74
----------	--	----

Chapitre 3

FIGURE 9	Dosage de l'activité des marqueurs enzymatiques sur les fractions de la purification.	89
FIGURE 10	Localisation des intégrines membranaires.	91
FIGURE 11	Localisation des sous-unités libres sur les membranes.	94
FIGURE 12	Modification de l'expression des intégrines actives $\beta 1$, $\beta 3$ et $\alpha 3$.	97
FIGURE 13	Modification de l'expression des intégrines actives $\alpha 5$, $\alpha 8$ et αv .	98
FIGURE 14	Saturation des intégrines par l'échistatine.	100
FIGURE 15	Courbes de saturation des intégrines par l'échistatine.	101
FIGURE 16	Exemple de droite Scatchard représentant l'activité de l'intégrine.	103

FIGURE 17	Détection des sous-unités libres $\beta 1$, $\beta 3$ et $\alpha 3$ lors de la saturation des intégrines par l'échistatine.	106
FIGURE 18	Détection des sous-unités libres $\alpha 5$, $\alpha 8$ et αv lors de la saturation des intégrines par l'échistatine.	107
FIGURE 19	Interaction des sous-unités dans le complexe intégrine-échistatine.	109
FIGURE 20	Localisation des intégrines ($\alpha 3$, $\alpha 5$ et αv) au niveau des foyers d'adhésion.	110
FIGURE 21	Localisation des intégrines ($\alpha 8$, $\beta 1$ et $\beta 3$) au niveau des foyers d'adhésion.	111

Chapitre 4

FIGURE 22	Modèle des différents états d'activité des intégrines RGD-dépendantes.	123-A
-----------	--	-------

Liste des Tableaux

Chapitre Premier

TABLEAU 1	Composantes de la matrice extracellulaire.	11
TABLEAU 2	Protéines intracellulaires interagissant avec les domaines cytoplasmiques des intégrines.	27
TABLEAU 3	Ligands des intégrines et leurs sites de liaison.	30

Chapitre 2

TABLEAU 4	Composition du système à deux phases.	75
-----------	---------------------------------------	----

Chapitre 3

TABLEAU 5	Affinité des intégrines à motif RGD envers l'échistatine	104
TABLEAU 6	Densité des sites	104

Liste des Abréviations

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain</i>
Akt	Également appelé protéine kinase B
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
Ang II ou AII	(Sar') Angiotensine II
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT-1	Récepteur à l'angiotensine II de type 1
bFGF	Facteur de croissance basique du fibroblaste
BSA	Albumine de sérum bovin
C3G	<i>CRK SH3-binding GNP</i>
Cas	<i>Crk-associated-substrate</i>
CIB	<i>Calcium- and integrin-binding protein</i>
CRK	<i>CT10 regulator of kinase</i>
CSK	<i>C-Src kinase</i>
Ctl	Contrôle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECM	Matrice extracellulaire
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Facteur de croissance épidermique
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	Kinase du foyer d'adhésion
FAT	<i>Focal adhesion targeting</i>
FBS	Sérum bovin fœtal
G6P	Glucose-6-phosphate
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein-2</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid
IAP	Protéine associée à l'intégrine

ICAM	Molécule d'adhésion intracellulaire
ICAP-1	<i>Integrin cytoplasmic-domain-associated protein-1</i>
IGF	Facteur de croissance insulino-mimétique
IL	Interleukine
ILK	Kinase associée à l'intégrine
IFN	Interféron
INT	Chlorure d'iodonitrotétrazolium
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
MAdCAM	<i>Mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MIDAS	<i>Metal ion-dependent adhesion site</i>
MMP	Métalloprotéase de la matrice
MT-MMP	Métalloprotéase de la matrice de type membranaire
NGS	<i>Normal goat serum</i> , sérum de chèvre
NP-40	Nonidet P-40
OPN	Ostéopontine
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAI	Inhibiteur de l'activateur du plasminogène
PBS	Tampon phosphate salin
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PEG	Polyéthylène glycol
P _i	Phosphate inorganique
PI-3K	Kinase phosphatidyl-3-inositide
PM	Membrane plasmique
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
PY	Tyrosine phosphorylée
Rac	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Rap1	<i>Repressor/activator site binding protein</i>
Ras	<i>Retrovirus-associated DNA sequences</i>
RGD	Arginine-Glycine-Aspartate
RMN	Résonance magnétique nucléaire

Liste des Abréviations

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase domain</i>
Akt	Également appelé protéine kinase B
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
Ang II ou AII	(Sar') Angiotensine II
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT-1	Récepteur à l'angiotensine II de type 1
bFGF	Facteur de croissance basique du fibroblaste
BSA	Albumine de sérum bovin
C3G	<i>CRK SH3-binding GNP</i>
Cas	<i>Crk-associated-substrate</i>
CIB	<i>Calcium- and integrin-binding protein</i>
CRK	<i>CT10 regulator of kinase</i>
CSK	<i>C-Src kinase</i>
Ctl	Contrôle
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ECM	Matrice extracellulaire
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	Facteur de croissance épidermique
Erk	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	Kinase du foyer d'adhésion
FAT	<i>Focal adhesion targeting</i>
FBS	Sérum bovin foetal
G6P	Glucose-6-phosphate
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein-2</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid
IAP	Protéine associée à l'intégrine

Dédicace

À mes parents et mon frère,

*Pour leurs encouragements et leur présence
continue dans toutes mes réalisations.*

À Yannick,

Pour son amour, sa joie de vivre, sa générosité et sa patience.

À Sandrine,

Pour sa précieuse amitié.

CHAPITRE PREMIER:

Introduction

Chapitre Premier : Introduction

1. Organisation cardiaque

1.1 Composition cellulaire du myocarde

Plusieurs types cellulaires sont retrouvés au niveau du myocarde cardiaque, d'où leur importance fonctionnelle dans la composition des tissus musculaires et vasculaires et l'espace interstitiel. Les cardiocytes occupent 75% de la masse cardiaque mais constituent seulement le tiers de la population cellulaire (Frank et Langer, 1974; Zak, 1973). Les cardiocytes forment le muscle cardiaque qui est la composante contractile du myocarde.

Les fibroblastes cardiaques représentent 90% des cellules non-myocytaires (Eghbali, 1992). Localisés entre les cardiocytes dans l'interstitium cardiaque, les fibroblastes sont responsables de la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire cardiaque. Entre autres, les collagènes de type I et de type III sont les protéines structurales majeures du myocarde (MacKenna *et al*, 2000; Borg *et al*, 1996; Eghbali, 1992). Afin d'interagir avec leur environnement, les fibroblastes cardiaques expriment à leur surface une grande variété d'intégrines incluant $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 1$ et peut-être $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 5$ et $\alpha v\beta 6$ (MacKenna *et al*, 1998). Les cellules endothéliales et vasculaires lisses, ainsi

que les macrophages, mastocytes et autres cellules occupent seulement 10% de la population cellulaire de l'espace interstitiel cardiaque (Eghbali, 1992; Weber et Brilla, 1991).

1.2 Hypertrophie cardiaque

L'hypertrophie est un processus qui peut survenir notamment en adaptation suite à une surcharge hémodynamique (Ruwhof et van der Laarse, 2000). Le développement de l'hypertrophie cardiaque peut être bénéfique dû à l'augmentation du nombre d'éléments contractiles et la réduction du stress de la paroi ventriculaire. Toutefois, l'adaptation a ses limites et peut mener à une chute de la fonction cardiaque. Selon Weber et Brilla (1991), le remodelage du myocarde lors d'une hypertrophie cardiaque est basée sur la proportionnalité de la croissance cellulaire dans les compartiments musculaire, vasculaire et interstitiel.

Le remodelage du myocarde hypertrophié consiste en une accumulation de fibres de collagène de types I et III suite à la prolifération des fibroblastes cardiaques et à l'augmentation de la synthèse du collagène myocardial (Weber et Brilla, 1991). Chez les fibroblastes cardiaques, il y a une apparition du phénotype de myofibroblaste par la présence de l'actine sarcomérique et une production des protéines de la matrice extracellulaire (Hsueh *et al*, 1998).

L'hypertrophie des cardiocytes est caractérisée par la croissance de la taille de la cellule causant un épaississement de la paroi du myocarde (Weber et Brilla, 1991). Cette hypertrophie est due à une altération de l'expression de gènes. En effet, des changements ont été observés chez les cardiocytes lors du développement de l'hypertrophie cardiaque: l'expression précoce et immédiate de proto-oncogènes (*c-fos*, *c-jun* et *c-myc*) et la ré-expression de gènes foétaux (α -actinine squelettique, ANP et β -MHC) (Ruwhof et van der Laarse, 2000; Hsueh *et al*, 1998).

L'hypertrophie pathologique se décrit par une accumulation anormale de collagène (fibrose) contribuant à une rigidité musculaire de la paroi ventriculaire et une dysfonction de la pompe cardiaque. Une accumulation progressive de fibres de collagène peut mener à un dysfonctionnement ventriculaire (Weber et Brilla, 1991). Le dépôt de fibres de collagène peut se manifester sous différentes formes: *i*) la fibrose interstitielle réactive consiste en des fibres de collagène épaisses retrouvées dans l'espace extracellulaire précédemment dépourvu de collagène; *ii*) la fibrose périvasculaire réactive est l'accumulation de collagène au niveau des artères coronaires et artérioles intramyocardiales; et *iii*) la fibrose réparative représente la cicatrisation microscopique par du tissu collagèneux suite à la nécrose des cardiocytes (Pelouch *et al*, 1993; Weber et Brilla, 1991).

La réponse hypertrophique peut être obtenue par des signaux intracellulaires via deux mécanismes possibles: (i) les intégrines et le cytosquelette, et (ii) les protéines du sarcolemme (phospholipases C et D, protéine kinase C, canaux ioniques et les échangeurs d'ions). Les voies de signalisation pouvant être impliquées sont notamment: (i) la voie de la MAP (*mitogen-activated protein*) kinase et (ii) la voie JAK/STAT. Par ces mécanosenseurs et voies de signalisation, le stress mécanique peut stimuler la modulation de l'expression des gènes et la synthèse de protéines (Ruwhof et van der Laarse, 2000; Bishop et Lindahl, 1999;).

1.3 Agents hypertrophiques

Le stress mécanique semble être le stimulus primaire de l'hypertrophie cardiaque. De plus, l'implication indirecte de facteurs de croissance et hormones est étudiée suite à un stress hémodynamique. En effet, les cardiocytes, les fibroblastes cardiaques, les cellules endothéliales et vasculaires lisses peuvent sécréter ces facteurs de croissance dans l'interstitium cardiaque, suite à un stimulus mécanique. Les facteurs pouvant jouer un rôle majeur dans l'hypertrophie cardiaque incluent l'angiotensine II et le facteur de croissance transformant- β (Ruwhof et van der Laarse, 2000).

1.3.1 Angiotensine II

Plusieurs études ont démontré que l'angiotensine II peut avoir plusieurs effets directs et indirects sur le système cardiovasculaire (Lee A.A. *et al*, 1995). L'angiotensine II peut causer indirectement l'hypertrophie des cardiocytes en stimulant la production d'endothéline-1 chez les cellules endothéliales, et la sécrétion de norépinéphrine des terminaisons nerveuses cardiaques (Hsueh *et al*, 1998).

En stimulant l'expression des intégrines, de protéines d'adhésion comme l'ostéopontine, et de l' α -actinine, une protéine du cytosquelette, l'angiotensine II est impliquée dans l'adhésion des fibroblastes cardiaques avec la matrice extracellulaire. De plus, l'Ang II augmente la production de TGF- β , connu pour stimuler la synthèse de protéines d'adhésion, et l'expression de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), qui empêche la dégradation de la matrice extracellulaire en bloquant l'activité des métalloprotéases (Figure 1) (Kawano *et al*, 2000a; Kawano *et al*, 2000b; Ruwhof et van der Laarse, 2000; Schnee et Hsueh, 2000; Hsueh *et al*, 1998).

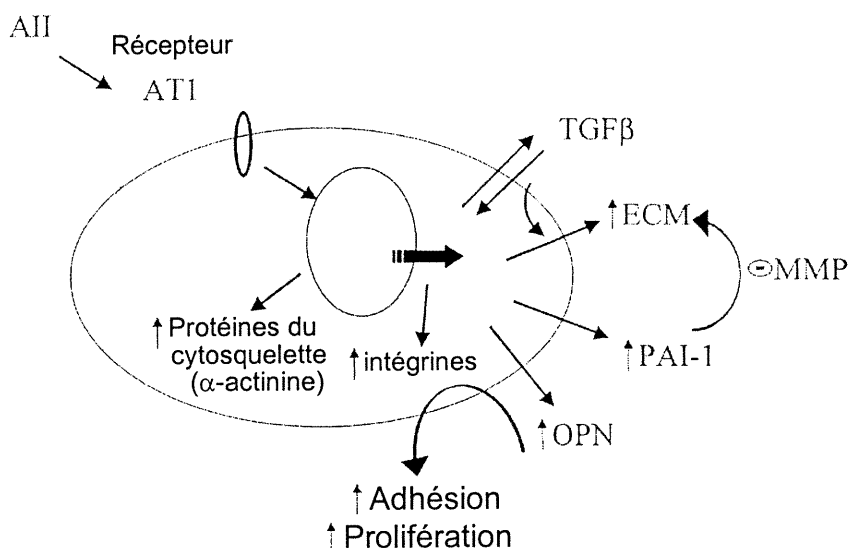


Figure 1: Effets de l'angiotensine II sur les fibroblastes cardiaques. D'après Schnee et Hsueh (2000).

Ainsi, l'angiotensine II joue un rôle dans la fibrose interstitielle au niveau du cœur, suite à une augmentation de la prolifération des fibroblastes cardiaques, de la production de protéines extracellulaires et de l'adhésion des fibroblastes avec la matrice extracellulaire (Kawano *et al*, 2000a). L'hyperplasie des fibroblastes cardiaques et la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire sont médiées par les récepteurs AT-1 retrouvés à la surface des fibroblastes cardiaques. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) et les bloqueurs des récepteurs AT-1 atténuent la fibrose cardiaque (Kawano, 2000b; Schnee et Hsueh, 2000).

1.3.2 Facteurs de croissance transformant- β

Parmi la famille des cytokines, le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) est une molécule ubiquitaire ayant plusieurs effets régulateurs sur les cellules. Trois isoformes de TGF- β sont exprimés chez les mammifères (TGF- β_1 , TGF- β_2 et TGF- β_3) (Border et Noble, 1994). Omniprésent, TGF- β_1 est sécrété par les cellules sous une forme latente. L'activation du TGF- β_1 se fait par un clivage protéolytique avec des protéases comme la plasmine, ou dans des conditions dénaturantes (Munger *et al*, 1997).

TGF- β semble être impliqué dans le développement de l'hypertrophie cardiaque. TGF- β augmente l'expression de l'ARNm pour le collagène de types I et III, suivi de la déposition des protéines de collagène par les fibroblastes cardiaques (Ruwhof et van der Laarse, 2000; Lee A.A. *et al*, 1995; Eghbali, 1992). TGF- β peut stimuler la production de l'ostéopontine chez les fibroblastes cardiaques de rats en culture (Hsueh *et al*, 1998). Chez les fibroblastes cardiaques humains, il a été démontré que TGF- β augmente la transcription du collagène de type I et les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs) (Chua *et al*, 1991). Ainsi, TGF- β joue un rôle dans la synthèse de la matrice extracellulaire. De plus, TGF- β semble participer à la production de protéines de la matrice extracellulaire, déclenchée par la présence de l'angiotensine II (Kawano *et al*, 2000b; Hsueh *et al*, 1998). Sigel *et al* (1996) ont montré que la prolifération des fibroblastes cardiaques est contrôlée par TGF- β . TGF- β induit

également la modulation phénotypique des fibroblastes cardiaques suite à l'observation de caractéristiques morphologiques des cardiocytes comme la présence de l'actine sarcomérique.

2. Interstitium cardiaque

L'interstitium cardiaque est l'organisation complexe des diverses macromolécules de la matrice extracellulaire en un arrangement tridimensionnel parmi les composantes cellulaires du myocarde (Borg *et al*, 1996; Lin et Bissel, 1993). La matrice extracellulaire du myocarde est une structure de soutien pour les cellules cardiaques et le réseau vasculaire (Weber et Brilla, 1991; Weber, 1989). L'interaction dynamique des composantes cellulaires avec l'interstitium est en réponse à l'information de l'environnement extracellulaire durant le développement, l'homéostasie normale et les pathologies (Borg *et al*, 1996). La matrice extracellulaire participe au cycle cardiaque lors des phases de contraction et relaxation, par la transmission de la force contractile, générée par les cardiocytes, à la chambre ventriculaire (Pelouch *et al*, 1993; Weber et Brilla, 1991).

2.1 Composition de la matrice extracellulaire

Les composantes majeures de la matrice extracellulaire sont des protéines structurales, des molécules d'adhésion et d'anti-adhésion cellulaires et les protéoglycans. Les protéines fibreuses comme les collagènes et l'élastine ont un rôle structural dans l'organisation et le support des cardiocytes et autres composantes du myocarde. Des glycoprotéines comme la fibronectine et la laminine jouent un rôle important dans la fonction cardiaque au niveau de l'adhésion cellulaire. Les protéoglycans sont des macromolécules avec des chaînes latérales de glycosaminoglycanes. Les protéoglycans aident l'hydratation de la matrice extracellulaire et agissent comme lubrifiant pour les éléments contractiles des cardiocytes. Les molécules de la matrice extracellulaire interagissent ensemble et avec leurs récepteurs spécifiques sur la surface des cellules. De plus, des cytokines, des facteurs de croissance et des protéases sont retrouvés dans l'interstitium pour la régulation de la matrice extracellulaire (Tableau 1) (Borg *et al*, 1996; Ju et Dixon, 1996).

Tableau 1: Composantes de la matrice extracellulaire. D'après Borg (1996).

Collagènes	Collagènes interstitiels Membrane basale
Glycoprotéines non-collagèneuses	Collagènes non-fibreux Fibronectine Laminine Tenascine Entactine
Protéoglycans	Sulfate de chondroïtine Sulfate d'héparan Hyaluronate Sulfate de dermatan
Facteurs de croissances	IGF-1 bFGF TGF- β PDGF
Protéases	Métalloprotéases Protéases à sérine Protéases à cystéine

2.2 Organisation anatomique

L'arrangement tridimensionnel du collagène au niveau de la matrice extracellulaire est définie par la présence de l'épimysium, le péricardium et l'endomysium. L'épimysium est la matrice collagèneuse qui entoure le myocarde, le long des couches épocardiale et endocardiale. Les fibres du péricardium traversent le myocarde entre les faisceaux musculaires. Ces fibres de collagène forment un réseau péricardial qui entoure et regroupe les fibres musculaires en faisceaux. L'endomysium est une invagination du péricardium qui enveloppe individuellement chaque cardiocyte. Des prolongements de l'endomysium relient les cardiocytes les uns aux autres et aux capillaires

voisins. L'endomysium forme le site de contact entre la matrice extracellulaire et les cardiocytes (Pelouch *et al*, 1993; Weber *et al*, 1994; Weber, 1989).

2.3 Rôles des fibroblastes cardiaques

Les fibroblastes cardiaques ont une grande implication dans la composition de la matrice extracellulaire. Les fibroblastes cardiaques participent à la synthèse et à la déposition des composantes de la matrice extracellulaire. En effet, le fibroblaste est la principale cellule cardiaque responsable de la production des molécules de la matrice extracellulaire, en particulier le collagène de types I et III et la fibronectine (Borg *et al*, 1996; Weber, 1989). De plus, les fibroblastes cardiaques synthétisent et libèrent des enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéases, pour la dégradation et l'équilibre de l'environnement extracellulaire (Borg *et al*, 1996). Finalement, les fibroblastes cardiaques peuvent synthétiser et libérer plusieurs facteurs de croissance ayant un rôle dans le remodelage du cœur. Ainsi, les fibroblastes cardiaques sont la source des facteurs autocrines et paracrines dans le myocarde tels que l'endothéline-1, le TNF- α et l'angiotensine II (MacKenna *et al*, 2000).

2.4 Composantes de la matrice extracellulaire

2.4.1 Collagènes

Cinq isoformes de collagènes sont présentes dans le tissu cardiaque: collagènes de types I, III, IV, V et VI (Ju et Dixon, 1996). L'ARN messager du collagène de types I et III a été détecté seulement chez les cellules non-myocytaires, principalement les fibroblastes cardiaques. Les cardiocytes et les fibroblastes cardiaques contiennent l'ARN messager du collagène de type IV (Eghbali *et al*, 1992). Le collagène myocardial est relativement insoluble, probablement à cause des nombreuses liaisons covalentes inter- et intramoléculaires (Ju et Dixon, 1996; Iimoto *et al*, 1988). Les collagènes de type I et de type III sont des protéines fibreuses retrouvées en abondance (90%) dans le myocarde normal et pathologique (Ju et Dixon, 1996). Ces collagènes sont distribués parmi les cardiocytes et les fibres musculaires du myocarde. Le collagène de type I a une force de tension comparable à l'acier et se forme en agrégats de fibres épaisses. Le collagène de type I compose 75% du collagène total présent dans le myocarde adulte. Le collagène de type III se caractérise en fibres minces, réticulées et élastiques (Ju et Dixon, 1996; Weber et Brilla, 1991). Lors du développement de l'hypertrophie cardiaque et la fibrose, des changements se produisent dans la composition du réseau de collagène. Une augmentation du collagène de type III observé chez le modèle animal, suivie d'une importante augmentation maintenue du collagène de type I

sont les caractéristiques de la réparation tissulaire (Bishop et Lindahl, 1999). Le collagène cardiaque joue un rôle primordial dans le maintien de la structure myocardiale et dans la fonction contractile du cœur. Le réseau de collagène permet le support et l'alignement des cardiocytes, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Ainsi, la rigidité du myocarde et la géométrie des chambres ventriculaires sont maintenues. Les fibres de collagène sont également impliquées dans la transduction de la force contractile produite par les cardiocytes, la prévention du glissement des cardiocytes et des fibres musculaires, et la protection contre l'étirement excessif des cardiocytes (Ju et Dixon, 1996; Weber *et al*, 1994). Les collagènes de types IV, V et VI constituent seulement 10% de la totalité du collagène cardiaque. Le collagène de type IV se localise au niveau de la membrane basale des cardiocytes et des fibroblastes cardiaques. Le collagène de type IV forme un filet lâche dans la membrane basale où il interagit avec la laminine (Pelouch *et al*, 1993). Le collagène de type IV est une composante structurale importante et joue un rôle dans la régulation du transport moléculaire et l'adhésion cellulaire (Ju et Dixon, 1996). Le collagène de type V forme des fibres minces et se trouve en association avec les cellules musculaire lisses et les vaisseaux sanguins. Le collagène de type V se co-localise avec le collagène de type IV au niveau des membranes basales et il est également dispersé dans le myocarde (Ju et Dixon, 1996). Le collagène de type VI se retrouve sous forme de filaments minces, orientés à 90° des fibres de collagènes de l'espace interstitiel (Pelouch *et al*, 1993).

2.4.2 Fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine dimérique retrouvée à travers l'interstitium cardiaque, surtout autour du tissu vasculaire (Ju et Dixon, 1996; Pelouch *et al*, 1993). Dans le cœur de rat nouveau-né et adulte, la distribution de la fibronectine est sous une forme réticulée et suggère un réseau péricellulaire où la fibronectine est localisée dans l'espace interstitiel autour des cardiocytes (Mamuya et Brecher, 1992). Dans le système cardiovasculaire, la fibronectine est synthétisée par plusieurs types cellulaires, sauf les cardiocytes (Farhadian *et al*, 1995). Suite à la transcription d'un seul gène, l'épissage alternatif de l'ARNm permet la formation de différentes isoformes de fibronectine présents dans le tissu cardiaque (Ju et Dixon, 1996; Mamuya et Brecher, 1992). Au niveau de la matrice extracellulaire, la fibronectine est un complexe insoluble, après la polymérisation de dimères sécrétés localement ou de dimères solubles circulants synthétisés par le foie (Farhadian *et al*, 1995). La fibronectine est composée des séquences répétitives de types I, II et III. Chacune de ces séquences est un site de liaison pour les autres constituants de la matrice extracellulaire comme les collagènes, l'héparine, la fibrine et les protéoglycans. De plus la fibronectine peut se lier à des récepteurs spécifiques sur les membranes cellulaires comme les intégrines. Ainsi, cette protéine sert de pont protéique entre la surface cellulaire des cardiocytes et la matrice extracellulaire (Ju et Dixon, 1996; Farhadian *et al*, 1995; Pelouch *et al*, 1993; Mamuya et Brecher, 1992). Ces interactions peuvent moduler l'orientation des fibres de

collagène dans le milieu interstitiel parmi les cardiocytes et influencer les propriétés structurales et mécaniques de la matrice et le phénotype de la cellule adhérente (Mamuya et Brecher, 1992). Ces interactions au niveau de la matrice extracellulaire permettent également à la fibronectine de participer à plusieurs événements biologiques tels que l'adhésion cellulaire, la migration cellulaire et la cicatrisation (Farhadian *et al*, 1995; Mamuya et Brecher, 1992).

2.4.3 Laminine

La laminine est une protéine majeure au niveau de la membrane basale, avec le collagène de type IV. La laminine est une glycoprotéine composée de trois sous-unités: une chaîne A de 400 kDa et deux chaînes B homologues de 200 kDa. La laminine cardiaque se localise dans la membrane basale des cardiocytes et des fibroblastes où elle peut lier les collagènes de types I, III et IV (Ju et Dixon, 1996; Pelouch *et al*, 1993). Dans le cœur adulte, la laminine se situe le long de la membrane basale et se retrouve en quantité abondante dans les zones morphologiques spécialisées des bandes Z sarcomériques et autour des agrégats de collagène qui sont en contact avec la membrane sarcolemmale (Price *et al*, 1992). Présente dans la membrane basale, la laminine est impliquée dans l'adhésion, la migration, la croissance et la différenciation cellulaires (Ju et Dixon, 1996; Price *et al*, 1992).

3. Intégrines

La cellule a la capacité de lier des ligands protéiques cellulaires et les protéines de la matrice extracellulaire grâce aux intégrines exprimées à leur surface. Les intégrines forment une famille de glycoprotéines hétérodimériques composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Hynes, 1992). Jusqu'à ce jour, 18 sous-unités α et huit sous-unités β ont été identifiées. Ces sous-unités interagissent de manière non-covalente pour former 24 combinaisons différentes (Figure 2A) (Ivaska et Heino, 2000). La diversité des intégrines s'élargit avec l'épissage alternatif, les modifications post-translotionnelles et les interactions avec des molécules intracellulaires et de la surface cellulaire (Plow *et al*, 2000). Les intégrines sont exprimées sur une grande variété de cellules, et la plupart des cellules expriment plusieurs intégrines. Chaque intégrine peut interagir avec différents ligands et chaque ligand peut être reconnu par plusieurs intégrines (Hynes, 1992). La terminologie du terme "intégrine" désigne un récepteur qui *intègre* la matrice extracellulaire avec le cytosquelette intracellulaire (Hynes, 1987). Ainsi, les intégrines permettent le transfert bidirectionnel de l'information à travers la membrane plasmique, participant alors à la signalisation cellulaire (Humphries et Newham, 1998). L'intégrine joue un rôle crucial dans de nombreux processus physiologiques dont l'adhésion cellulaire, la prolifération, la croissance, la mobilité et la différenciation (Hynes 1992). Comme elles participent également dans la pathogenèse de plusieurs

maladies, les intégrines deviennent des cibles intéressantes pour l'intervention thérapeutique (Buckley et Simmons, 1997; Horton, 1996).

3.1 Structure des intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires composés d'une sous-unité α (120-180 kDa) et d'une sous-unité β (90-110 kDa). Ces sous-unités sont les produits de deux gènes différents et chaque sous-unité est nécessaire pour l'expression d'un récepteur fonctionnel sur la surface cellulaire (O'Toole *et al*, 1989). En général, une sous-unité α s'associe avec une sous-unité β particulière, alors que les sous-unités β forment des complexes avec différentes sous-unités α (Figure 2A). Il existe des exceptions incluant $\alpha 4$, qui lie $\beta 1$ et $\beta 7$, et αv s'associe avec $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$, $\beta 6$ et $\beta 8$ (Berman et Kozlova, 2000; Curley *et al*, 1999; Hynes, 1992). Les sous-unités α et β sont divisées en trois domaines: un grand domaine extracellulaire N-terminal, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique C-terminale (Figure 2B) (Berman et Kozlova, 2000; Bitan *et al*, 2000, Tozer *et al*, 1996). Le domaine extracellulaire de chaque sous-unité comprend plus de 90% de la molécule, avec 1000-1150 acides aminés pour la sous-unité α et 740-780 acides aminés pour la sous-unité β . Le domaine transmembranaire est représenté par une séquence de 20 à 30 résidus. Le domaine cytoplasmique de la sous-unité α comprend 20 à 30 acides aminés, alors que la sous-unité β est composée de 40 à 50 résidus

(Curley *et al*, 1999). Le domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 4$ est l'exception avec plus de 1000 acides aminés (Suzuki et Naitoh, 1990). L'analyse des intégrines par microscopie électronique montre une tête globulaire qui comprend les deux sous-unités, et deux queues qui se prolongent jusqu'à la membrane plasmique (Nermut *et al*, 1988; Carrell *et al*, 1985). Le globule est le repliement de la partie N-terminale par la formation de ponts disulfures intrapeptidiques (Calvete *et al*, 1991, 1989). À cause de leurs dimensions, les intégrines ne permettent pas une étude directe de leur structure par des méthodes de haute résolution comme la cristallographie par rayons X et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Toutefois, la caractérisation structurale des intégrines a été réalisée indirectement par des méthodes de faible résolution comme l'analyse mutationnelle, la création de récepteurs chimériques et de mutants comprenant des délétions, la caractérisation biologique de peptides dérivant de sites de liaison putatifs, et les anticorps activateurs et inhibiteurs (Bitan *et al*, 2000).

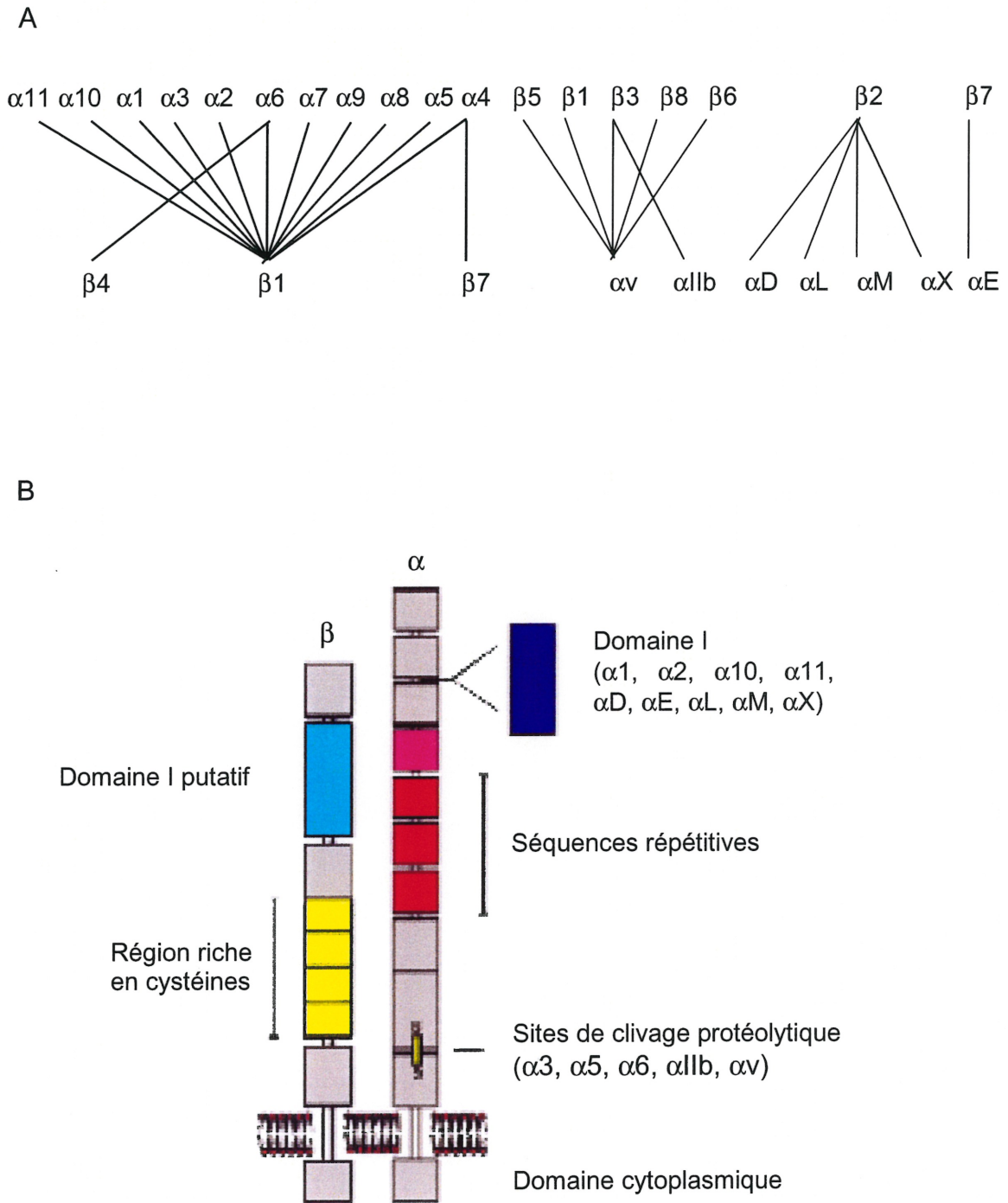


Figure 2: Les intégrines : Jusqu'à présent 24 intégrines sont connues (A). Représentation schématique de la structure des hétérodimères α/β (B). D'après Ivaska et Heino (2000) et Mould (1996).

3.1.1 Sous-unité α

Toutes les sous-unités α possèdent sept séquences répétitives localisées en tandem dans la partie N-terminale (Figure 2B). Ces répétitions comprennent environ 60 acides aminés, arrangés en un feuillet β de quatre brins β antiparallèles. Selon un modèle proposé, les feuillets β du N-terminal forment une structure en tonneau β (Springer, 1997). Les répétitions 4-7 (ou 5-7 pour certaines intégrines) contiennent des sites de liaison de métaux pour les cations divalents. Ces sites sont représentés par la séquence DxDxDGxxD (x est pour n'importe quel acide aminé), semblable à un motif EF chez les protéines liant le calcium comme la calmoduline (Curley *et al*, 1999; Mould, 1996; Tuckwell *et al*, 1992). Dans le modèle du tonneau β , les sites de liaison pour le ligand se situent sur la face supérieure de l'hélice, alors que les sites pour le calcium sont prédits d'être sur la face inférieure, suggérant un rôle indirect des cations dans la liaison de l'intégrine avec le ligand (Oxvig et Springer, 1998).

Les sous-unités α peuvent être divisées en deux groupes: *i*) les sous-unités α qui contiennent un site de clivage protéolytique et *ii*) les sous-unités α avec un domaine *inséré*, le domaine I (Figure 2B). Certaines sous-unités α sont clivées pour donner un domaine transmembranaire de 25-30 kd lié par un pont disulfure à un large domaine extracellulaire. Ce site de clivage protéolytique

post-transcriptionnel est retrouvé chez les intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 11b$ et αv (Fernandez *et al*, 1998; Hynes 1992).

Retrouvé dans la partie N-terminale, le domaine I est long d'environ 200 acides aminés et est homologue au domaine A3 du facteur von Willebrand (Bienkowska *et al*, 1997). Le domaine I se situe entre les deuxième et troisième séquences répétitives (Curley *et al*, 1999; Mould, 1996). Neuf sous-unités α possèdent un domaine I, soient $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 10$, $\alpha 11$, αD , αE , αL , αM et αX (Emsley *et al*, 2000). Le domaine I isolé imite l'activité de liaison du ligand de l'intégrine intacte (Tuckwell *et al*, 1995; Muchowski *et al*, 1994; Rieu *et al*, 1994; Ueda *et al*, 1994). Ceci suggère que pour les intégrines possédant un domaine I, la liaison du ligand est surtout médiée par le domaine I (Calderwood *et al*, 1997; Champe *et al*, 1995; Huang et Springer, 1995; Kamata et Takada, 1994). Le domaine I forme un repliement Rossmann et contient un motif MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) qui est un site de liaison pour un seul cation (Dickeson et Santoro, 1998; Lee J.O. *et al*, 1995). Le cation est coordonné directement ou indirectement via une molécule d'eau avec trois acides aminés retrouvés dans la séquence DxSxS et deux résidus distants, une thréonine et un aspartate (Curley *et al*, 1999).

3.1.2 Sous-unité β

L'homologie entre les différentes sous-unités β est de 40-50% (Tozer *et al*, 1996). La sous-unité β se caractérise par une région riche en cystéines composée de quatre domaines reliés par un pont disulfure (Green *et al*, 1998; Mould, 1996; Tozer *et al*, 1996; Hynes, 1992). La région riche en cystéines est localisée en C-terminal du domaine extracellulaire, près de la membrane plasmatique. Une région hautement conservée d'environ 200 acides aminés est retrouvée dans la partie N-terminale chez différentes sous-unités β . Selon des analyses d'hydropathicité, cette région conservée a une structure similaire au facteur von Willebrand et au domaine I des sous-unités α (Figure 2B) (Lee J.O. *et al*, 1995). Le domaine I présumé de la sous-unité β contient la séquence DxSxS retrouvée dans le domaine I de la sous-unité α et impliquée dans la coordination du cation (Lee J.O. *et al*, 1995). Les autres résidus nécessaires pour cette coordination sont également conservés chez les sous-unités β_1 , β_2 , β_3 et β_5 (Lin *et al*, 1997; Puzon-McLaughlin et Takada, 1996; Bajt *et al*, 1995; Loftus *et al*, 1990). Le domaine I présumé de la sous-unité β est impliqué dans la liaison de l'intégrine avec un ligand et un cation (Green *et al*, 1998; Loftus *et al*, 1994; Takada et Puzon, 1993).

3.1.3 Domaines cytoplasmiques

N'ayant aucune activité enzymatique, les domaines cytoplasmiques α et β des intégrines semblent jouer un rôle dans la modulation de l'affinité de l'intégrine (Juliano, 1994). La signalisation intracellulaire peut générer un changement de conformation des domaines cytoplasmiques aux domaines extracellulaires pour une liaison de haute affinité avec le ligand. Des séquences conservées sont retrouvées dans les domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β de toutes les intégrines. Les domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β ont une organisation similaire avec des séquences polaires et non-polaires. Localisées à quelques acides aminés du domaine transmembranaire, ces séquences conservées du domaine cytoplasmique des sous-unités α et β sont GFFKR et LLv-iHDR, respectivement (Hughes *et al*, 1996; Tozer *et al*, 1996). Des mutations et délétions de ces séquences chez la sous-unité α ou β causent une activation de l'intégrine, bloquant l'intégrine dans un état de haute affinité (Peter et Bode, 1996; Hughes *et al*, 1996, 1995; Crowe *et al*, 1994; O'Toole *et al*, 1994, 1991). Cet état actif est indépendant du type cellulaire et du métabolisme de la cellule. Cette capacité qu'ont les séquences proximales à contrôler l'affinité des intégrines peut dépendre d'une interaction entre elles contraignant l'intégrine à un état de faible affinité. L'association entre la séquence GFFKR de la sous-unité α et la séquence LLv-iHDR de la sous-unité β a été étudiée par mutagenèse avec l'intégrine α IIb β 3. La formation d'un pont salin entre l'arginine

de la sous-unité α et l'aspartate de la sous-unité β des séquences précédentes a été proposée pour le maintien de l'activité de l'intégrine (Hughes *et al*, 1996).

Selon plusieurs études, des séquences en C-terminal du domaine cytoplasmique sont nécessaires pour l'activation physiologique des intégrines. En effet, la délétion de séquences en C-terminal du motif GFFKR dans le domaine cytoplasmique des sous-unités α_2 , α_4 , α_6 et α_v inhibe l'adhésion cellulaire (Tozer *et al*, 1996). Les motifs conservés NPxY et TTT du domaine cytoplasmique des sous-unités β sont impliqués dans des événements qui suivent l'occupation du récepteur par un ligand comme la formation de foyers d'adhésion (Sugimori *et al*, 1997). L'adhésion cellulaire est réduite suite aux mutations d'un de ces motifs affectant la formation des foyers d'adhésion (Filardo *et al*, 1995; O'Toole *et al*, 1995).

Les domaines cytoplasmiques des intégrines peuvent interagir directement ou indirectement avec des protéines intracellulaires comme les protéines cytoplasmiques et les protéines du cytosquelette (Tableau 2). Les protéines liant le calcium comme la calréticuline, la calcineurine, la calmoduline et le CIB s'associent avec les intégrines (Kwon *et al*, 2000; Naik *et al*, 1997). La calréticuline se lie avec le motif GFFKR de la sous-unité α et stabilise la conformation active de l'intégrine (Rojiani *et al*, 1991). La protéine ICAP-1 interagit avec le motif NPxY du domaine cytoplasmique de la sous-unité β_1 (Chang *et al*, 1997). La protéine β_3 -endonexine se lie avec le motif NITY

retrouvé dans le domaine cytoplasmique de la sous-unité $\beta 3$ et module l'affinité de l'intégrine plaquettaire $\alpha IIb\beta 3$ (Eigenthaler *et al*, 1997; Kashiwagi *et al*, 1997; Shattil *et al*, 1995). Le motif TTT se situe dans la région qui contient un site de liaison pour ILK au niveau du domaine cytoplasmique des sous-unités $\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 3$ (Hannigan *et al*, 1996).

Les protéines du cytosquelette incluant l' α -actinine, F-actine, filamine, paxilline, taline, tensine et vinculine s'associent de manière directe ou indirecte aux queues cytoplasmiques, participant à la formation de foyers d'adhésion (Fernandez *et al*, 1998). Le motif NPxY semble être impliqué dans l'interaction de la taline et l' α -actinine avec le domaine cytoplasmique β (Pfaff *et al*, 1998; Otey *et al*, 1993).

Tableau 2: Protéines intracellulaires interagissant avec les domaines cytoplasmiques des intégrines. D'après Hemler (1998).

	Protéines	Intégrine
Protéines cytoplasmiques	Taline	$\beta 1, \beta 1A, \beta 1D, \alpha IIb\beta 3$ (motif NPxY)
	α -actinine	$\beta 1, \beta 2$ (motif NPxY)
	Filamine	$\beta 1A, \beta 1D, \beta 2, \beta 7$
	Paxilline	$\beta 1$
	Actine	$\alpha 2$
Protéines du cytosquelette	Cytohésine	$\beta 2$
	FAK	$\beta 1$
	ILK	$\beta 1$ (motif TTT)
	$\beta 3$ -endonexine	$\beta 3$ (motif NITY)
	ICAP-1	$\beta 1A$ (motif NPxY)
	CIB	αIIb
	Calréticuline	queues $\alpha, \alpha 6\beta 1$ (motif GFFKR)

3.2 Interactions intégrine-ligand

3.2.1 Ligands extracellulaires et leurs sites de liaison

Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion pouvant se lier à une grande variété de ligands de la matrice extracellulaire et de la surface cellulaire (Tableau 3). Les intégrines peuvent accomplir leur fonction primaire, soit l'adhésion cellulaire, par une liaison avec un grand nombre de protéines de la matrice extracellulaire: fibronectine, fibrinogène, vitronectine, collagène, laminine, thrombospondine, facteur von Willebrand (Ruoslahti, 1996). De plus, les intégrines participent à des interactions cellule-cellule avec les membres de

la superfamille des immunoglobulines comme les molécules d'adhésion intracellulaires (ICAM-1, -2, -3) et les molécules d'adhésion de cellules vasculaires (VCAM-1) (Curley *et al*, 1999). Certains micro-organismes agissent comme des ligands pathogéniques envers les intégrines pour pénétrer dans la cellule (Haas et Plow, 1994). La préférence d'une intégrine parmi ses ligands est déterminée par l'affinité, la disponibilité dans un micro-environnement spécifique et la conformation du ligand, qui contrôle l'exposition de la séquence de reconnaissance (Plow *et al*, 2000).

Chez les ligands, les sites de reconnaissance impliqués dans la liaison avec l'intégrine ont été identifiés par de petits fragments protéolytiques de la molécule ou des peptides synthétiques analysés pour leur effet inhibiteur sur l'adhésion des intégrines (Curley *et al*, 1999). Par cette approche, le motif arginine-glycine-aspartate (RGD) fut d'abord identifié chez la fibronectine comme la séquence qui lie le récepteur de la fibronectine, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Pierschbacher et Ruoslahti, 1984). Depuis, ce motif RGD est retrouvé chez plusieurs ligands protéiques comme un site de reconnaissance pour différentes intégrines incluant $\alpha 11\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$ et $\alpha v\beta 8$ et, sous certaines conditions $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 1\beta 1$ (Tableau 3) (Berman et Kozlova, 2000; Plow *et al*, 2000). En plus du motif RGD, un second site commun a été identifié chez la fibronectine. La séquence LDV varie autour d'une séquence consensus L/I-D/E-S/T/V, contrairement au motif RGD qui demeure invariable (Komoriya *et al*, 1991). La séquence d'adhésion LDV

reconnue par les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$ est retrouvée chez plusieurs ligands de la surface cellulaire incluant VCAM-1, MAdCAM-1 et ICAM-1, -2 et -3 (Curley *et al*, 1999; Ruoslahti, 1996). D'autres intégrines reconnaissent différentes séquences (Tableau 3). Les motifs de reconnaissance pour les intégrines contiennent un résidu acide, l'aspartate ou la glutamate, qui peut contribuer à la liaison du cation divalent (Humphries et Newham, 1998; Ruoslahti, 1996).

La présence de séquences additionnelles localisées autour de la région RGD peut être requise pour une adhésion complète des intégrines. Une séquence Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) retrouvée chez la fibronectine agit en synergie avec le motif RGD pour la reconnaissance de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. La région synergique est reconnue par la sous-unité $\alpha 5$ au niveau des répétitions en N-terminal, alors que la sous-unité $\beta 1$ joue un rôle majeur dans la liaison de la séquence RGD (Aota *et al*, 1994). D'autres séquences synergiques se retrouvent chez différents ligands: la fibronectine possède un site reconnu par l' $\alpha 11\beta 3$ et des séquences synergiques chez la vitronectine se lient avec les intégrines $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ (Healy *et al*, 1995; Vogel *et al*, 1993; Bowditch *et al*, 1991). La liaison d'un site RGD/LDV du ligand avec la sous-unité β et la liaison d'une séquence synergique avec la sous-unité α peuvent déterminer la spécificité des interactions intégrine-ligand (Mould *et al*, 1997).

Tableau 3: Ligands des intégrines et leurs sites de liaison.

Intégrines		Ligands	Motifs de reconnaissance
β1	α1	Collagène, laminine	
	α2	Collagène, laminine	DGEA
	α3	Fibronectine, laminine, collagène, épiligrine	RGD
	α4	Fibronectine, VCAM-1	LDV
	α5	Fibronectine	RGD
	α6	Laminine	
	α7	Laminine	
	α8	Vitronectine, fibronectine, tenascine	RGD
	α9	Tenascine, collagène, laminine	
	α10	Collagène	
	α11	Collagène I	
	αv	Vitronectine, fibronectine, ostéopontine	RGD
	β2	αD	ICAM, VCAM
αL		ICAM	
αM		Fibrinogène, Facteur X, ICAM-1, ICAM-2	KRLDGS
αX		Fibrinogène	
β3	αIIb	Fibrinogène, facteur von Willebrand, fibronectine, vitronectine, thrombospondine	RGD, KQAGDV
	αv	Vitronectine, fibrinogène, fibronectine, thrombospondine, facteur von Willebrand, ostéopontine	RGD
β4	α6	Laminine	
β5	αv	Vitronectine, ostéopontine	RGD
β6	αv	Fibronectine	RGD
β7	α4	Fibronectine, VCAM-1, MAdCAM-1	EILDV
	αE	E-cadhérine	
β8	αv	Vitronectine	RGD

Les résidus avoisinants, la présentation tridimensionnelle et les sites de liaison chez l'intégrine participent à l'arrangement de la séquence RGD et permettent de déterminer si une interaction intégrine-ligand sera de haute affinité (Plow *et al*, 2000). Certains acides aminés localisés en C-terminal de la séquence RGD favorisent la liaison du ligand. Par exemple, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ préfère la présence de la glycine et la tryptophane (ou phénylalanine) suite à la séquence RGD. Cette position est occupée par la sérine ou l'alanine pour $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ et la tyrosine et l'arginine pour l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (Ruoslahti, 1996). Finalement, la séquence RGD doit se présenter sous une conformation correcte à la surface de liaison de l'intégrine. La séquence RGD doit être accessible et non cachée par la structure tertiaire ou quaternaire du ligand (Haas et Plow, 1994).

Outre les protéines de la matrice extracellulaire et de la surface cellulaire, les intégrines peuvent interagir avec les désintégrines et des ligands pathogènes. Les désintégrines sont des hémotoxines retrouvées dans le venin de serpent. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire qui contiennent un motif RGD maintenu par des ponts disulfures dans une conformation appropriée (McLane *et al*, 1998). La famille des désintégrines comporte plus de 30 protéines différentes. Ces désintégrines montrent un degré d'homologie élevé entre elles et possèdent des séquences conservées entourant le motif RGD. Les désintégrines sont capables de lier les intégrines et d'inhiber leurs fonctions. Entre autres, elles peuvent prévenir la coagulation sanguine par une liaison de haute affinité avec l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ chez les plaquettes (Gould *et al*, 1990).

Plusieurs protéines bactériennes et virales contiennent le motif RGD et servent de ligands pour permettre aux pathogènes de se lier aux intégrines et de pénétrer dans la cellule. Le nombre de micro-organismes interagissant avec les intégrines est en expansion: la protéine Tat du virus de l'immunodéficience humaine ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$), adénovirus ($\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$), échovirus-1 ($\alpha 2\beta 1$), Coxsackievirus ($\alpha v\beta 3$), *Borrelia burgdorferi* ($\alpha 11\beta 3$), *Candida albicans* ($\alpha M\beta 2$) (Plow *et al*, 2000; Ruoslahti, 1996; Haas et Plow, 1994). Grâce à l'invasine, *Yersinia pseudotuberculosis* se lie aux intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$. Cette protéine bactérienne ne contient pas de motif RGD, mais la présence de la fibronectine et de peptides RGD inhibe la liaison de l'invasine avec les intégrines (Van Nhieu et Isberg, 1991).

3.2.2 Les sites de liaison chez les intégrines

Plusieurs sites dans la région N-terminale des sous-unités α et β interagissent ensemble pour former une surface de liaison du ligand. Ces régions participant à la reconnaissance du ligand ont été déterminées par différentes approches: liaisons chimiques de ligands peptidiques, synthèse de fragments et peptides d'intégrine recombinante, anticorps monoclonaux anti-fonctionnels, balayage d'épitope, analyse de mutations naturelles et causées chez l'intégrine et la mutagenèse directionnelle (Humphries, 1996; Mould, 1996).

Trois régions de l'intégrine sont impliquées dans la liaison du ligand: les séquences répétitives de la partie N-terminale de la sous-unité α , le domaine I de la sous-unité α et le domaine I putatif de la sous-unité β (Humphries, 1996). Pour les intégrines ayant un domaine I au niveau de la sous-unité α , il a été démontré que le domaine I seul peut interagir avec un ligand d'une manière identique à l'intégrine intacte (Tuckwell *et al*, 1995; Kamata *et al*, 1994). Les ligands semblent se lier à la partie supérieure du domaine I avec la présence du motif MIDAS (Kamata *et al*, 1999; Zhang et Plow, 1997; Huang et Springer, 1995). Pour les intégrines ne possédant pas de domaine I, la spécificité de la liaison du ligand se détermine par des séquences d'acides aminés localisées au niveau des deuxième et troisième répétitions de la sous-unité α (Mould *et al*, 2000; Irie *et al*, 1995). Des peptides mimétiques de ligand se lient à la région N-terminale des sous-unités α IIb et α v (D'Souza *et al*, 1990; Smith et Cheresh, 1990). Les sites d'interaction Ala²⁹⁴-Met³¹⁴ et Gly¹⁸⁴-Gly¹⁹³ de la sous-unité α IIb semblent être importants pour la liaison du ligand (Kamata *et al*, 1996; D'Souza *et al*, 1990). Plusieurs études ont localisé des sites de liaison pour le ligand chez les sous-unités α n'ayant pas de domaine I, mais aucun consensus n'est défini (Mould *et al*, 2000). De plus, il est possible que ces résidus ne soient pas impliqués directement dans la liaison du ligand, mais agissent sur la conformation du site de reconnaissance pour le ligand (Fernandez *et al*, 1998). Une étude sur l'intégrine α 5 β 1 propose que la sous-unité β 1 soit responsable de la liaison du motif RGD, alors que la sous-unité α 5 se lie à un site de

synergie du ligand (Mould *et al*, 1997). Ainsi, un changement de conformation du récepteur est observé suite à l'interaction du ligand avec l'intégrine.

Les sites de liaison du ligand chez la sous-unité β sont restreints au domaine I présumé. Deux régions discontinues de la sous-unité $\beta 3$ contribuent à la liaison du ligand. Des peptides RGD peuvent lier la région définie par les résidus Asp¹⁰⁹-Glu¹⁷¹ (D'Souza *et al*, 1988). De plus, des anticorps monoclonaux spécifiques à cette région inhibent la liaison du ligand et l'agrégation plaquettaire (Andrieux *et al*, 1991; Calvete *et al*, 1991). La séquence entre les acides aminés Ser²¹¹ et Gly²²² est un second site potentiel pour une interaction intégrine-ligand. Les peptides correspondant à cette région peuvent lier la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène, et bloquer leur liaison avec l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (Charo *et al*, 1991). Cette région est également conservée chez les autres récepteurs, pouvant être un site de liaison critique. Des anticorps monoclonaux reconnaissent une séquence courte (résidus 207-218) du domaine I présumé de la sous-unité $\beta 1$ et inhibent la fonction de l'intégrine (Takada et Puzon, 1993).

3.2.3 Rôle des cations divalents

Les intégrines sont des métalloprotéines et la présence de cations divalents comme Ca^{2+} et Mg^{2+} est essentielle pour la reconnaissance du ligand (Bitan *et al*, 1999; Stewart et Hogg, 1996). L'implication des cations divalents est démontrée par la liaison inhibée entre l'intégrine et un ligand suite à l'ajout d'agents chelateurs comme l'EDTA. Les sites de reconnaissance pour le ligand se situent à proximité des sites pour les cations montrant une interaction étroite lors de la liaison du ligand et des cations chez l'intégrine. Toutefois, le rôle précis des cations divalents dans la liaison intégrine-ligand est toujours incertain. L'intégrine peut contenir trois à cinq sites de liaison de faible affinité (μM à mM) pour les cations (Plow *et al*, 2000). Plusieurs sites distincts pour la liaison des ions métalliques sont impliqués dans la régulation de la fonction de l'intégrine: les séquences répétitives en N-terminal de la sous-unité α , le domaine I de la sous-unité α et le domaine I putatif de la sous-unité β . Chez les intégrines, les ions divalents peuvent agir comme effecteurs, favorisant la liaison du ligand; comme antagonistes, inhibant la liaison du ligand; et comme sélecteurs, changeant la spécificité de la liaison du ligand (Plow *et al*, 2000). En général, l'affinité des propriétés de liaison des intégrines augmente en présence de Mg^{2+} et surtout Mn^{2+} . Le calcium a un effet inhibiteur sur la liaison de l'intégrine avec le ligand (Humphries, 1996).

Plusieurs études démontrent que les cations divalents peuvent se lier directement aux intégrines et former un complexe tertiaire avec le ligand (Dickeson *et al*, 1998; D'Souza *et al*, 1994; Smith et Cheresh, 1991). Ces analyses supportent le modèle de déplacement du cation (D'Souza *et al*, 1994). Le cation, le ligand et le récepteur forment un complexe tertiaire instable causant le déplacement du cation divalent pour permettre la liaison intégrine-ligand. Dans le modèle du tonneau β proposé par Springer (1997), les sites de liaison pour les cations sont localisés dans une région opposée aux sites de reconnaissance pour le ligand, impliquant un rôle indirect pour les cations divalents. La présence de multiples sites de liaison pour les cations dans différentes régions de la structure de l'intégrine suggère des rôles directs et indirects pour les cations divalents au niveau des différents sites de l'intégrine (Fernandez *et al*, 1998).

Les cations divalents peuvent causer des changements de conformation dans la structure de l'intégrine pour l'exposition des sites de reconnaissance du ligand (Mould, 1996). Des études concernant les effets des cations divalents sur la liaison d'anticorps monoclonaux qui agissent sur la fonction des intégrines peuvent appuyer ce modèle. Les épitopes des anticorps monoclonaux sont reconnus dans la région N-terminale des sous-unités α et β où se localisent les sites de reconnaissance pour les ligands des intégrines (Mould, 1998). Les anticorps stimulateurs peuvent produire des changements de conformation chez les intégrines ou reconnaître et stabiliser les intégrines

actives et celles qui sont liées à un ligand (Humphries, 1999). Les anticorps bloquants sont des inhibiteurs allostériques empêchant la liaison du ligand. Ces anticorps monoclonaux sont utilisés comme sondes pour détecter les changements de conformation des intégrines causés par les cations divalents (Fernandez *et al*, 1998; Mould, 1998). L'action des anticorps stimulateurs et inhibiteurs, avec la régulation de la liaison du ligand par les cations divalents, permet d'élaborer un modèle pour lequel l'interaction intégrine-ligand est dépendante des changements de conformation de la structure de l'intégrine (Figure 3) (Humphries, 1996). Dans ce modèle, les intégrines peuvent être dans un état actif ou inactif. L'intégrine est capable de lier un ligand avec haute affinité dans sa conformation active. L'équilibre de conformation peut être déplacé vers la forme active par la présence de Mn^{2+} et d'anticorps stimulateurs ou vers la forme inactive par le cation inhibiteur Ca^{2+} . Les anticorps inhibiteurs peuvent induire des changements de conformation qui empêchent la liaison du ligand par un mécanisme allostérique.

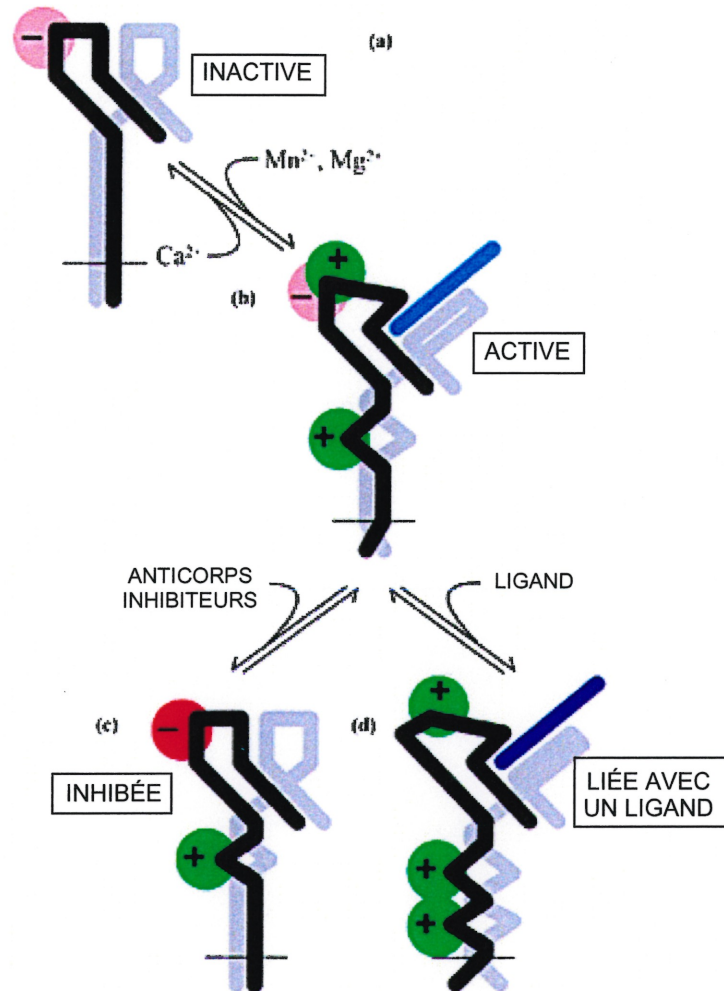


Figure 3: Modèle de changements de conformation de l'intégrine régulant la liaison du ligand. La conformation des sous-unités α (gris) et β (noir) change en réponse à la présence de cations divalents. L'intégrine inactive est occupée par le Ca^{2+} et exprime l'épitope pour les anticorps inhibiteurs (A). L'intégrine active est induite par le Mn^{2+} et le Mg^{2+} et a la capacité de lier un ligand (B). L'intégrine est inhibée par les anticorps bloquants qui changent la conformation du récepteur et prévient la liaison du ligand (C). L'intégrine est occupée par un ligand et peut être liée par des anticorps stimulateurs (D). D'après Humphries (1996).

3.2.4 Activation de la liaison

La liaison du ligand avec l'intégrine nécessite la présence des sous-unités α et β avec leurs multiples sites de reconnaissance. Sur la surface cellulaire, les intégrines peuvent être sous forme active ou inactive. Seule la forme active est apte à se lier avec un ligand. La transition de l'intégrine inactive à une intégrine active est accompagnée de changements de conformation et est régulée par l'occupation des cations divalents. Les changements de conformation causant l'activation de l'intégrine provoquent la relaxation des contacts $\alpha\beta$ pour l'exposition des sites de reconnaissance pour le ligand. Lors de la liaison de l'intégrine avec un ligand, des changements de conformation sont également perçus au niveau du domaine cytoplasmique des sous-unités α et β de l'intégrine, ayant un effet sur le réseau de signalisation intracellulaire. L'activité des intégrines est dépendante du type cellulaire, de l'intégrine, du ligand, de la présence de cations divalents ainsi que de la signalisation cellulaire (Green *et al*, 1998; Humphries, 1996; Mould, 1996; Newham et Humphries, 1996).

3.3 Signalisation des intégrines

Les intégrines ont été identifiées par leurs propriétés d'adhésion avec les protéines de la matrice extracellulaire et des cellules. Grâce à cette fonction adhésive, l'intégrine participe à la signalisation cellulaire pour contrôler les

différentes activités de la cellule, comme la migration, la prolifération et la survie. L'intégration de la surface cellulaire avec le cytosquelette permet une signalisation des intégrines par le transfert bidirectionnel de l'information à travers la membrane plasmique. Ainsi, l'intégrine peut transmettre un signal à l'extérieur de la cellule (signalisation inside-out) et vers l'intérieur de la cellule (signalisation outside-in). La signalisation se déroule au niveau des foyers d'adhésion à travers les domaines cytoplasmiques des intégrines qui interagissent avec des protéines du cytosquelette et des molécules intracellulaires de la signalisation.

3.3.1 Modulation de l'avidité et de l'affinité

L'activité des intégrines peut être contrôlée par des altérations du récepteur individuel augmentant l'affinité pour le ligand et par un regroupement de récepteurs pour amplifier l'avidité. Les changements d'affinité et d'avidité ne sont pas exclusifs et leurs effets sur la liaison du ligand varient avec le type d'intégrine et l'environnement cellulaire (Shattil et Ginsberg, 1997).

Les intégrines sont distribuées de manière diffuse sur la surface cellulaire (Schoenwaelder et Burridge, 1999). Lors d'une liaison avec un ligand, les intégrines se regroupent au niveau de la membrane plasmique (Ivaska et Heino, 2000). Cette modulation de l'avidité se caractérise par la redistribution

des récepteurs pour former des foyers d'adhésion, groupements d'intégrines aux sites de liaison (Coppolino et Dedhar, 2000). Ce rassemblement des intégrines permet d'augmenter l'avidité de la liaison entre la cellule et le ligand. De plus, les domaines cytoplasmiques des intégrines se relocalisent aux foyers d'adhésion pour une interaction entre la matrice extracellulaire et les molécules de signalisation (Newham et Humphries, 1996). La modulation de l'avidité permet une adhésion cellulaire efficace en absence d'une quantité suffisante de récepteurs de haute affinité. Les changements d'avidité sont observés lors de la migration et de l'étalement de la cellule, comme chez les leucocytes (Stewart et Hogg, 1996).

La modulation de l'affinité des intégrines est la propagation des changements de conformation des domaines cytoplasmiques vers les sites de liaison extracellulaires, pour une augmentation directe de l'affinité de la liaison du ligand (Hughes et Pfaff, 1998). L'activité de l'intégrine individuelle est modifiée par des signaux intracellulaires qui activent le récepteur vers un état de haute affinité pour être capable de lier efficacement un ligand. Ce phénomène de la modulation de l'affinité est observé lors de l'agrégation plaquettaire. L'intégrine α IIb β 3 est exprimée dans un état inactif sur la surface de la plaquette et peut être activée par différents agonistes. Les activateurs de la plaquette, comme la thrombine, n'agissent pas sur les intégrines mais sur d'autres récepteurs cellulaires qui vont activer une série de cascades de signalisation à l'intérieur

de la plaquette permettant l'activation de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Faull et Ginsberg, 1996).

3.3.2 Signalisation bidirectionnelle

Les intégrines participent à la transduction bidirectionnelle de signaux à travers la membrane plasmique. Les signalisations "outside-in" et "inside-out" nécessitent un récepteur pour la liaison des composantes cellulaires aux domaines cytoplasmiques (Ivaska et Heino, 2000).

La signalisation de l'intégrine (outside-in) consiste en des signaux générés à partir d'interactions intégrine-ligand qui sont propagés vers les domaines cytoplasmiques des sous-unités α et β dans la cellule. Ces signaux sont transmis à travers diverses voies de signalisation. L'occupation de l'intégrine par un ligand entraîne des événements biochimiques comme la régulation des niveaux d'ions intracellulaires, la réorganisation du cytosquelette, l'activation des protéines kinases, des changements du métabolisme lipidique et l'expression des gènes (Vuori, 1998; Meredith *et al*, 1996). La signalisation "outside-in" a plusieurs effets sur les fonctions cellulaires soit le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration et l'étalement, la croissance cellulaire et la différenciation (Dedhar, 1999; Faull et Ginsberg, 1996).

La signalisation inverse est l'information transmise de l'intérieur de la cellule au domaine extracellulaire de l'intégrine, modifiant la capacité du récepteur de se lier au ligand. La cellule contrôle la fonction de l'intégrine par ce mécanisme. La signalisation provient de récepteurs de la membrane plasmique, autres que les intégrines, dont le signal se propage dans la cellule pour activer les intégrines. L'activation de l'intégrine peut être modulée par un changement de conformation de l'intégrine, permettant une haute affinité pour la liaison de l'intégrine avec un ligand, ou par le regroupement des récepteurs (Shattil et Ginsberg, 1997).

3.3.3 Foyers d'adhésion

L'occupation de l'intégrine par un ligand mène à un regroupement de récepteurs, ainsi qu'à l'organisation du cytosquelette et au recrutement des molécules de signalisation aux foyers d'adhésion. Par la formation de ces structures dynamiques au niveau de la membrane cellulaire, un lien est créé par les intégrines entre la matrice externe et les complexes du cytosquelette intracellulaire. Les foyers d'adhésion sont les sites de terminaison des filaments d'actine, l'actine étant une composante importante de l'organisation du cytosquelette (Calderwood *et al*, 2000; David *et al*, 1999). Plusieurs molécules structurales et de signalisation sont concentrées à ces sites d'adhésion comme les intégrines, les protéines du cytosquelette, les protéines kinases et les

molécules de signalisation (Figure 4) (Kumar, 1998). La présence d'intégrines intactes est nécessaire pour la formation des foyers d'adhésion, ainsi que la liaison d'un ligand au domaine extracellulaire, un changement de conformation du domaine extracellulaire et une queue cytoplasmique intacte de la sous-unité β (Ylanne *et al*, 1993; LaFlamme *et al*, 1992). Les domaines cytoplasmiques jouent un rôle essentiel dans la signalisation de l'intégrine puisque les queues cytoplasmiques des sous-unités α et β sont directement accessibles au complexe de signalisation intracellulaire (Shattil et Ginsberg, 1997). Les intégrines se colocalisent aux foyers d'adhésion avec des protéines associées à l'actine comme l' α -actinine, la taline, la tensine, la paxilline et la vinculine. La taline est une protéine structurale majeure des foyers d'adhésion. Elle peut lier l'actine, la vinculine et FAK. La vinculine est une protéine retrouvée en abondance au niveau des foyers d'adhésion. La vinculine se lie avec les intégrines de manière indirecte par l' α -actinine et la taline. De plus, la vinculine peut être en interaction avec l'actine et la tensine (Vuori, 1998). Les protéines kinases qui se situent au niveau de ces complexes sont la kinase du foyer d'adhésion (FAK), *c-src*, la protéine kinase C, la kinase associée à l'intégrine (ILK), etc. (Dedhar et Hannigan, 1996; Yamada et Miyamoto, 1995). Les foyers d'adhésion sont régulés par les membres de la famille Rho de GTPases, soient Rho, Rac et Cdc42 (Kumar, 1998) .

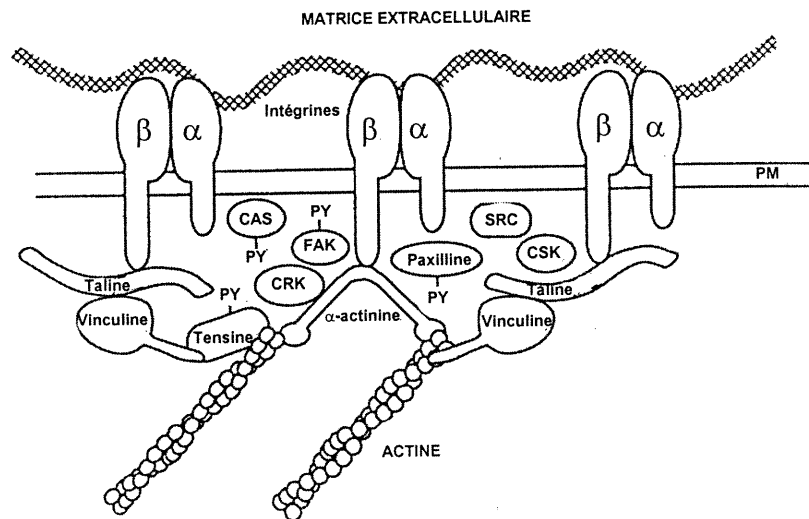


Figure 4: Modèle du foyer d'adhésion. Plusieurs composantes permettent la liaison des filaments d'actine avec la matrice extracellulaire. Selon Vuori (1998).

3.3.4 Voies de signalisation intracellulaire

La liaison de la cellule avec la matrice extracellulaire s'accompagne de l'agrégation des intégrines au niveau des foyers d'adhésion et d'une augmentation de la phosphorylation de tyrosines chez plusieurs protéines intracellulaires. La phosphorylation de la protéine kinase FAK semble initier une cascade d'événements de phosphorylation et de nouvelles interactions protéiques au sein des complexes de signalisation (Kumar, 1998). FAK est une

tyrosine kinase de 120 kDa avec un domaine catalytique central entouré des régions N-terminale et C-terminale qui sont impliquées dans la signalisation des intégrines (Figure 5). Le domaine NH₂ peut interagir avec la queue cytoplasmique de l'intégrine. La région C-terminale contient une séquence FAT (*focal adhesion targeting*) et des sites de liaison pour des protéines du cytosquelette et des molécules de signalisation. Cette région possède également deux séquences riches en proline (P1 et P2). Contrairement aux autres protéines tyrosines kinases, FAK ne possède pas les domaines homologues au Src, SH2 et SH3, qui permettent des interactions spécifiques avec des séquences de phosphotyrosine et riches en proline, respectivement. FAK possède six sites de phosphorylation (Tyr 397, 407, 576, 577, 861, 925) (Longhurst et Jennings, 1998).

La liaison du ligand avec l'intégrine provoque l'autophosphorylation au site Y397 de FAK. Cette phosphotyrosine devient un site de haute affinité pour le domaine SH2 de la famille Src. La conséquence de la liaison FAK-Src est la phosphorylation de plusieurs tyrosines chez FAK, ainsi que chez des protéines associées à FAK, comme p130^{CAS} et la paxilline. La phosphorylation des sites Y576 et Y577 dans le domaine catalytique de FAK contrôle l'activité de la kinase.

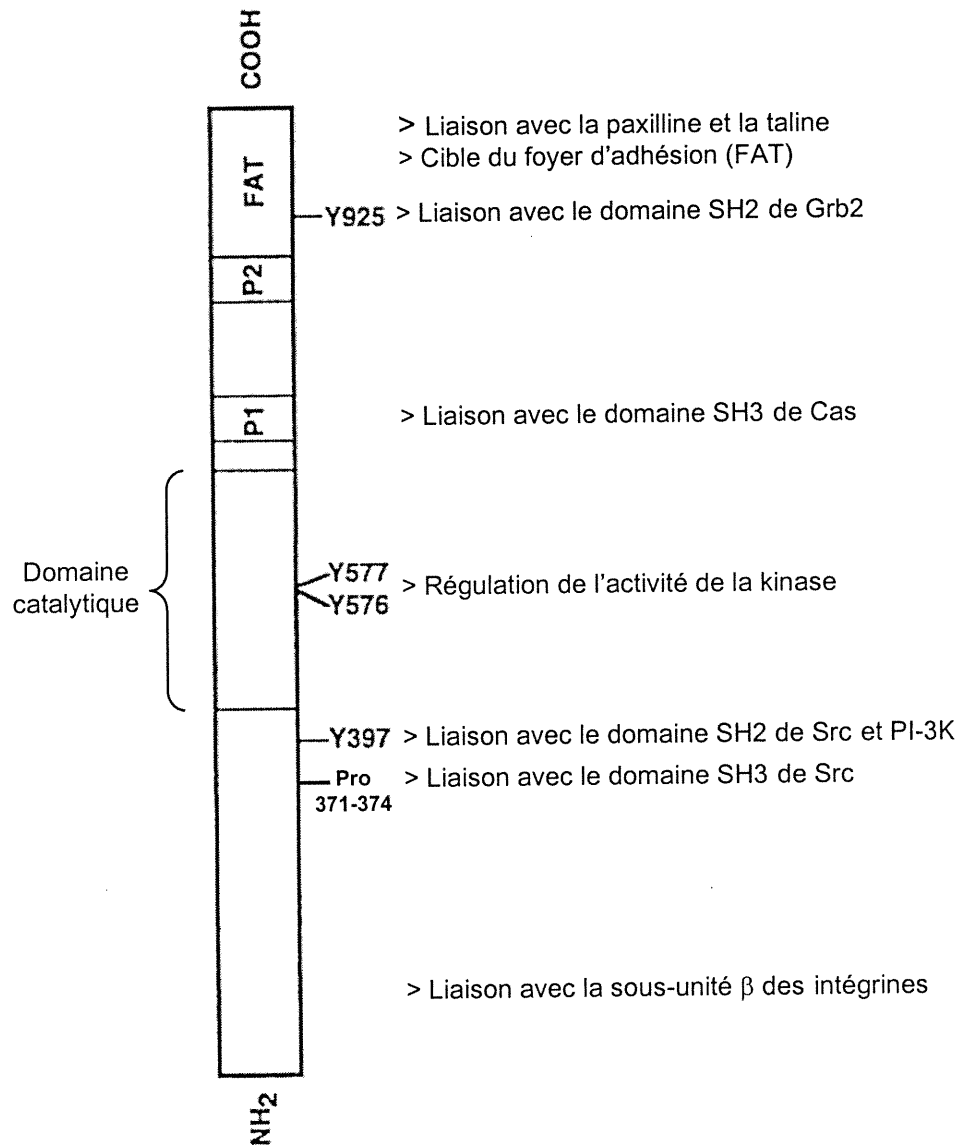


Figure 5: Structure de la kinase du foyer d'adhésion. D'après Vuori (1998).

Le rôle de phosphorylation de Y407 et Y861 n'est pas encore connu. Le site Y925 phosphorylé par Src est un site de liaison pour le domaine SH2 de Grb2. Cette protéine adaptatrice Grb2 se lie à l'échangeur de nucléotide guanine SOS pour l'activation de la signalisation par Ras/Erk (Schlaepfer et Hunter, 1998; Vuori, 1998). La kinase FAK autophosphorylée peut lier et activer la kinase phosphatidyl-3-inositide (PI-3K). De plus FAK interagit avec Csk, un régulateur des kinases de la famille Src (Vuori, 1998). Ainsi, FAK participe à plusieurs voies de signalisation intracellulaire (Figure 6).

Le mécanisme d'activation de FAK par les intégrines n'est pas connu. Toutefois, cette activation est dépendante de la présence de la sous-unité β des intégrines. Des peptides dérivés du domaine cytoplasmique de la sous-unité β des intégrines peuvent se lier *in vitro* avec le domaine N-terminal de FAK. De plus, une association indirecte avec FAK et la sous-unité β de l'intégrine a lieu par la présence de la taline (Cary et Guan, 1999; Kumar, 1998; Vuori, 1998).

Les membres de la famille Src sont des protéines tyrosines kinases qui sont en relation avec FAK pour les différentes voies de signalisation médiées par les intégrines. Suite à l'autophosphorylation du site Y397 de FAK, le domaine SH2 de la kinase Src interagit avec FAK. Le complexe FAK-Src permet la phosphorylation de plusieurs tyrosines chez FAK, p130^{CAS} et la paxilline. Ainsi, Src est un élément important pour les fonctions de FAK au niveau de la

transduction du signal des intégrines (Cary et Guan, 1999). En plus de Y397, principal site de l'interaction FAK-Src, le domaine SH3 de Src peut également lier la paxilline et une région riche en proline de FAK. Les domaines SH2 et SH3 peuvent également se lier à des sites distincts de p130^{CAS} (Cary et Guan, 1999; Longhurst et Jennings, 1998).

La protéine adaptatrice Cas (p130^{CAS}, *Crk-associated substrate*) participe à la liaison de diverses molécules de signalisation. Le domaine SH3 de Cas s'associe avec les régions riches en proline de FAK. De plus, Cas se lie au domaine SH2 de Crk qui interagit avec les membres de la famille Ras, comme C3G (Longhurst et Jennings, 1998; Vuori, 1998).

La paxilline participe à la signalisation de l'intégrine et à l'organisation du cytosquelette. La paxilline peut lier la vinculine, les sous-unités β des intégrines, les membres de la famille Src, la séquence FAT de la kinase FAK, Csk et Crk. Ainsi, la paxilline agit comme une protéine structurale au niveau du foyer d'adhésion par des interactions avec d'autres molécules de signalisation et du cytosquelette (Cary et Guan, 1999).

Les voies de signalisation activées par les composantes de la signalisation de l'intégrine déterminent si une interaction avec une molécule spécifique de la matrice extracellulaire favorise l'adhésion ou la migration, la prolifération ou la différenciation et même la survie ou l'apoptose (Figure 6) (Giancotti, 2000).

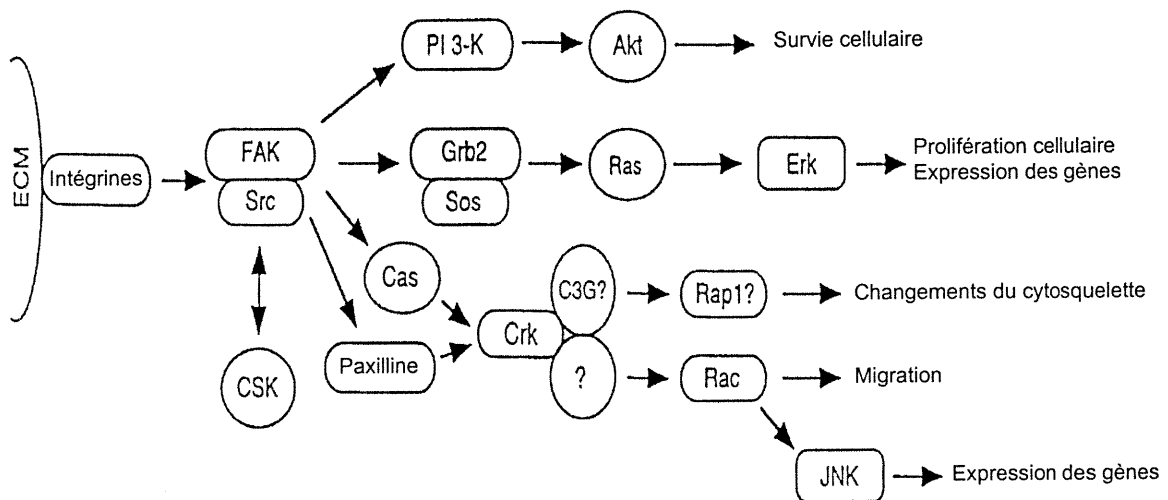


Figure 6: Voies de signalisation de l'intégrine via le complexe FAK-Src.
D'après Vuori (1998).

3.3.5 Protéines membranaires associées aux intégrines

Des protéines associées aux intégrines peuvent former des interactions directes avec les intégrines et moduler leurs fonctions (Coppolino et Dedhar, 2000). L'association latérale des intégrines avec des protéines transmembranaires peut jouer un rôle dans la signalisation des intégrines. La protéine associée à l'intégrine (IAP) est une protéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines. IAP peut interagir avec les intégrines $\alpha v \beta 3$, $\alpha IIb \beta 3$ et $\alpha 2 \beta 1$ (Hemler, 1998). Des interactions entre les intégrines $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 4 \beta 1$

et $\alpha 6\beta 1$ et les protéines transmembranaires de la classe des tétraspanines (CD9, CD81 et CD63) ont été observées (Coppolino et Dedhar, 2000; Shattil et Ginsberg, 1997). La calvéoline est une protéine adaptatrice qui semble jouer un rôle régulateur sur la fonction des intégrines $\beta 1$. Il a été montré que la calvéoline co-immunoprécipite avec les intégrines $\beta 1$ et interagit avec des molécules de signalisation impliquées dans la fonction des intégrines comme la famille des kinases Src, les protéines G hétérotrimériques et H-ras (Wei *et al*, 1999).

Les récepteurs de facteur de croissance peuvent être en association avec les intégrines pour une activation optimale par leurs ligands. L'intégrine $\alpha v\beta 3$ forme un complexe avec les récepteurs de l'insuline, du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et du facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires (VGEF) (Soldi, 1999; Schneller *et al*, 1997). L'intégrine $\alpha 5\beta 1$ s'associe avec le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF) (Miyamoto *et al*, 1996). Suite à un regroupement d'intégrines, les récepteurs de facteur de croissance sont recrutés aux foyers d'adhésion, résultant en une augmentation de la phosphorylation et de l'activation du récepteur de facteur de croissance et à une accumulation des éléments de la signalisation cellulaire (Boudreau et Jones, 1999). Finalement, les facteurs de croissance peuvent stimuler efficacement l'activation de la kinase MAP chez les cellules adhérentes (Schwartz et Baron, 1999).

3.4 Fonctions des intégrines

Les changements de la surface cellulaire et la réorganisation du cytosquelette suite à des interactions cellule-matrice avec la participation des intégrines permettent plusieurs réactions physiologiques de la cellule. L'absence de contact de la cellule avec les protéines de la matrice extracellulaire provoque la mort programmée de la cellule (apoptose).

Les intégrines participent à la croissance, la migration, l'étalement, la prolifération et à la survie de la cellule (Hynes, 1992). Par ces fonctions, les intégrines sont impliquées dans divers processus biologiques comme le développement, la différenciation, la morphogenèse, la réponse inflammatoire, la coagulation sanguine, la cicatrisation, l'hémostase et le maintien de l'intégrité des tissus (Curley *et al*, 1999; Newham et Humphries, 1996; Albelda, 1990). Suite à une interaction avec un ligand, les intégrines peuvent activer la signalisation intracellulaire pour stimuler l'expression de gènes et agir sur le cycle cellulaire. De plus, les intégrines semblent influencer l'expression des métalloprotéases et, ainsi, réguler la dégradation de la matrice extracellulaire (Ivaska et Heino, 2000).

Des animaux transgéniques manquant une intégrine spécifique offrent des informations *in vivo* sur les fonctions de l'intégrine. L'élimination de sous-unités de l'intégrine comme $\beta 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ $\alpha 8$ et αv donne des phénotypes sévères, c'est-

à-dire une létalité embryonique ou périnatale. Toutefois, l'ablation de $\beta 3$ ou $\alpha 1$ n'affecte pas le développement ou la viabilité (Ivaska et Heino, 2000; Clemetson K.J. et Clemetson J.M., 1998; Muller *et al*, 1997; Hynes, 1996).

Lors de la réponse inflammatoire, les leucocytes migrent vers le site d'infection grâce aux intégrines $\alpha L\beta 2$ et $\alpha 4\beta 1$. L'importance des intégrines dans l'inflammation est soulignée par une déficience de l'adhésion des leucocytes chez les individus qui ont une absence ou une défectuosité de la sous-unité $\beta 2$ (Harlan, 1993). Ces personnes souffrent continuellement d'infections puisque les leucocytes ne peuvent migrer vers les lésions. Une migration incontrôlée ou excessive des leucocytes peut être impliquée dans plusieurs troubles inflammatoires entre autres la polyarthrite rhumatoïde, l'asthme et multiples scléroses (Curley *et al*, 1999).

Les intégrines peuvent se servir de leurs propriétés adhésives durant les différents stages du cancer comme la transformation maligne, la croissance et la progression de la tumeur, l'invasion, la métastase et l'apoptose. Durant le cancer, un changement de l'expression des intégrines a été observé *in vitro* et *in vivo*. Certaines intégrines sont surexprimées, tandis que d'autres ne sont plus présentes sur la surface des cellules. Les intégrines $\alpha v\beta 3$ des cellules endothéliales vasculaires sont impliquées dans l'angiogenèse des tumeurs (Mizejewski, 1999).

L'intégrine majeure retrouvée sur les plaquettes, le récepteur du fibrinogène $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, a un rôle important dans les maladies cardiovasculaires. L'agrégation plaquettaire peut développer une thrombose causant l'obstruction des vaisseaux sanguins aux sites de lésions ou aux plaques d'athérome et pouvant conduire à une crise cardiaque ou à un accident vasculaire cérébral (Curley *et al*, 1999; Clemetson K.J. et Clemetson J.M., 1998). Autrement, la thrombasthénie de Glanzmann est une maladie hémorragique due à l'absence partielle ou complète de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ sur les plaquettes (Clemetson K.J. et Clemetson J.M., 1998; Coller *et al*, 1991).

Finalement, les intégrines semblent participer au remodelage cardiovasculaire. L'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ des cellules vasculaires lisses est impliquée dans la resténose suite à une lésion vasculaire. Chez les fibroblastes cardiaques, les intégrines RGD-dépendantes contribuent au remodelage cardiaque (Hsueh *et al*, 1998).

3.5 Contrôle de l'expression des intégrines

Le contrôle des intégrines est complexe et nécessaire pour le rôle joué par les intégrines dans divers processus biologiques. Plusieurs médiateurs peuvent affecter la régulation des intégrines incluant des cytokines, des hormones et des agents pharmacologiques. De plus, la cellule peut contrôler la présence d'une intégrine active par des mécanismes de régulation.

Plusieurs études ont examiné le signal que certains agents donnent à la cellule pour contrôler le niveau de présence des intégrines. Les changements au niveau protéique ont été montrés par des analyses de FACS (*fluorescence activated cell sorting*), immunoprécipitation ou immunocoloration. En parallèle, les changements ont été également montrés au niveau de l'ARN messenger (Kim et Yamada, 1997). Parmi les molécules régulatrices, le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) est le mieux étudié. TGF- β stimule l'expression de plusieurs intégrines sur divers types cellulaires. Une stimulation par TGF- β peut augmenter l'expression de plusieurs intégrines telles que $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 5$ et $\beta 6$. TGF- β peut augmenter l'expression des intégrines déjà présentes sur les cellules. Dans certains cas, TGF- β cause la synthèse d'une nouvelle intégrine sur la cellule. Comme il joue un rôle dans la synthèse de la matrice extracellulaire, il semble que TGF- β augmente l'habileté des cellules à répondre aux modifications de leur environnement (Kim et Yamada, 1997). Au niveau cardiaque, il a été démontré que TGF- β augmente l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ chez les fibroblastes cardiaques néonataux de rats (Graf *et al*, 2000). De plus, l'angiotensine II participe au contrôle de l'expression des intégrines αv , $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 5$ via le récepteur à l'angiotensine de type 1 (AT-1). Ainsi, l'Ang II contrôle l'adhésion et d'autres actions profibrotiques des fibroblastes cardiaques. Peu d'effet de l'Ang II est observé sur l'expression de ces intégrines chez les fibroblastes cardiaques humains (Kawano *et al*, 2000a). D'autres facteurs de croissance et cytokines contrôlent

les niveaux d'intégrines sur la surface des cellules comme PDGF, FGF, TNF, IFN- γ et autres (Kim et Yamada, 1997).

Une étude a démontré que l'expression des intégrines peut être contrôlée par la matrice extracellulaire (Delcomenne et Streuli, 1995). Ce mécanisme de contrôle est activé par les cellules normales dans un environnement inapproprié afin de rétablir les interactions cellule-matrice pour maintenir la survie et la différenciation de la cellule.

La modulation des fonctions de l'intégrine se produit suite à des changements dans les niveaux protéiques de l'intégrine, contrôlés par la modulation de la transcription génétique ou par des mécanismes post-transcriptionnels. Au niveau du contrôle de l'expression des gènes, certains sites du promoteur des gènes de l'intégrine incluant Sp1, Ets et PU.1, permettent la régulation de la transcription génétique de l'intégrine. L'épissage alternatif est un autre moyen de réguler la fonction de l'intégrine. L'épissage alternatif se produit surtout au niveau du domaine cytoplasmique affectant la signalisation intracellulaire. L'épissage du domaine extracellulaire peut avoir un effet sur la liaison du ligand. Chez les neutrophiles et les monocytes, les intégrines $\alpha X\beta 2$ et $\alpha M\beta 2$ sont retenues dans des vésicules intracellulaires, puis mobilisées à la surface cellulaire suite à une stimulation, résultant en une modulation rapide de la fonction des intégrines. Finalement, les intégrines peuvent être modulées par

une signalisation de l'intérieur de la cellule contrôlant la capacité des intégrines de se lier à un ligand (Kim et Yamada, 1997).

3.6 Désintégrines

L'étude sur l'implication du motif RGD dans l'interaction d'une molécule d'adhésion avec les intégrines est facilitée par l'identification des désintégrines, protéines à motif RGD présentes dans le venin de serpent (Kumar *et al*, 1997). Depuis l'identification et la caractérisation de la première désintégrine, la trigramine (Huang *et al*, 1987), la famille des désintégrines comporte plus de 40 protéines différentes provenant du venin de plusieurs espèces de serpent des familles *Crotalidae* et *Viperidae* (Huang, 1998). Les désintégrines sont des hémotoxines de faible poids moléculaire riches en cystéines, contenant un motif de reconnaissance RGD. Les désintégrines peuvent être impliquées dans une interaction de haute affinité avec différentes intégrines comme α IIb β 3, α v β 3 et α 5 β 1. Ces toxines sont de puissants inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion cellulaire (Marcinkiewicz *et al*, 1997).

Les désintégrines ont été divisées en trois classes: 1) les désintégrines courtes incluant l'échistatine, l'éristocophine et l'éristostatine sont composées de 49-51 acides aminés et huit cystéines; 2) les désintégrines moyennes, composées d'environ 70 acides aminés et 12 cystéines, sont l'albolabrine, la kistrine, la

trigramme, la flavoridine, la batroxostatine, l'élégantine et la barbourine; 3) les désintégrines longues comme la bitistatine ont 84 résidus et 14 cystéines (McLane *et al*, 1998). Des désintégrines dimériques découvertes récemment forment une nouvelle classe de protéines incluant la contortrostatine, EMF10 et EC3 (Marcinkiewicz *et al*, 1999b). La contortrostatine est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire (Tripathi *et al*, 1994; Clark *et al*, 1994). La désintégrine EMF10 inhibe l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. EC3 est un puissant inhibiteur des intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$ et un faible inhibiteur de l' $\alpha 5\beta 1$ et de l'agrégation plaquettaire (Marcinkiewicz *et al*, 1999a). Finalement, des protéines membranaires de la famille ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase domain*) connues comme des désintégrines cellulaires sont retrouvées dans divers tissus de mammifères et chez d'autres organismes eucaryotes. Les protéines ADAMs qui contiennent un domaine de désintégrine semblent jouer un rôle dans les processus de la reproduction, du développement des muscles et des réponses inflammatoires (McLane *et al*, 1998).

Les désintégrines possèdent 8 à 14 cystéines qui se lient par des ponts disulfures intramoléculaires pour maintenir la boucle RGD dans une conformation appropriée (McLane *et al*, 1994). Selon des études RMN, le motif RGD se trouve à la pointe d'une boucle qui joint deux brins d'un feuillet β de la désintégrine (Niewiarowski *et al*, 1994). La séquence RGD démontre une importance dans l'activité biologique des désintégrines puisque la substitution d'un acide aminé résulte en une perte d'activité (Dennis *et al*, 1993; Garsky *et*

al, 1989). Les résidus entourant la séquence RGD (ex : RGDW et RGDN) déterminent la sélectivité de la désintégrine pour l'intégrine (Scarborough *et al*, 1993).

Des résidus localisés dans les régions adjacentes du motif RGD peuvent jouer un rôle important pour la spécificité dans la reconnaissance de l'intégrine par les désintégrines. Des acides aminés de la région C-terminale des désintégrines sont critiques pour l'induction des changements de conformation chez l'intégrine. Le domaine C-terminal des désintégrines supporte l'interaction avec les intégrines inactives et cause des changements de conformation chez les récepteurs résultant en l'augmentation de l'affinité des intégrines et de l'effet inhibiteur des désintégrines (Marcinkiewicz *et al*, 1997).

Ainsi, la spécificité des désintégrines lors d'une interaction avec différentes intégrines dépend de plusieurs facteurs: la séquence RGD, les acides aminés adjacents au motif RGD, les ponts S-S intramoléculaires et les résidus dans les régions externes de la boucle RGD (Marcinkiewicz *et al*, 1997).

3.6.1 Échistatine: outil d'étude des intégrines

L'échistatine est une désintégrine de 49 acides aminés ayant un motif RGD et provenant du venin de l'*Echis carinatus* (Gould *et al*, 1990). Ce peptide contient huit cystéines impliquées dans quatre ponts disulfures (Figure 7). Cette hémotoxine est un puissant antagoniste de la liaison d'un ligand avec les intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ et $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ (Pfaff *et al*, 1994; Scarborough *et al*, 1993). Ainsi, l'échistatine peut inhiber les fonctions des différentes intégrines. Par exemple, lorsqu'en compétition avec le fibrinogène pour le site de liaison de l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$, l'échistatine entraîne l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et d'autres événements antithrombotiques comme la prévention d'une thrombose coronarienne (Savage *et al*, 1990; Shebuski *et al*, 1990; Gan *et al*, 1988). L'échistatine est également un puissant inhibiteur de la résorption osseuse bloquant l'interaction des intégrines $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ présentes sur les ostéoclastes avec la matrice extracellulaire (Sato *et al*, 1990).

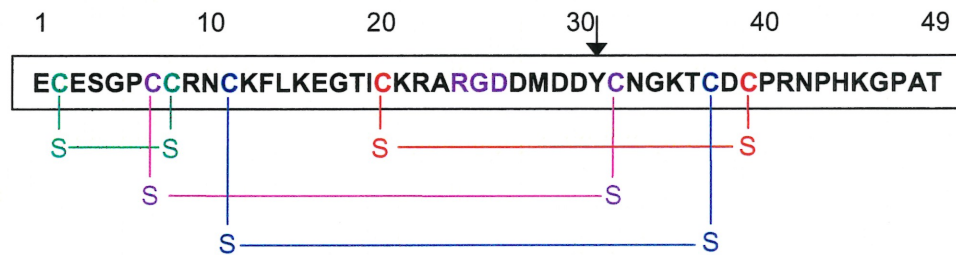


Figure 7: Structure de l'échistatine. L'échistatine est un peptide de 49 acides aminés ayant un motif RGD. L'échistatine comprend quatre ponts S-S. À la position 31 (indiquée par une flèche), une tyrosine permet l'ajout d'un isotope ^{125}I .

Il a été démontré que l'échistatine peut modifier la signalisation intracellulaire des intégrines. La liaison de l'échistatine à l'intégrine provoque une réduction de la phosphorylation de FAK à la position Y397, affectant l'autophosphorylation et l'activité de la kinase. Une réduction de la phosphorylation de la paxilline a également été observée, ainsi que la disparition de FAK et de la paxilline des foyers d'adhésion. La réduction de la phosphorylation de FAK causée par l'échistatine correspond alors à la dissolution du cytosquelette de l'actine et des foyers d'adhésion (Della Morte *et al*, 2000).

L'échistatine est un outil d'étude des intégrines sous forme de sonde moléculaire pour caractériser les sites de liaison chez les intégrines et pour identifier les motifs structuraux de la désintégrine pour son activité biologique (Wierbicka-Patynowski *et al*, 1999; Marcinkiewicz *et al*, 1996). L'échistatine a également été utilisée pour des essais de radio-ligand afin d'évaluer la densité et l'affinité de l'intégrine α IIb β 3 sur les plaquettes ou l' α v β 3 sur les cellules vasculaires lisses (Marcinkiewicz *et al*, 1996; MacLane *et al*, 1994). Dans notre laboratoire, l'échistatine radio-iodée est utilisée comme sonde pour détecter la présence d'intégrines RGD-dépendantes sur la surface cellulaire (Thibault, 2000).

3.6.2 Identification des intégrines sur les fibroblastes cardiaques

Dans une étude réalisée par notre laboratoire, l'échistatine est un outil pharmacologique pour l'identification des différentes intégrines RGD-dépendantes présentes sur la surface des cellules (Thibault, 2000). La formation de complexes échistatine-intégrine stables au SDS permet leur détection par autoradiographie après une séparation sur SDS-PAGE.

L'échistatine sert de marqueur radioactif suite à l'ajout d'un isotope ^{125}I sur le résidu tyrosine à la position 31 de la molécule (Figure 7). L' ^{125}I -échistatine est incubée avec des protéines solubilisées suite à une lyse de fibroblastes cardiaques avec un détergent non-ionique Nonidet-P40 (NP-40). Après une séparation sur SDS-PAGE, l'autoradiographie révèle la présence de trois bandes radioactives. Ces bandes sont résistantes au SDS en l'absence de chauffage et de conditions réductrices. La présence de cations divalents comme le manganèse favorise la formation du complexe échistatine-intégrine et donne un signal optimal sur l'autoradiographie. Les bandes détectées de 180 kDa, 210 kDa et 220 kDa ont été identifiées par chromatographie d'affinité, immunobuvardage et immunoneutralisation comme étant les intégrines $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{3}\beta\text{1}/\alpha\text{5}\beta\text{1}/\alpha\text{v}\beta\text{1}$, et $\alpha\text{8}\beta\text{1}$, respectivement. Ces intégrines ont également été détectées sur les fibroblastes cardiaques de rat par MacKenna *et al* (1998), excepté pour l'intégrine $\alpha\text{8}\beta\text{1}$. Par cette nouvelle approche, l'échistatine permet de visualiser les intégrines RGD-dépendantes de la surface cellulaire, de

connaître leur spécificité pour des peptides à motif RGD et d'étudier leur état d'activation.

4. Hypothèse de travail

La présence des intégrines est d'une importance cruciale pour les différentes fonctions de la cellule. Au niveau cardiaque, les intégrines semblent jouer un rôle dans le remodelage cardiaque suite aux effets de la sécrétion de l'angiotensine II et du facteur de croissance transformant- β sur la matrice extracellulaire.

Les intégrines sont des récepteurs hétérodimériques composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Les intégrines participent à l'adhésion cellulaire grâce à leur liaison avec les protéines de la matrice extracellulaire. La séquence RGD (Arg-Gly-Asp) est un site de reconnaissance retrouvé chez plusieurs ligands protéiques qui permet une liaison avec différentes intégrines. Parmi ces ligands, les désintégrines comme l'échistatine sont de petits peptides portant un motif RGD et pouvant se lier aux intégrines RGD-dépendantes et bloquer leurs fonction. Les désintégrines peuvent être un outil pharmacologique intéressant bloquant les intégrines, par exemple, pour empêcher la fibrose cardiaque. Dans notre laboratoire, l'échistatine est utilisée comme sonde pour l'identification et la caractérisation des intégrines RGD-dépendantes sur la surface cellulaire. Une nouvelle approche utilisant l' ^{125}I -échistatine a permis d'identifier cinq intégrines RGD-dépendantes, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 3\beta 1/\alpha 5\beta 1/\alpha v\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, présentes sur les fibroblastes cardiaques de rats adultes. L'ajout de l' ^{125}I -échistatine permet la formation de complexes stables au SDS avec les

intégrines de type RGD que l'on peut visualiser sur une autoradiographie sous forme de bandes radioactives après une séparation sur SDS-PAGE.

Notre projet a pour hypothèse que les intégrines sont des récepteurs membranaires dont l'activité est modulable. Les différentes études seront réalisées grâce à notre approche qui résulte en la formation d'un complexe intégrine-échistatine stable. Les intégrines seront obtenues à partir d'une culture de fibroblastes cardiaques de rats Sprague-Dawley adultes. Tout d'abord, nous vérifierons la localisation des intégrines sur les membranes, en se servant du complexe intégrine-échistatine. Les membranes seront purifiées par une méthode d'un système à deux phases aqueuses, contenant du dextran et du polyéthylène glycol. L'interaction des différentes intégrines envers la désintégrine sera déterminée par une saturation avec l'échistatine après stimulation ou non des cellules avec des facteurs de croissance incluant FBS, Ang II et TGF- β . Suite à la saturation des intégrines par l'échistatine, nous détecterons par immunobuvardage les sous-unités libres qui ne seront pas impliquées dans la liaison intégrine-échistatine. Une modification de l'expression et de l'affinité des intégrines sera également déterminée avec la stimulation des fibroblastes cardiaques par des facteurs trophiques. Finalement, nous désirons localiser les différentes intégrines au niveau des foyers d'adhésion grâce à l'immunocytochimie. Ainsi, notre investigation porte sur l'affinité des intégrines envers l'échistatine et sur la localisation de ces récepteurs membranaires au niveau des foyers d'adhésion.

CHAPITRE 2:
Matériel et Méthodes

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Matériel

Tous les produits chimiques d'utilisation commune tels que NaHCO_3 , NaCl , EDTA, HEPES, etc. proviennent de Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO) ou de Fischer Scientific (Nepean, ON).

Acide trifluoroacétique	Pierce, Rockford, IL
Adénosine 5'-monophosphate	Boehringer Mannheim, West Germany
BenchMark™ Prestained Protein Ladder	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
Bio-Rad Protein Assay (Bradford)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Chlorure d'iodonitrotétrazolium	Sigma Chemical Co., St-Louis, MO
Collagénase	Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ
Cremophor EL	Sigma Chemical Co., St-Louis, MO
DMEM	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
Dextran T500	Amersham Pharmacia, Oakville, ON
Échistatine	Bachem California Inc., Torrance, CA
Fibronectine humaine	Boehringer Mannheim, West Germany

Films X-OMAT AR5	Eastman Kodak Co., Rochester, NY
Glucose-6-phosphate	Sigma Chemical Co., St-Louis, MO
Hybond ECL	Amersham Pharmacia Biotech, Oakville, ON
Lab-Tek Chamber Slide	Nunc, Naperville, IL (lames de 4 puits)
Lactoperoxydase	Sigma Chemical Co., St-Louis, MO
Na ¹²⁵ I	Amersham Pharmacia, Oakville, ON
Polyéthylène Glycol 3350	Sigma Chemical Co., St-Louis, MO
Rats Sprague-Dawley	Charles River, St-Constant, QC
(Sar') Angiotensine II	Bachem California Inc., Torrance, CA
Sérum bovin foetal	Wisent, St-Bruno, QC
Sérum de chèvre	Chemicon International Inc., Temecula, CA
Sérum de veau	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
Slow Fade kit	Molecular Probes Inc., Eugene, OR
Somnotol	MTC Pharmaceuticals, Cambridge, ON
Streptavidine peroxydase de raifort	Amersham Canada Ltd, Oakville, ON
Super Signal	Pierce, Rockford, IL
Système Mini Protean II	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
TGF- β	Sigma Chemical Co., St-Louis, MO
Trypsine	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON

Différents anticorps utilisés pour les immunobuvardages et l'immunocytochimie:

Anti- α 3	AB1920, Chemicon International Inc., Temecula, CA. Dr. R.O. Hynes (Howard Hughes Medical Institute, Cambridge, MA), no. 8-4.
Anti- α 5	AB1928, Chemicon International Inc., Temecula, CA.
Anti- α 8	Dr. Lynn M. Schnapp (Pulmonary and Critical Care Medicine, University of Washington, WA).
Anti- α v	AB1930, Chemicon International Inc., Temecula, CA.
Anti- β 1	Ha2/5, Pharmingen Canada, Mississauga, ON. Dr. R.O. Hynes (Howard Hughes Medical Institute, Cambridge, MA), no. 130.
Anti- β 3	2C9.G2 et F11, Pharmingen Canada, Mississauga, ON.
Anti-hamster Ig biotinylé	Pharmingen Canada, Mississauga, ON.
Anti-lapin avec fluorescéine	Chemicon International Inc., Temecula, CA.
Anti-lapin IgG couplé à la peroxydase de raifort	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA.
Anti-souris avec rhodamine	Chemicon International Inc., Temecula, CA.
Anti-vinculine	Sigma Chemical Co., St-Louis, MO.

Différents tampons utilisés :

Milieu de base, pH 7.2 :	13.48 g/ L DMEM
	0.44 mol/L NaHCO ₃
	0.015 mol/L Hepes
	0.1% albumine de sérum bovin
	1% pénicilline-streptomycine
Tampon de lyse:	0.05 M HEPES, pH 7.4
	0.15 M NaCl
	1% NP-40
	1mM CaCl ₂
	1 mM MgCl ₂
	5 μM pepstatine A
	10 μM leupeptine
	50 KIU/mL aprotinine
	1 mM PMSF
Tampon d'échantillon:	0.188 M Tris-HCl, pH 6.8
	30% glycérol
	6% SDS
	0.15% bleu de bromophénol

Solution 5:1:5:	900 mL méthanol 180 mL CH ₃ COOH 900 mL H ₂ O
Solution 1:1:9:	150 mL méthanol 150 mL CH ₃ COOH 150 mL H ₂ O
Tampon de transfert:	0.05 M Tris 0.4M glycine 20% méthanol
Tampon d'immunobuvardage:	0.05 M NaPO ₄ , pH 7.4 0.154 M NaCl 0.1% Tween 20
Tampon PBS 10X, pH 7.4:	1.4 M NaCl 0.027 M KCl 0.1 M Na ₂ HPO ₄ 0.02 M KH ₂ PO ₄

2. Méthodes

2.1 Culture de fibroblastes cardiaques

Les cultures primaires de fibroblastes cardiaques de rats adultes sont préparées selon Fareh *et al* (1997) et Thibault (2000). Les rats Sprague-Dawley mâles (200-250 g) sont anesthésiés au somnotol (0.1 mL/100 g) pour le prélèvement du cœur. La partie supérieure du cœur (oreillettes et vaisseaux sanguins) est enlevée. Les ventricules sont découpés en fins morceaux et digérés dans un milieu de base avec 125 U/mL collagénase et 1 mg/mL trypsine. La digestion, d'une durée de 15 minutes à 37°C avec agitation (120 cycles/min), est répétée cinq fois. Après chaque digestion, les tissus sont triturés et le surnageant est récupéré. Une centrifugation à 1 000 g permet d'obtenir un culot de cellules qui est suspendu dans un milieu de base avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS). Ainsi, les cellules sont diluées (un cœur dans 80 mL) etensemencées dans des boîtes de Pétri de 150 mm. L'incubation se fait pendant deux heures à 37°C, 10% CO₂-90% air. Ensuite, les cellules n'ayant pas adhéré et les débris cellulaires sont éliminées par lavage. Les cellules adhérentes, en majorité des fibroblastes (95%), vont croître dans du milieu de base frais avec 10% FBS. Les cellules peuvent atteindre la confluence en quatre à six jours de culture. Pour certaines expériences, les

cellules ont été sevrées de sérum pendant 24 heures avec un milieu sans sérum, pour atteindre la latence.

2.2 Purification des membranes plasmatiques

Les fibroblastes cardiaques de culture primaire sont utilisés afin de purifier les membranes par une méthode d'un système à deux phases aqueuses (Figure 8) (Morré *et al*, 1994 et 1989). Les cellules sont grattées et récupérées par centrifugation à 1 000 *g* pendant six minutes. Ensuite, elles sont suspendues dans un tampon 0.2 mM EDTA et 1 mM NaHCO₃ pour obtenir un ratio de 10⁸ cellules par millilitre. Une incubation sur glace de 30 minutes permet aux cellules de gonfler, suivi d'une homogénéisation avec un Polytron pendant 30-40 secondes à 13 000 *g*. L'homogénat est centrifugé pour dix minutes à 175 *g* pour éliminer les cellules non lysées et les noyaux. Une centrifugation du surnageant est effectuée à 23 500 *g* pendant 60 minutes. Le culot est suspendu dans un tampon de 0.2 M phosphate de potassium, pH 7.2. La suspension de membranes est incorporée dans un système à deux phases aqueuses qui est composé de 40% de polyéthylène glycol 3350 (PEG) et 20% de Dextran T500 (Tableau 4). Les membranes plasmatiques ont une affinité pour la phase riche en PEG.

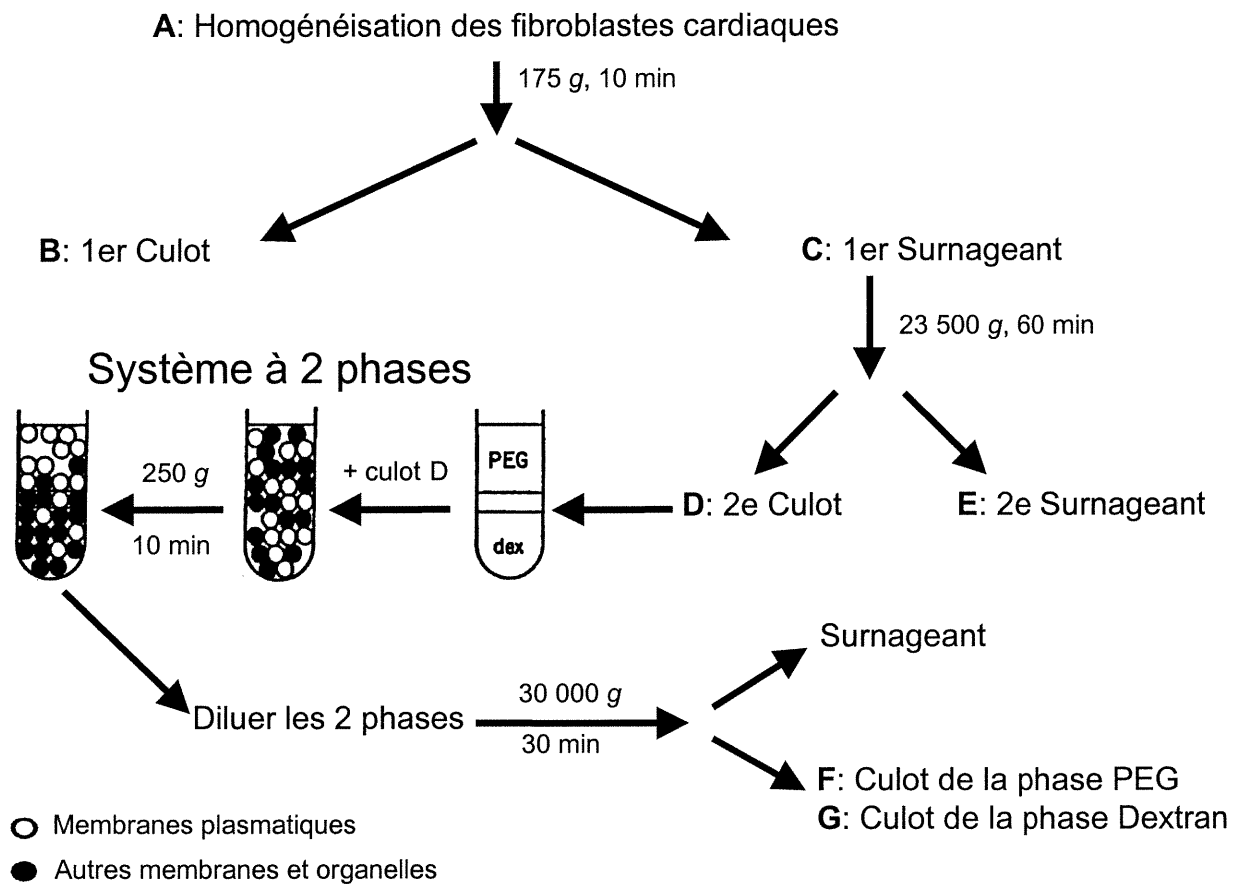


Figure 8: Étapes de la purification des membranes plasmiques de fibroblastes cardiaques.

Tableau 4: Composition du système à deux phases.

Solution	Système à deux phases
20% (w/w) Dextran T500	5.28 g
40% (w/w) Polyéthylène glycol 3350	2.64 g
200 mM phosphate de potassium, pH 7.2	0.32 mL
Ajout d'H ₂ O distillée jusqu'à un poids de	14.0 g
Membranes, suspendues dans 0.2 M phosphate de potassium	2.0 g

Le système à deux phases est mélangé par 30-40 inversions du tube à 4°C. La séparation des phases se fait par centrifugation (rotor à godets oscillants) à 150-200 g pour trois à dix minutes à 4°C. La phase supérieure, enrichie en membranes plasmiques, est diluée cinq fois avec 1 mM NaHCO₃, alors que la phase inférieure est diluée huit fois. Les membranes sont récupérées suite à une centrifugation de 30 000 g pendant 30 minutes.

Du tampon de lyse est ajouté à chaque culot obtenu lors de la purification. De plus, 10% du volume de chaque étape de la purification est gardé pour vérifier l'efficacité de cette méthode du système à deux phases. Un dosage protéique avec le réactif de Bradford permet de mesurer la concentration de protéines pour chaque échantillon.

2.3 Dosages enzymatiques

2.3.1 5'-nucléotidase et glucose-6-phosphatase

L'activité de la 5'-nucléotidase est détectée par une augmentation de la présence de phosphate inorganique (P_i) libéré dans le milieu, suite à l'hydrolyse de l'adénosine 5'-monophosphate en adénosine. Pour chaque échantillon de la purification, 15 μ g de protéines sont ajoutés à 117.5 mmol/L triéthanolamine (TEA) pH 7.6, 1.3 mM $MnCl_2$ et 23 mmol/L adénosine 5'-monophosphate (AMP) (van Husen et Gerlach, 1984).

La glucose-6-phosphatase transforme le glucose-6-phosphate (G6P) en glucose, libérant le phosphate inorganique. La réaction enzymatique de la glucose-6-phosphatase se produit dans un milieu contenant 0.1 M tampon citrate pH 6.5 et 0.08 M G6P, en présence de 15 μ g/mL de protéines (Harper, 1965).

Les réactions enzymatiques de la 5'-nucléotidase et la glucose-6-phosphatase sont arrêtées à $t = 1$ et $t = 16$ minutes par une déprotéinisation avec l'addition d'un volume d'acide perchlorique 70% à 22 volumes du mélange réactionnel (Geladopoulos *et al*, 1991). Le mélange est centrifugé à 15 000 g pendant trois minutes et le surnageant est gardé pour la détermination du phosphate

inorganique. Le phosphate inorganique libéré est mesuré par la méthode du vert de malachite.

2.3.2 Détermination du phosphate inorganique

Une méthode colorimétrique de vert de malachite est utilisée pour connaître la concentration de P_i libéré par les marqueurs enzymatiques (Geladopoulos *et al*, 1991; Baykov *et al*, 1988).

Un volume de 60 mL d'acide sulfurique concentré est ajouté à 300 mL d' H_2O distillée. Lorsque la solution atteint la température de la pièce, 0.44 g du colorant vert de malachite est ajouté. Le jour du dosage, 2.5 mL de 7.5% ammonium molybdate sont ajoutés à 10 mL de la solution colorante, suivi de 0.2 mL de 11% Tween 20. Un volume du réactif colorant (0.2 mL) est ajouté à quatre volumes de l'échantillon à analyser (25 μ L réaction de P_i + 775 μ L H_2O). Chaque échantillon est analysé en triplicata. Une attente de dix minutes est nécessaire pour le développement de la couleur. L'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 630 nm. En parallèle, une courbe standard est préparée avec une concentration croissante de 0 à 3.0 nmoles de P_i , à partir de 50 μ M NaH_2PO_4 .

2.3.3 Succinate déshydrogénase

L'activité de la succinate déshydrogénase est déterminée par une méthode colorimétrique utilisant le chlorure d'iodonitrotétrazolium (INT) comme récepteur d'électron (Munujos *et al*, 1993). Selon le cycle de Krebs, le succinate est transformé en fumarate par l'enzyme. De plus, la succinate déshydrogénase peut réduire le sel de tétrazolium pour obtenir du formazan. Ainsi, dans le milieu réactionnel, l'activité enzymatique est mesurée en présence de succinate en suivant la formation du formazan.

Le mélange réactionnel est composé de 100 mmol/L TEA pH 8.3, 0.5 mmol/L EDTA, 2 mmol/L KCN, 2 mmol/L INT, 12 g/L Cremophor EL et 20 mol/L succinate, pH 7.4. La réaction enzymatique débute à l'ajout de 80 µg/mL de protéines. Pendant 15 minutes, il y a une lecture du développement de la couleur à chaque minute, à une longueur d'onde de 500 nm.

2.4 Iodation de l'échistatine

L'échistatine est iodée par la méthode de lactoperoxydase (Thibault, 2000). Une concentration de 15 µg d'échistatine est incubée dans 80 µL de tampon 0.05 M phosphate de sodium, pH 7.4, en présence de 1 mCi de Na¹²⁵I et 15 µL de

lactoperoxidase. L'iodation débute par l'ajout successif de trois volumes de 15 μL de 0.002% H_2O_2 , à cinq minutes d'intervalle. Le produit iodé est purifié par chromatographie liquide à haute pression avec un gradient de CH_3CN dans 0.1% acide trifluoroacétique.

2.5 Localisation des intégrines au niveau des membranes

Pour chaque fraction de la purification, 10 μg de protéines solubilisées sont incubés dans un volume de 20 μL en présence de 250 000 cpm (12.5 nmol/L) d' ^{125}I -échistatine, dans un tampon 0.05 M HEPES pH 7.4 et 5 mM MnCl_2 , à la température de la pièce. Après 90 minutes, un tampon d'échantillon contenant du SDS est dilué cinq fois dans chaque échantillon. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE, puis le gel est coloré au bleu de Coomassie R-250, séché et exposé pour une autoradiographie.

2.6 Localisation des sous-unités libres au niveau des membranes

Des fibroblastes cardiaques en culture primaire sont digérés avec une solution composée de 0.3% collagénase, 0.03% hyaluronidase, 0.005% chymotrypsine et 0.48 mg/mL dispase dans un milieu de DMEM, pH 7.4. Les cellules sont

recueillies après une centrifugation à 1 000 *g*. Remises en suspension dans un milieu contenant du DMEM et 5 mM MnCl₂, les cellules sont incubées avec 60 millions cpm (12 nmol/L) d'¹²⁵I-échistatine, afin de saturer les intégrines de la surface cellulaire. En parallèle, un contrôle est effectué avec des cellules sans la présence d'échistatine. Les cellules sont centrifugées après 90 minutes d'incubation. Elles sont lysées avec 500 µL de 0.05 M HEPES pH 7.4, 5 mM MnCl₂, 5 µM pepstatine, 10 µM leupeptine, 50 KIU/mL aprotinine et 1 mM PMSF, pendant 15 minutes, à 4°C. Une homogénéisation avec un sonicateur est effectuée trois fois, pendant 15 secondes, suivi d'une centrifugation de 15 minutes à 12 000 *g* afin de récupérer les noyaux et les éléments du cytoplasme. Le surnageant est recueilli pour vérifier l'enrichissement en membranes. Ensuite, du tampon de lyse est ajouté au culot pour une incubation de 15 minutes à 4°C. Le deuxième surnageant est gardé après une centrifugation de cinq minutes à 47 800 *g* pour recueillir les membranes. Un dosage de protéines et un dosage enzymatique de la 5'-nucléotidase sont ensuite réalisés pour chaque échantillon. Dix microgrammes de protéines de chaque échantillon, en présence de tampon d'échantillon contenant du SDS, sont séparés par un gel d'électrophorèse et transférés sur une membrane de nitrocellulose pour des immunobuvardages. Ainsi, plusieurs séries d'échantillons ont été préparées pour ces immunobuvardages avec six anticorps différents contre les sous-unités (β1, β3, α3, α5, α8 et αv) des intégrines retrouvées à la surface des fibroblastes cardiaques.

2.7 Modification de l'expression des intégrines actives

À partir d'une culture primaire, des fibroblastes cardiaques, sevrés de sérum pendant 24 heures, sont stimulés ou non avec du sérum bovin fœtal pour une période de 48 heures. Une solubilisation des fibroblastes est effectuée en présence de tampon de lyse pendant 15 minutes à 4°C. Après une centrifugation à 27 000 g pour dix minutes, les protéines sont mesurées par la méthode de dosage de Bradford. Dix microgrammes de protéines sont incubés avec I¹²⁵I-échistatine (0 et 600 000 cpm ou 30 nmol/L) dans un tampon 0.05 M HEPES pH 7.4 et 5 mM MnCl₂, pendant 90 minutes. Après l'incubation, du tampon d'échantillon contenant du SDS est ajouté (dilution 1:5) et les protéines sont séparées par SDS-PAGE pour réaliser des immunobuvardages avec des anticorps contre les sous-unités α et β de chaque intégrine.

2.8 Saturation des intégrines par l'échistatine

Des fibroblastes cardiaques quiescents depuis 24 heures sont stimulés pour une période de 48 heures avec du FBS, de l'angiotensine II (3×10^{-8} M) ou du TGF- β (3 ng/mL) dans du milieu de culture. Un contrôle est réalisé en laissant les cellules sevrées de sérum dans un milieu de culture sans sérum. Suite à une solubilisation des fibroblastes et un dosage protéique, 10 μ g de protéines

de chaque stimulation (Ctl, FBS, Ang II et TGF- β) sont incubés avec des concentrations croissantes d'¹²⁵I-échistatine (0 à 600 000 cpm ou 30 nmol/L) dans un tampon 0.05 M HEPES pH 7.4 et 5 mM MnCl₂. Après 90 minutes, l'incubation est arrêtée en ajoutant du tampon d'échantillon contenant du SDS. La séparation des protéines sur SDS-PAGE est suivie de plusieurs immunobuvardages avec six anticorps différents. Ainsi, six séries de protéines de chaque stimulation sont préparées en présence d'une concentration croissante d'¹²⁵I-échistatine. Lors de la quantification des bandes radioactives par PhosphorImager, une courbe standard d'¹²⁵I-échistatine est préparée, puis déposée sur une membrane de nitrocellulose. La concentration de l'échistatine iodée est mesurée par un compteur gamma. Cette courbe standard permettra de calculer la concentration d'échistatine impliquée dans les complexes intégrine-désintégrine.

2.9 Électrophorèse et Immunobuvardage

Pour les différentes expériences, les protéines sont déposées sur un gel d'électrophorèse non dénaturant (sans thiol et sans chauffage) de 6% de polyacrylamide (SDS-PAGE), dans un système Mini-Protean II, selon la méthode de Laemmli (1970). Le gel d'électrophorèse est calibré avec une échelle de standards protéiques colorés (BenchMark™ Prestained Protein

Ladder, BioRad Laboratories). La migration du gel est arrêtée lorsque le marqueur protéique rouge (\approx 60-65 kDa) atteint le bas du gel. Ensuite, le gel d'électrophorèse est coloré avec 0.05% bleu de Commassie R250 dans une solution méthanol-CH₃COOH-eau (5:1:5), puis décoloré avec la solution 1:1:9. Lorsque séché, le gel est exposé pour une autoradiographie sur un film X-OMAT AR5 (Kodak), pendant 45 minutes, à -80°C. Les complexes intégrine-désintégrine, représentés par des bandes radioactives, sont quantifiés par un système PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Dans le cas d'immunobuvardage, les protéines séparées par SDS-PAGE sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL (Amersham) dans un tampon de transfert, pendant 60 minutes, à 4°C. Les membranes de nitrocellulose sont prêtes pour les immunobuvardages, après une exposition sur film et sur PhosphorImager. Les sites non spécifiques des membranes sont bloqués pendant 60 minutes avec un tampon d'immunobuvardage et 4% de sérum de veau. Ensuite, les membranes sont lavées pendant cinq minutes et ce, quatre fois avec du tampon d'immunobuvardage. Chaque membrane de nitrocellulose est incubée avec un anticorps différent contre une des sous-unités des intégrines comme l'anti- β 1 (Ha2/5 ou no. 130), anti- β 3 (2C9), anti- α 3 (1920), anti- α 5 (1928), anti- α 8 et anti- α v (1930). L'anticorps est dilué (1/1 000) dans un volume de 0.1mL tampon d'immunobuvardage par cm² de membrane. Après une incubation de 90 minutes, la membrane est lavée avec du tampon

d'immunobuvardage. Selon le premier anticorps, la membrane est exposée avec un anticorps anti-lapin IgG conjugué à la peroxidase de raifort (1:25 000, avec 2% sérum de veau) ou un anticorps anti-hamster Ig biotinylé (1:1 000), suivi d'une incubation avec la streptavidine peroxidase de raifort. L'activité de la peroxidase est révélée par un substrat chemiluminescent (Super Signal, Pierce). Les anticorps anti- α et anti- β des intégrines reconnaissent la présence des sous-unités α et β libres ayant un poids moléculaire connu variant entre 90 et 180 kDa, sous des conditions dénaturantes. De plus, ces anticorps peuvent reconnaître les sous-unités impliqués dans la formation de l'intégrine associée à l'échistatine. Pour cette étude, la quantification des bandes des sous-unités libres est réalisée afin de connaître l'implication des sous-unités α et β dans la formation du complexe intégrine-désintégrine. Cette quantification est effectuée par densitométrie et analysée avec le logiciel Alphamager (Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA).

2.10 Immunocytochimie

Des lames de 4 puits sont enrobées avec de la fibronectine humaine ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) dans un tampon PBS pendant deux heures à 37°C . Les fibroblastes cardiaques sont digérés avec la solution de digestion contenant de la collagénase et de la dispase. Ensuite, les cellules sont centrifugées et un compte cellulaire est

effectué. Dans chaque puits, 30 000 cellules sont incubées pendant 90 minutes à 37°C et fixées avec 4% paraformaldéhyde. Les sites non spécifiques sont bloqués avec 0.05% Triton X-100, 3% sérum de chèvre (NGS) et 3% BSA dans un tampon PBS. L'incubation dure 30 minutes dans une chambre humide, à la température de la pièce. Un double marquage est effectué dans chaque puits: un anticorps spécifique à chaque sous-unité des intégrines et un anticorps contre la vinculine. Les anticorps sont dilués dans un tampon PBS, 0.05% Triton X-100, 3% NGS et 3% BSA. Les anticorps utilisés sont l'anti- β 1 (no. 130; dilution 1:150), anti- β 3 (F11; 1:50), anti- α 3 (no. 8-4; 1:100), anti- α 5 (1928; 1:100), anti- α 8 (1:100), anti- α v (1930; 1:100) et anti-vinculine (1:300). Après une incubation à 4°C pendant toute la nuit, les puits sont lavés avec du PBS. Comme deuxième anticorps, un anti-lapin conjugué avec la fluorescéine ou un anti-souris conjugué avec la rhodamine est dilué (1:100) dans un tampon PBS, 0.05% Triton X-100, 3% NGS et 3% BSA. L'anti-souris reconnaît les anticorps primaires de la sous-unité β 3 et la vinculine, alors que l'anti-lapin marque les autres sous-unités des intégrines à la surface des cellules. L'immunofluorescence est observée avec un microscope Axiovert 100M (Zeiss, Allemagne).

CHAPITRE 3:

Résultats

Chapitre 3: Résultats

Localisation des intégrines membranaires

Afin de déterminer si les intégrines sont localisées sur la surface membranaire, les membranes de fibroblastes cardiaques sont isolées par la méthode d'un système à deux phases. Une vérification de l'enrichissement en membranes est réalisée à chaque étape de cette purification par la détection de l'activité de différents marqueurs enzymatiques de la cellule. Les intégrines sont localisées sur les membranes purifiées en se servant du complexe intégrine-désintégrine.

La méthode de fractionnement des cellules en culture permet d'obtenir séparément les noyaux, les membranes plasmiques et autres membranes, de même que les organelles cellulaires. Les membranes cellulaires sont séparées par une combinaison de deux polymères différents, le dextran et le polyéthylène glycol. Les membranes possèdent différentes propriétés à leur surface permettant la séparation entre les deux phases aqueuses. Les membranes plasmiques ont une affinité pour la phase riche en polyéthylène glycol (PEG), et sont ainsi séparées de toutes les autres organelles (Morré D.J. et Morré D.M., 1989).

Lors de la purification des membranes plasmiques (Figure 8), une fraction de chaque étape a été retenue afin de vérifier l'enrichissement en membranes de la préparation. Ainsi, la fraction A représente l'homogénat total. Les fractions B et C sont obtenues suite à une centrifugation de l'homogénat. Après la centrifugation à plus haute vitesse du surnageant C, le culot D contient des membranes grossièrement purifiées. La fraction D est incorporée au système à deux phases. Les membranes ayant une affinité pour le PEG sont recueillies à la fraction F. Les autres membranes et organelles de la cellule se retrouvent dans la fraction G.

Pour la vérification de cet enrichissement en membranes, un dosage de l'activité de certains marqueurs enzymatiques est effectué pour chaque étape de la purification. Par une méthode colorimétrique, nous détectons l'activité enzymatique de marqueurs présents au niveau des différentes organelles de la cellule. Les marqueurs analysés sont la 5'-nucléotidase, la glucose-6-phosphatase et la succinate déhydrogénase, respectivement localisés au niveau de la membrane plasmique, de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique. Selon la figure 9 (A et B), l'échantillon F riche en membranes ne contient qu'une faible sinon aucune activité enzymatique de la glucose-6-phosphatase et la succinate déhydrogénase, respectivement. Cependant, l'activité est plus forte pour les échantillons moins purifiés. Pour l'activité de la 5'-nucléotidase, l'échantillon F montre une très grande activité enzymatique désignant l'enrichissement en membranes (Figure 9C).

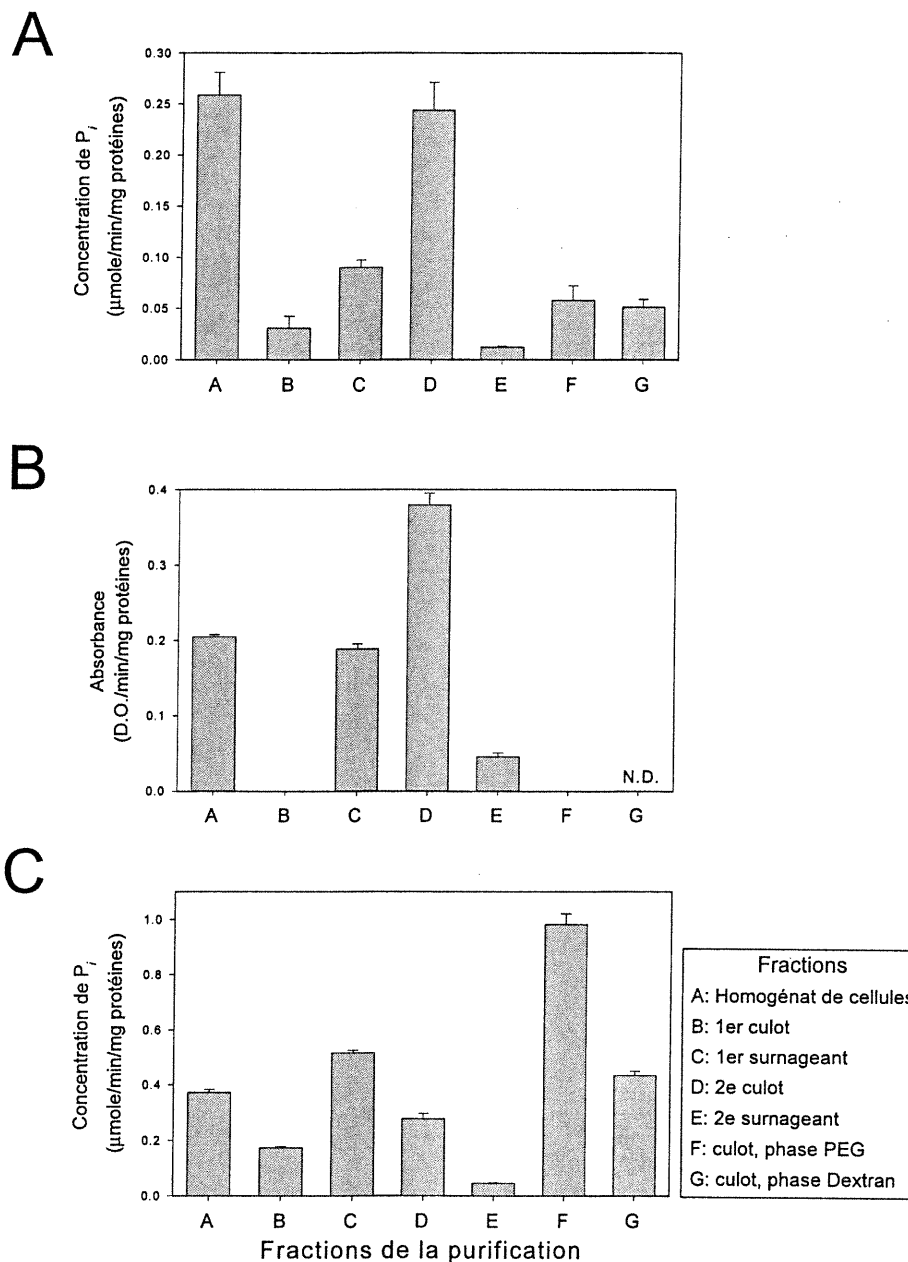


Figure 9: Dosage de l'activité des marqueurs enzymatiques sur les fractions de la purification. Le phosphate inorganique libéré par la glucose-6-phosphatase (A) et la 5'-nucléotidase (C) est détecté par la méthode du vert de malachite. L'activité enzymatique de la succinate déshydrogénase (B) est déterminée par la méthode colorimétrique utilisant l'INT, en suivant la formation du formazan. Chaque résultat est la moyenne de triplicata avec la mesure d'erreur. Ces résultats sont représentatifs de 4 répétitions d'expériences. (N.D.: non déterminé).

De plus, l'enrichissement de la préparation en membranes est vérifiée en incubant des protéines de chaque étape avec 250 000 cpm (12.5 nmol/L) d'¹²⁵I-échistatine. Après une séparation sur SDS-PAGE, les complexes intégrine-désintégrine sont détectés sur une autoradiographie et mesurés par PhosphorImager. À la figure 10A, trois bandes radioactives du complexe intégrine-désintégrine sont distinguées pour chacune des étapes de la purification. Ces bandes radioactives ont été précédemment identifiées par immunoblot comme étant les cinq intégrines suivantes: $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \nu\beta 1$ et $\alpha \nu\beta 3$ (Thibault, 2000). L'intégrine $\alpha 8\beta 1$ a été identifiée au niveau de la bande de 220 kDa. La deuxième bande (210 kDa) comprend les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha \nu\beta 1$. L'intégrine $\alpha \nu\beta 3$ se situe à la bande ayant un poids moléculaire de 180 kDa. Suite à la quantification des complexes intégrine-échistatine, les bandes des échantillons D et particulièrement F, émettent une intensité plus forte par rapport aux fractions moins purifiées (Figure 10B). La présence des intégrines au niveau de la fraction G, contenant les organelles, n'a pu être déterminée. Ainsi, une concentration importante des intégrines se retrouve dans les fractions D et F qui contiennent majoritairement les membranes.

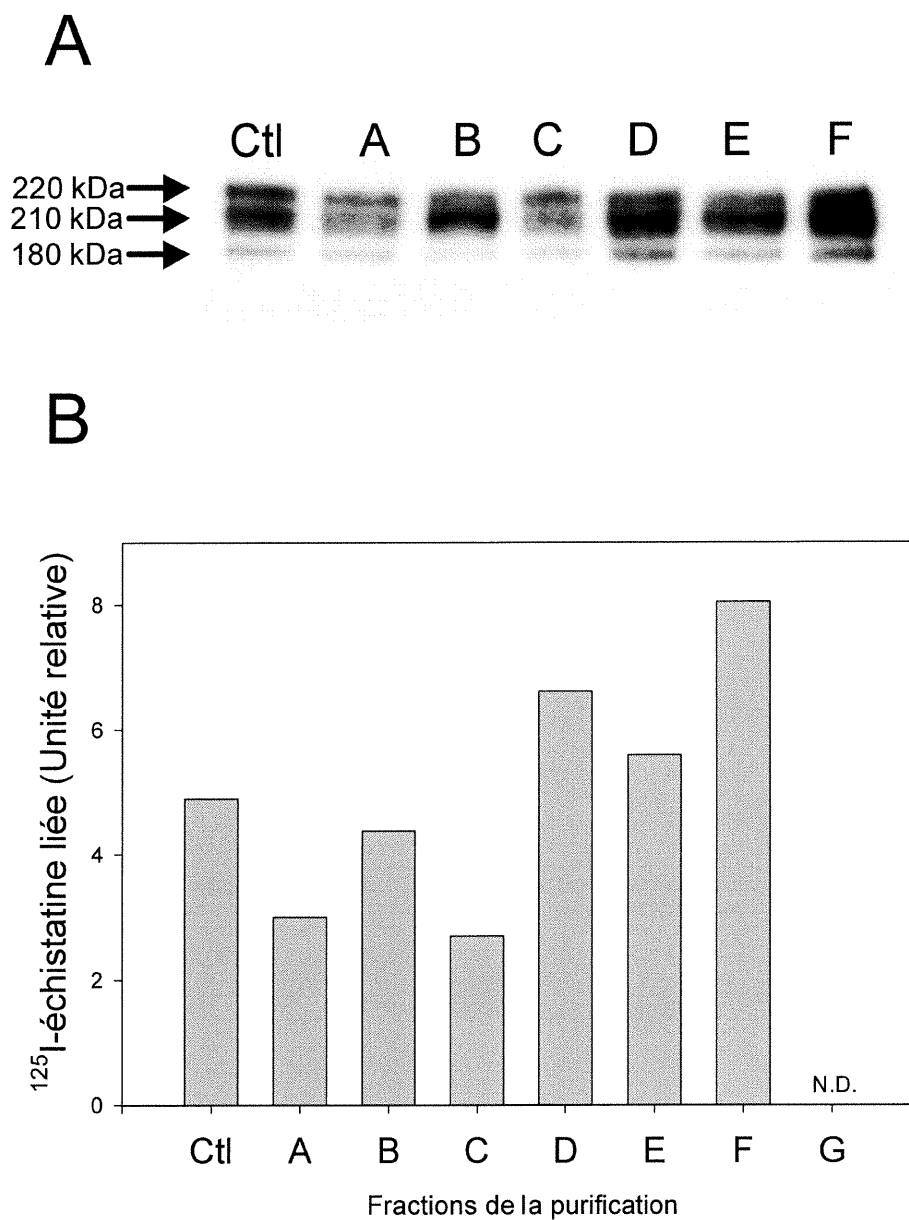


Figure 10: Localisation des intégrines membranaires. Représentation des complexes intégrine-échistatine radioactifs pour chaque étape de la purification (**A**). Quantification des bandes radioactives de chaque fraction (**B**). Chaque échantillon purifié (10 μg de protéines) peut être comparé au contrôle (10 μg de protéines non purifiées obtenues à partir de cellules traitées au tampon de lyse). Pour l'explication de chaque fraction, voir la légende de la figure 9. (N.D.: non déterminé).

Localisation des sous-unités libres au niveau des membranes

À partir de fibroblastes cardiaques en suspension, une saturation des intégrines par l'échistatine est réalisée pour connaître l'état de liaison des intégrines envers l'échistatine en détectant les sous-unités résiduelles libres présentes sur les membranes purifiées. Lorsque les intégrines de la surface cellulaire sont saturées, une diminution de la présence des sous-unités α et β libres devrait être observée puisque tous les sites sont occupés par l'échistatine. Cette hypothèse est vérifiée avec l'immunobuvardage pour la détection des sous-unités α et β . Sur l'immunobuvardage, les sous-unités sont présentes sous deux formes: elles peuvent être (i) impliquées dans un complexe intégrine-échistatine, ayant un poids moléculaire de 220 kDa ($\alpha 8\beta 1$), 210 kDa ($\alpha 3/5/v\beta 1$) ou 180 kDa ($\alpha v\beta 3$); ou (ii) sous forme libre avec un poids moléculaire variant entre 90 et 180 kDa, selon la sous-unité. Après une saturation des intégrines par l'échistatine, la présence des sous-unités libres devrait être diminuée sur l'immunobuvardage.

À partir de fibroblastes cardiaques en suspension ($\approx 8 \times 10^6$ cellules), les intégrines sont saturées avec une concentration de 0 et 60×10^6 cpm (12 nmol/L) d' ^{125}I -échistatine. Puis les membranes plasmiques sont solubilisées dans un tampon de lyse suite à une homogénéisation et deux centrifugations. Après la première centrifugation de 12 000 g, le surnageant est recueilli (A: sans échistatine et B: avec échistatine). Les surnageants C et D (sans et avec

échistatine, respectivement) sont gardés après la dernière centrifugation de 47 800 *g*.

Afin de vérifier l'enrichissement en membranes, les échantillons sont dosés pour l'activité enzymatique de la 5'-nucléotidase (Figure 11A). La présence de membranes plasmiques est plus élevée pour les échantillons purifiés C et D. Aucune différence n'est observée entre les échantillons avec et sans échistatine.

Une concentration de 10 μg de protéines de chaque fraction est séparée par SDS-PAGE dans des conditions non dénaturantes pour permettre la réalisation d'immunobuvardages avec des anticorps spécifiques à chaque intégrine à motif RGD présente sur les fibroblastes cardiaques (anti- $\beta 1$: Ha2/5 ou no. 130 de R.O Hynes, anti- $\beta 3$: 2C9, anti- $\alpha 3$: 1920, anti- $\alpha 5$: 1928, anti- $\alpha 8$ de Dr. Schnapp et anti- αv : 1930) . Sur l'autoradiographie, les bandes radioactives des échantillons B et D ont été quantifiées par PhosphorImager. Les complexes intégrine-désintégrine $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 3/5/v\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ se retrouvent majoritairement au niveau de l'échantillon purifié D, démontrant que l'échistatine semble détecter une présence abondante de dimères au niveau des membranes de la surface cellulaire (Figure 11B). Suite à la révélation des immunobuvardages, il y a une faible présence des différentes sous-unités

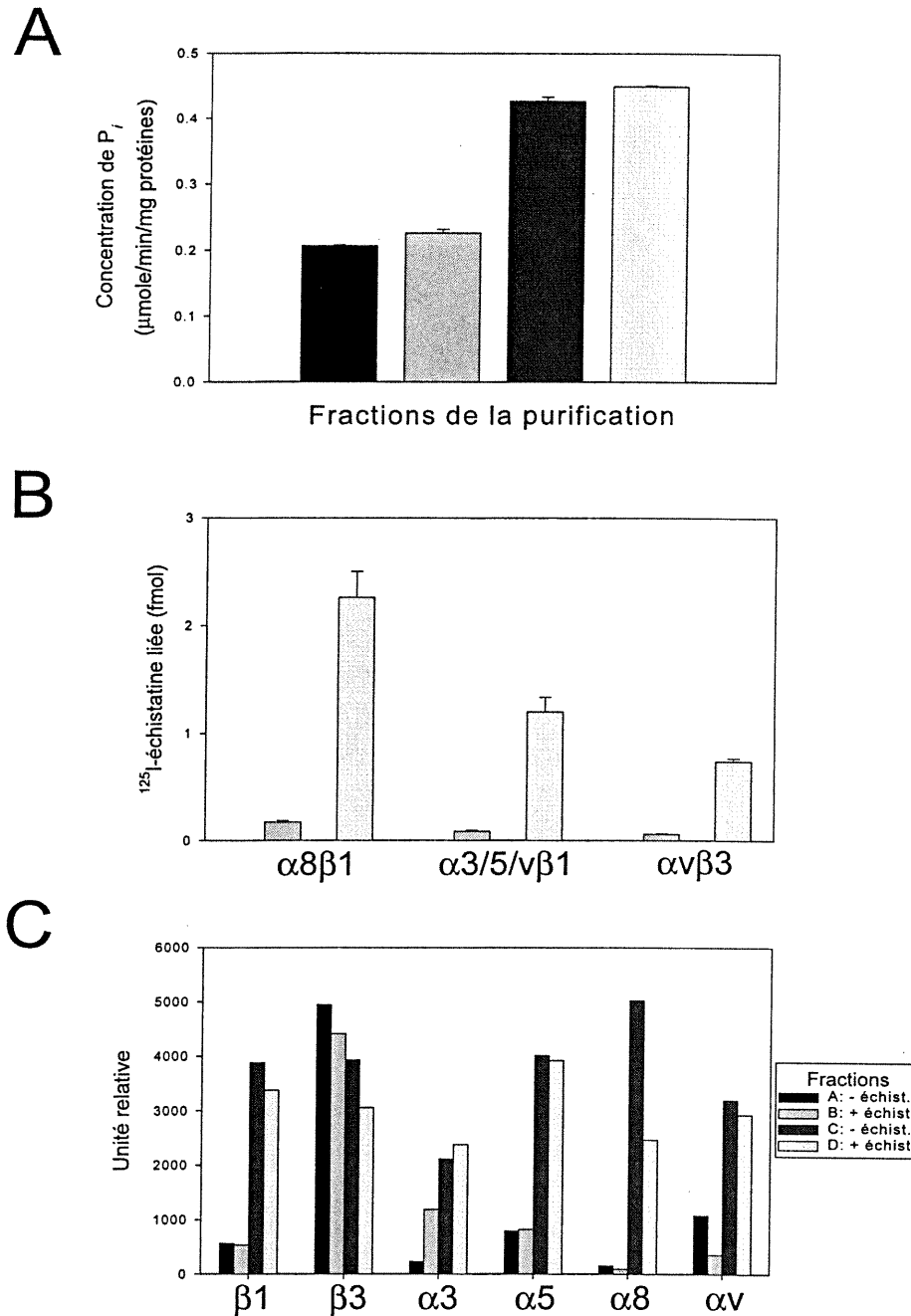


Figure 11: Localisation des sous-unités libres sur les membranes.

A) Vérification de l'enrichissement en membranes par un dosage de l'activité enzymatique de la 5'-nucléotidase ($n=3$). **B)** Quantification des intégrines de la surface cellulaire liées à l' ^{125}I -échistatine ($n=6$). **C)** Quantification des bandes obtenues aux immunobuvardages avec les anticorps reconnaissant les sous-unités des intégrines ($n=1$). Les fractions A et B sont les premiers surnageants recueillis. Les fractions C et D représentent les deuxièmes surnageants. Ces expériences ont été répétées à trois reprises. (+ ou - échist.: avec ou sans échistatine).

libres (excepté $\beta 3$) pour les échantillons A et B (Figure 11C), en parallèle avec une proportion réduite du complexe intégrine-désintégrine (Figure 11B). Ces échantillons A et B contiennent alors une faible présence d'intégrines en relation avec une activité réduite de la 5'-nucléotidase pour la détection des membranes (Figure 11A). À la figure 11C, la concentration de sous-unités libres est plus élevée pour les échantillons purifiés C et D signifiant la présence des intégrines au niveau des membranes plasmiques. Avec l' ^{125}I -échistatine, il y a une légère diminution (2 à 20%) de la présence de certaines sous-unités libres ($\beta 1$, $\beta 3$, $\alpha 5$ et αv). La sous-unité $\alpha 8$ semble être fortement impliquée (49%) dans la formation du complexe intégrine-échistatine (Figure 11C).

Modification de l'expression des intégrines

Lors de la culture cellulaire, la présence de certains éléments nutritifs peut avoir un effet sur la croissance des cellules et sur l'expression des intégrines à leur surface. Par cette expérience, nous voulons vérifier si la présence de sérum bovin fœtal (FBS) dans le milieu de culture cause une modification de l'expression des intégrines de la surface cellulaire. De plus, nous connaissons l'interaction des intégrines envers le ligand en détectant par immunobuvardage les sous-unités résiduelles libres, suite à la saturation des intégrines par l'échistatine.

À partir de fibroblastes cardiaques quiescents (sans FBS pendant 48 heures) et stimulés (avec FBS pendant 48 heures), 10 µg de protéines sont incubés avec 0 et 600 000 cpm (30 nmol/L) d'¹²⁵I-échistatine pour effectuer des immunobuvardages. La quantification par densitométrie des bandes des sous-unités libres est analysée par le logiciel Alphamager (Figures 12 et 13). La modification de l'expression des intégrines en présence de FBS est observée seulement pour la sous-unité α8 (Figure 13B) avec une augmentation de 67%. Les sous-unités α5, α8 et αv des intégrines participent à l'interaction avec l'échistatine, suite à une diminution importante (50 à 90%) de la présence des sous-unités libres (Figure 13). Les sous-unités β1, β3 et α3 semblent être majoritairement sous forme libre, faiblement impliquées dans la liaison intégrine-désintégrine (Figure 12).

Modulation de l'affinité et de l'abondance des intégrines de type RGD

Lors de cette expérience, nous désirons déterminer l'expression des intégrines et leur état de liaison envers l'échistatine suite à la stimulation des fibroblastes cardiaques par différents facteurs de croissance comme l'Ang II, le TGF-β1 et le FBS. Ainsi, des protéines de chaque stimulation sont incubées avec des concentrations croissantes de 0 à 30 nmol/L d'¹²⁵I-échistatine. Les protéines

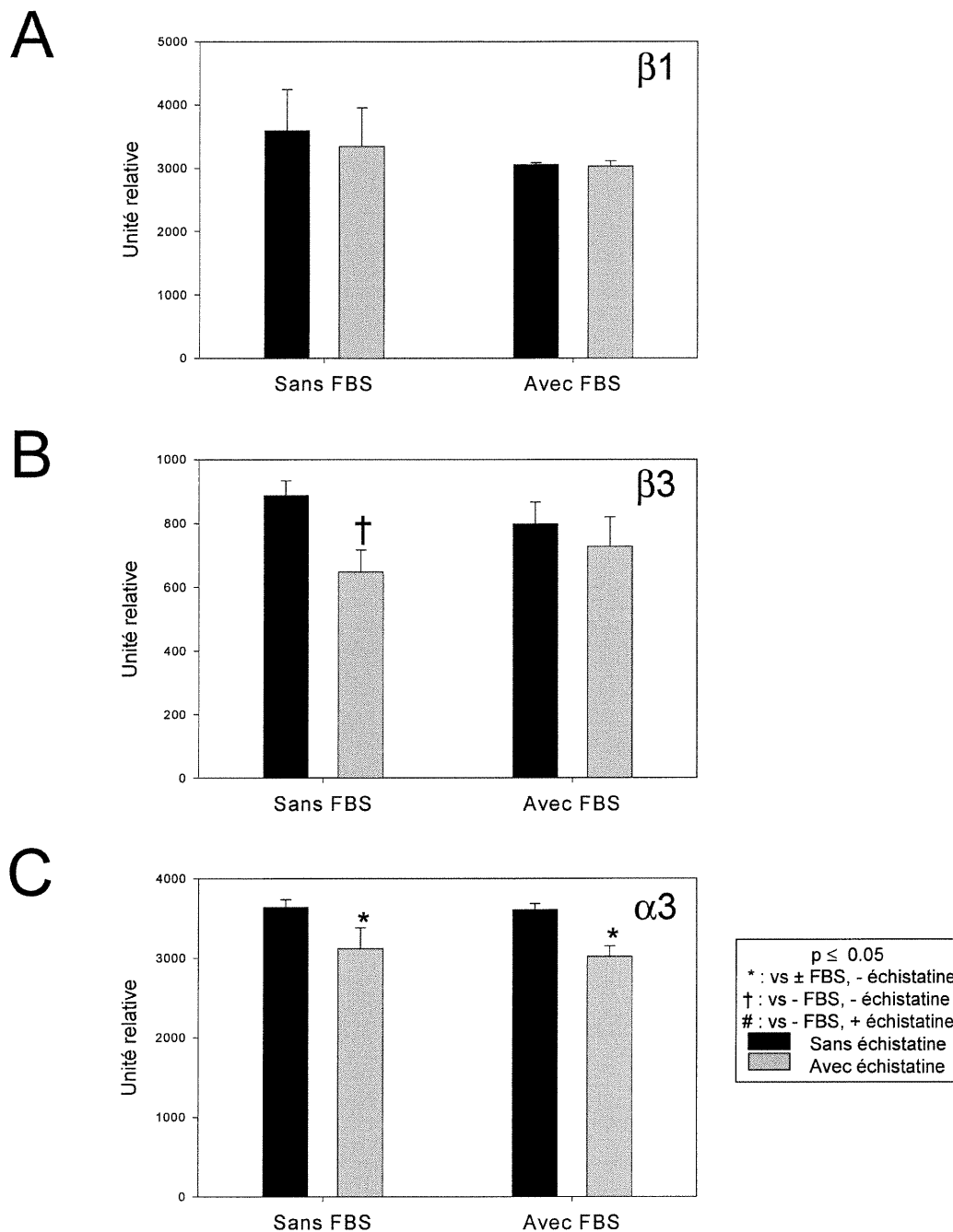


Figure 12: Modification de l'expression des intégrines actives $\beta 1$, $\beta 3$ et $\alpha 3$. À partir de fibroblastes cardiaques stimulés ou non, des protéines sont incubées avec 0 et 600 000 cpm d'échistatine iodée. Des immunobuvardages sont réalisés avec des anticorps spécifiques aux sous-unités $\beta 1$ (A), $\beta 3$ (B) et $\alpha 3$ (C) afin d'observer une modification de l'expression des intégrines en présence de FBS et l'interaction des intégrines envers l'échistatine.

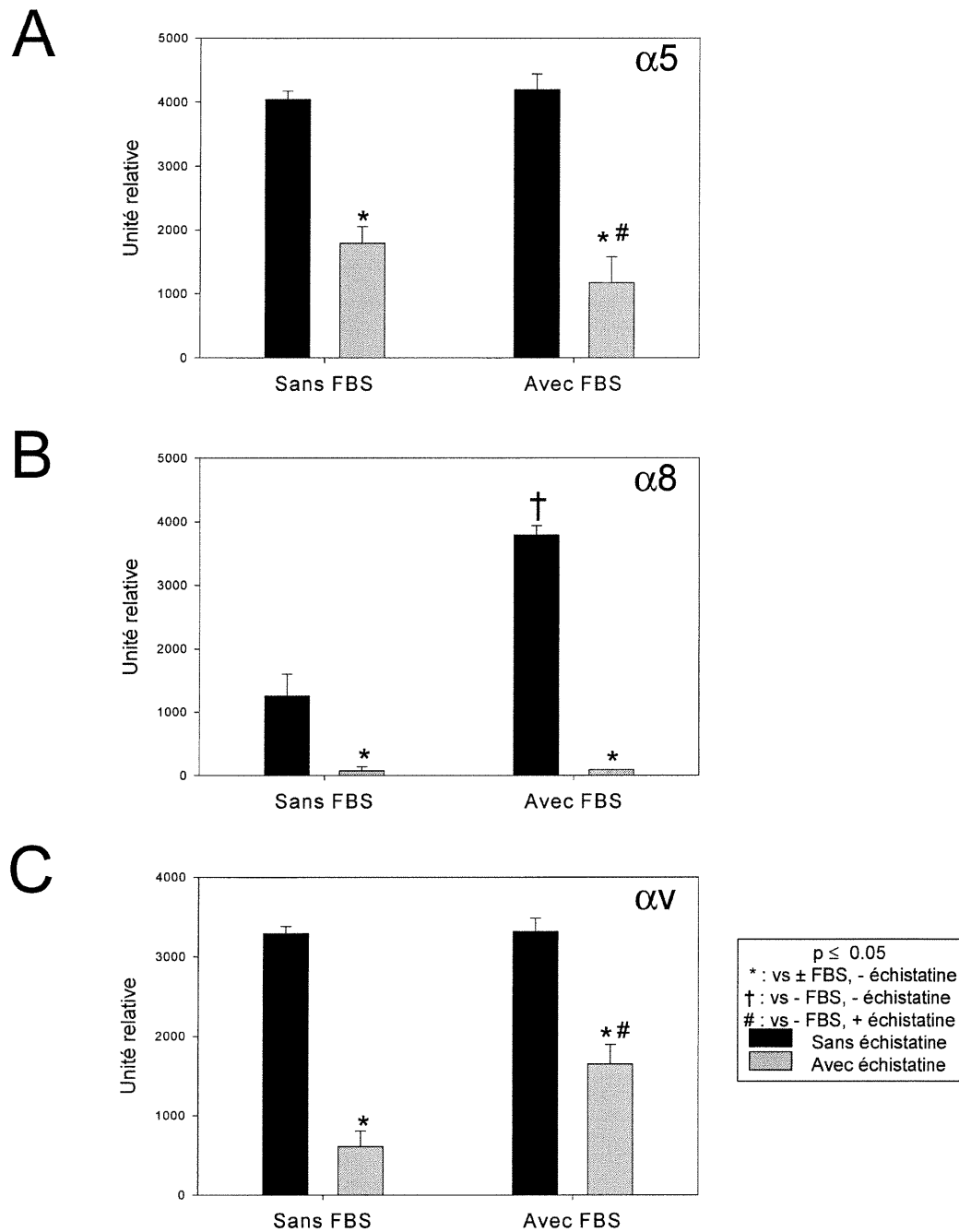


Figure 13: Modification de l'expression des intégrines actives $\alpha 5$, $\alpha 8$ et αv . Des immunobuvardages avec les anticorps spécifiques aux sous-unités $\alpha 5$ (A), $\alpha 8$ (B) et αv (C) permettent d'observer une modification de l'expression des intégrines en présence de FBS et l'interaction des intégrines envers l'échistatine.

sont séparées par SDS-PAGE, suivi de l'autoradiographie des bandes radioactives. Une quantification de ces bandes radioactives grâce au logiciel PhosphorImager permet l'obtention des courbes de saturation de chaque intégrine (densité des sites) et l'affinité des intégrines par leur ligand. L'autoradiographie des bandes radioactives pour chaque stimulation est présentée à la figure 14. En parallèle avec le contrôle (Figure 14A), il y a une surexpression des intégrines, surtout $\alpha 8\beta 1$, lors de la stimulation des fibroblastes cardiaques par l'angiotensine II (Figure 14B) et le TGF- $\beta 1$ (Figure 14C). Cette surexpression de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ est représentée par les courbes de saturation (Figure 15A). Une légère modification de l'expression de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ est observée suite à la stimulation des cellules par l'Ang II et du FBS (Figure 15C).

La quantification des bandes radioactives révèle une saturation des intégrines $\alpha 8\beta 1$ (Figure 15A) et $\alpha v\beta 3$ (Figure 15C) autour d'une concentration de 5 nmol/L d' ^{125}I -échistatine ajoutée. Les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 1$ de la deuxième bande (Figure 15B) sont saturées à une concentration de 10 nmol/L d'échistatine ajoutée.

Grâce à une courbe standard d'échistatine iodée, nous pouvons calculer la concentration d'échistatine liée à chaque bande radioactive. Pour 10 μg de

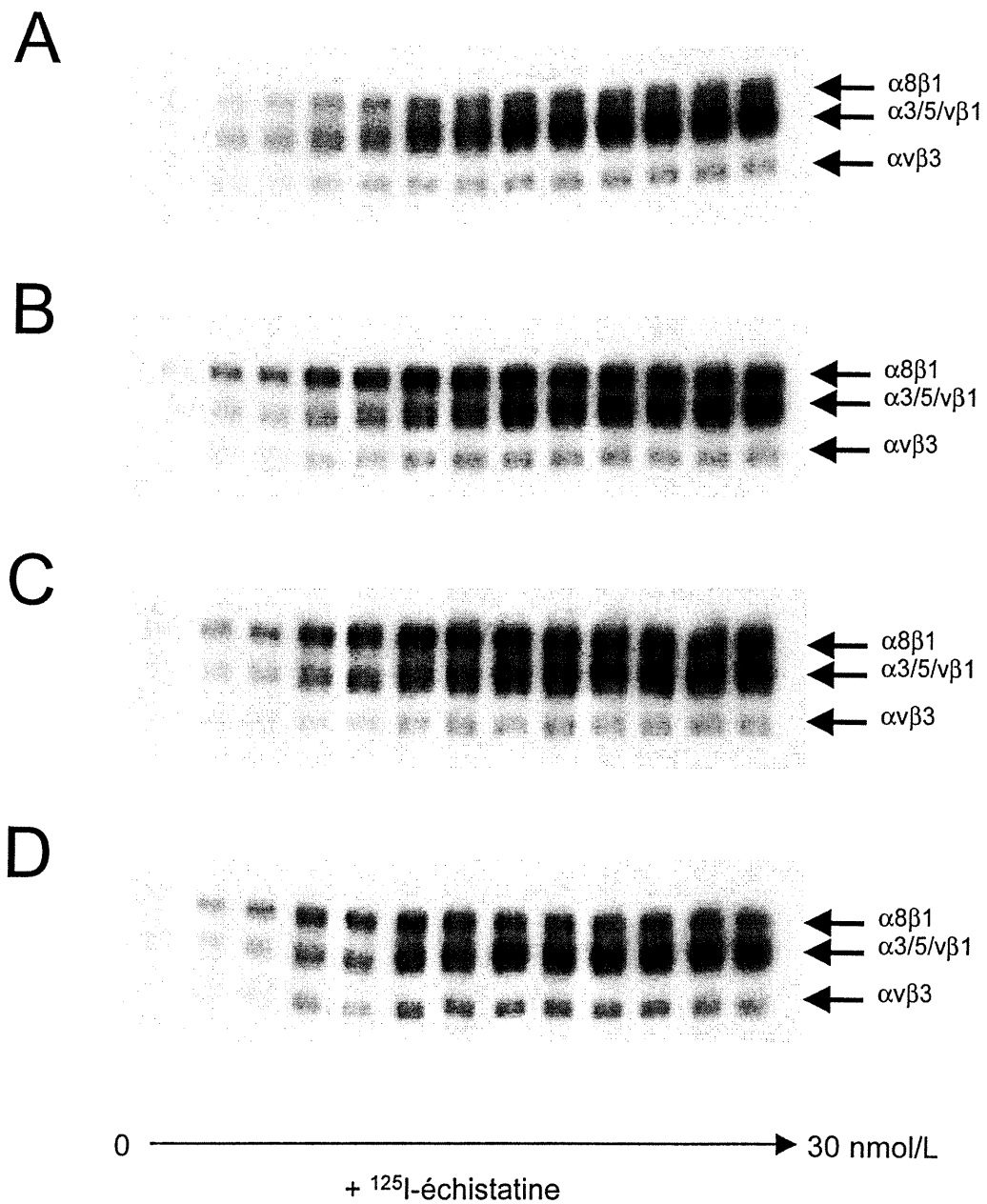
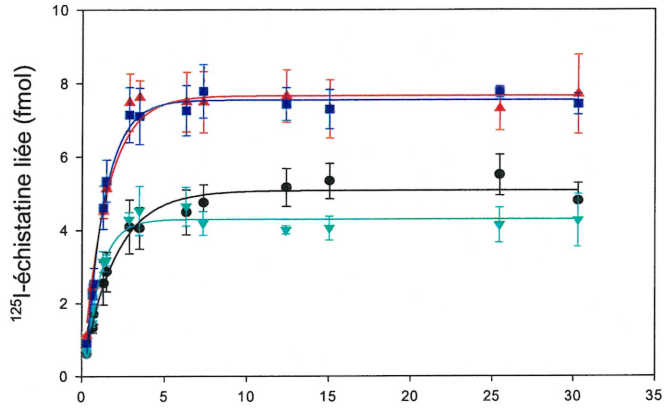


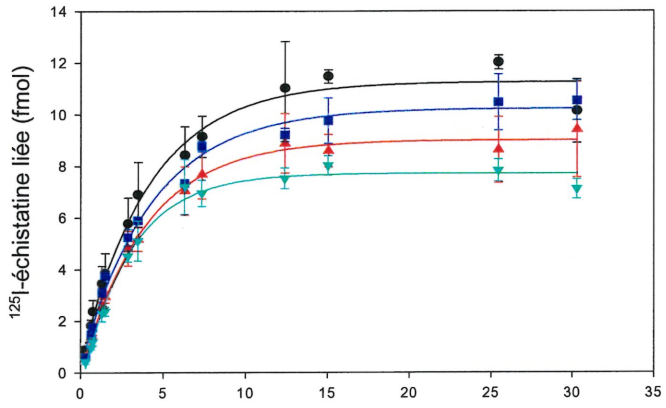
Figure 14: Saturation des intégrines par l'échistatine. Des protéines sont incubées avec des concentrations croissantes d'échistatine iodée. Ces protéines sont obtenues suite à la stimulation ou non des fibroblastes cardiaques par différents facteurs de croissance: **A:** contrôle, **B:** Ang II (3×10^{-8} M), **C:** TGF- $\beta 1$ (3 ng/mL) et **D:** FBS (10%).

Figure 15: Courbes de saturation des intégrines par l'échistatine. Des courbes de saturation sont obtenues à partir de la quantification des bandes radioactives par le logiciel PhosphorImager. Nous observons la saturation des intégrines $\alpha 8\beta 1$ (**A**), $\alpha 3/5/v\beta 1$ (**B**) et $\alpha v\beta 3$ (**C**) par l'échistatine ajoutée et la concentration d'échistatine nécessaire pour une liaison avec l'intégrine.

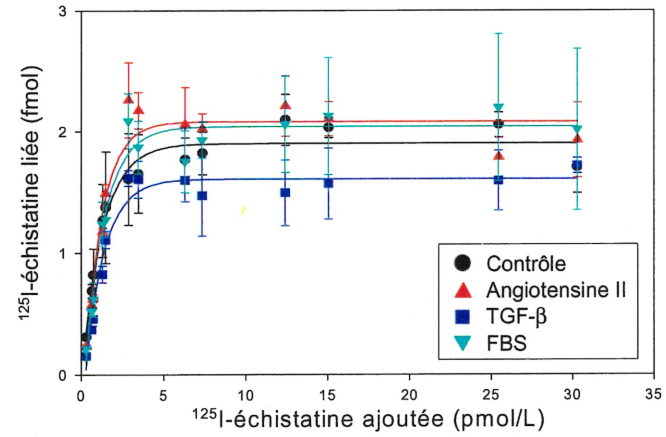
A



B



C



protéines (volume total de 20 μL), une concentration d'échistatine de 4 à 8 fmol est suffisante pour lier l'intégrine $\alpha_8\beta_1$. Des concentrations de 6 à 10 fmol et autour 2 fmol d'échistatine sont nécessaires pour se complexer aux intégrines $\alpha_3/5/v\beta_1$ et $\alpha_3\beta_v$, respectivement.

Tous les résultats sont transformés pour obtenir une droite de Scatchard donnant des informations sur l'affinité des intégrines envers l'échistatine et le nombre de sites (B_{max}) (Figure 16 et tableaux 5 et 6).

Selon le tableau 5, l'affinité de toutes les intégrines à motif RGD retrouvées sur les fibroblastes cardiaques n'augmente pas avec la présence de facteurs de croissance comme l'angiotensine II et le TGF- β_1 . Pour l'intégrine $\alpha_3\beta_v$, une légère diminution de l'affinité est observée pour le TGF- β_1 et le FBS.

Le tableau 6 représente le nombre de sites (B_{max}) par milligramme de protéines. Lors des stimulations avec l'angiotensine II et TGF- β_1 , le nombre de sites augmente, indiquant une surexpression des intégrines. Au niveau du deuxième complexe intégrine-désintégrine, le B_{max} élevé est sûrement dû à la présence de trois récepteurs différents $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_v\beta_1$.

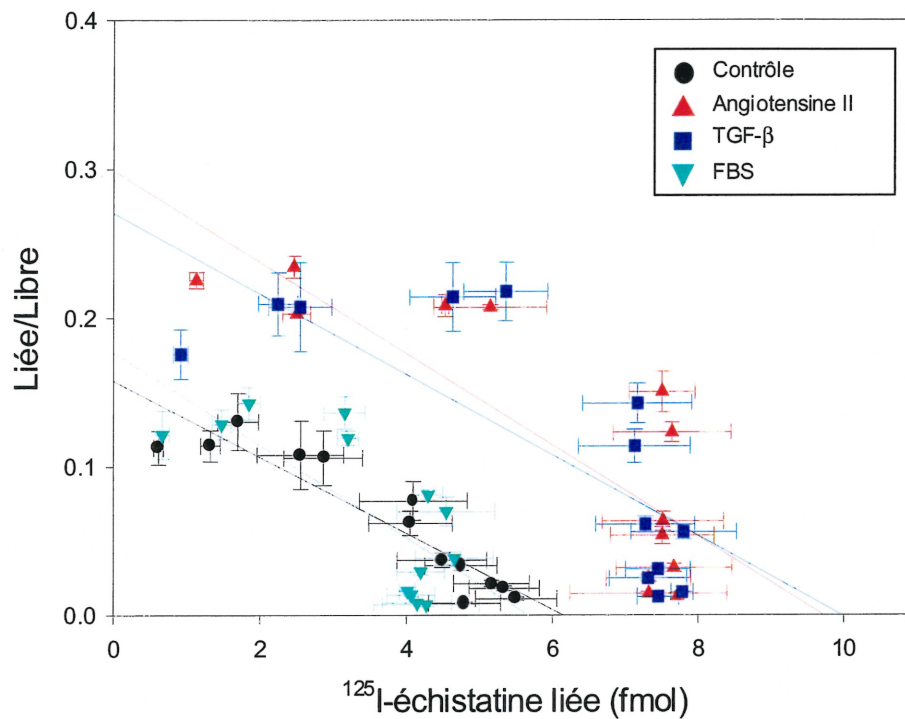


Figure 16: Exemple de droite Scatchard représentant l'activité de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$. Les informations que nous pouvons retirer de cette droite sont l'affinité de l'intégrine envers son ligand et le nombre de sites.

Tableau 5: Affinité des intégrines à motif RGD envers l'échistatine (nmol/L).

	Contrôle	Angiotensine	TGF- β 1	FBS
α 8 β 1	2.14 \pm 0.13	1.67 \pm 0.14	1.94 \pm 0.2	1.76 \pm 0.28
α 3/5/v β 1	3.67 \pm 0.48	4.5 \pm 0.45	4.33 \pm 0.49	6.49 \pm 1.06 *
α v β 3	1.75 \pm 0.06	3.22 \pm 0.24	3.58 \pm 0.29 *	3.5 \pm 0.29 *

* : p<0.05, n=3.

Tableau 6: Densité des sites (fmol/mg protéines).

	Contrôle	Angiotensine	TGF- β 1	FBS
α 8 β 1	763 \pm 55	1183 \pm 98 *	1218 \pm 84 *	707 \pm 68
α 3/5/v β 1	1578 \pm 49	1425 \pm 184	1584 \pm 79	1502 \pm 118
α v β 3	297 \pm 34	407 \pm 36	312 \pm 31	402 \pm 45

* : p<0.05, n=3.

Détection des sous-unités libres

L'interaction des intégrines envers l'échistatine est déterminé par la détection de sous-unités résiduelles libres avec les immunobuvardages. Ces sous-unités α et β libres ne sont pas impliquées dans la formation du complexe intégrine-désintégrine. Ceci nous permet alors de connaître la proportion de ces sous-unités libres présentes sur la surface cellulaire. La présente expérience consiste à saturer les récepteurs avec des concentrations croissantes de 0 à

600 000 cpm (30nmol/L) d'¹²⁵I-échistatine afin de mieux visualiser la diminution de la présence des sous-unités libres sur l'immunobuvardage. Les protéines proviennent des différentes stimulations de fibroblastes cardiaques avec l'Ang II, le TGF-β1 et le FBS. Les protéines sont séparées par SDS-PAGE sous des conditions non dénaturantes, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose pour réaliser des immunobuvardages avec des anticorps contre les sous-unités des intégrines α8β1, α3/5/vβ1 et αvβ3.

En parallèle avec la saturation ou l'occupation de l'intégrine par l'échistatine, on devrait s'attendre à une diminution des sous-unités libres correspondantes. Ainsi, sur les immunobuvardages, une diminution de la présence de certaines sous-unités libres est observée lorsque la concentration d'échistatine augmente (Figure 17 et 18). Environ 20 à 90% des différentes sous-unités sont complexables par l'échistatine.

En général, cette diminution de la présence des sous-unités se stabilise autour de 200 000 cpm d'échistatine iodée. Ceci correspond à la saturation complète des intégrines par l'échistatine ajoutée (environ 200 femtomoles ou 10 nmol/L) suite à la formation du complexe intégrine-désintégrine.

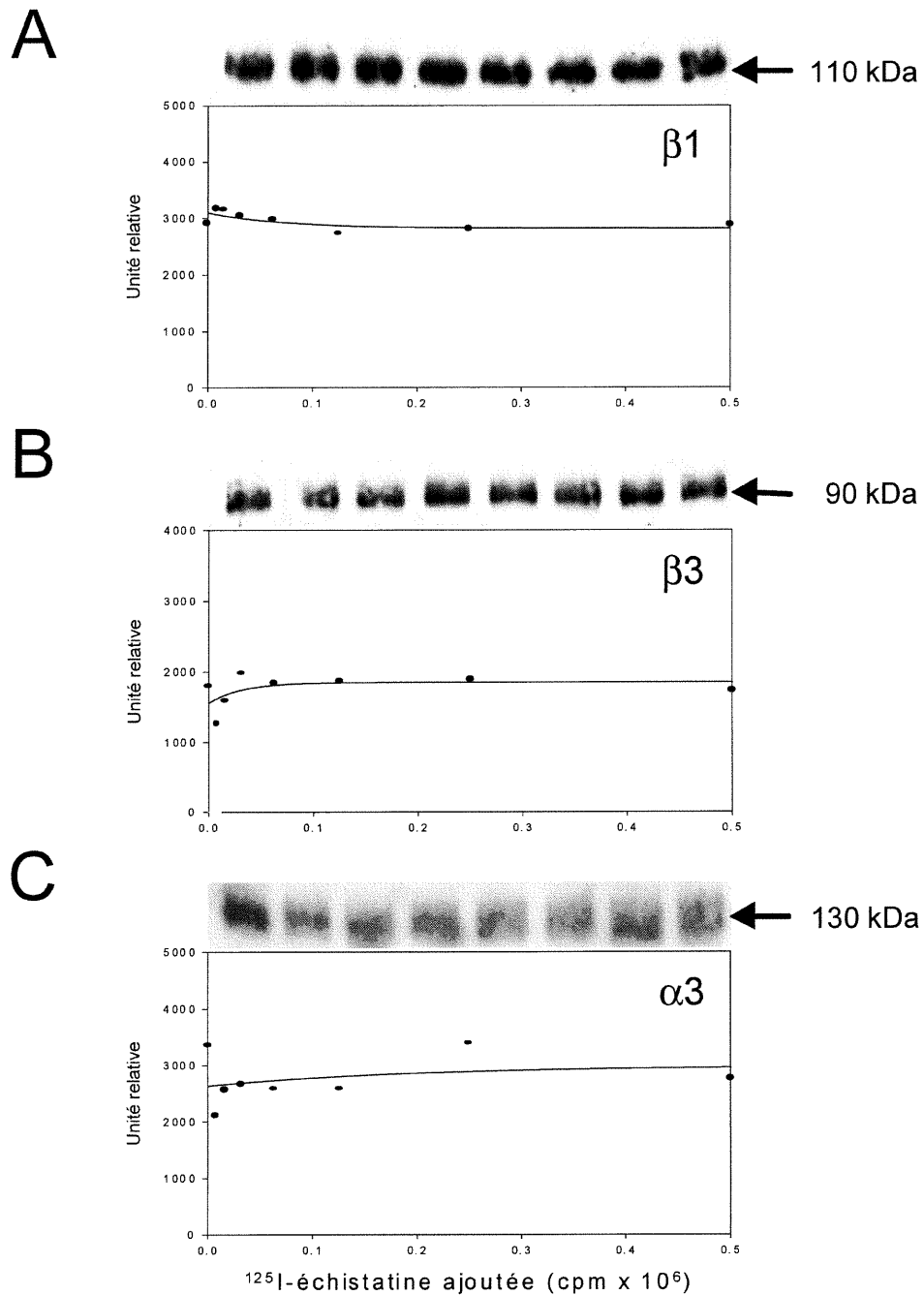


Figure 17: Détection des sous-unités libres $\beta 1$, $\beta 3$ et $\alpha 3$ lors de la saturation des intégrines par l'échistatine. Une incubation de protéines avec des concentrations croissantes d'échistatine iodée permet de détecter les sous-unités libres par immunobuvardage avec des anticorps spécifiques contre les sous-unités $\beta 1$ (A), $\beta 3$ (B) et $\alpha 3$ (C). L'immunobuvardage est présenté pour chaque sous-unité. Ces expériences ont été réalisées à quatre reprises.

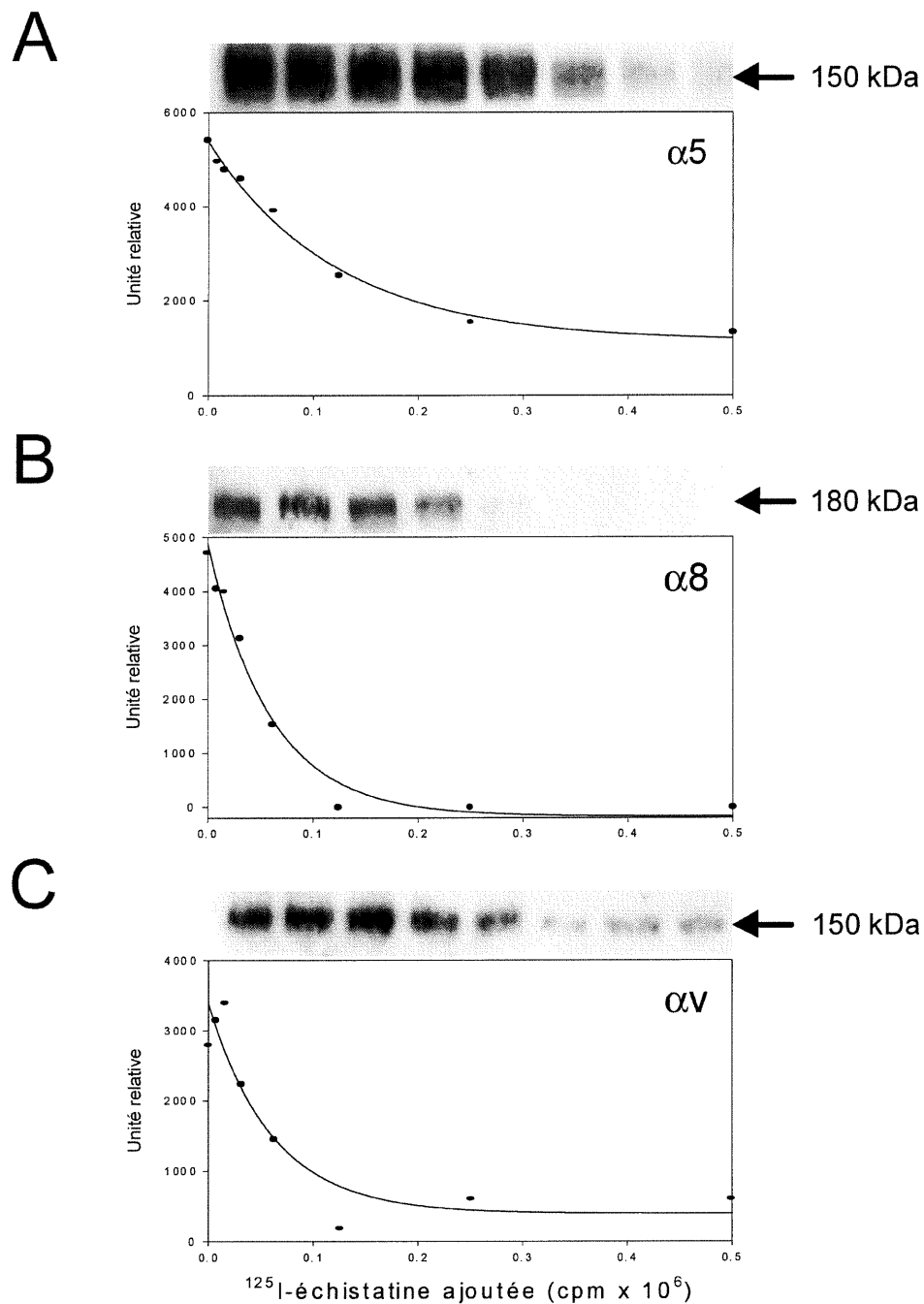


Figure 18: Détection des sous-unités libres $\alpha 5$, $\alpha 8$ et αv lors de la saturation des intégrines par l'échistatine. L'immunobuvardage des sous-unités $\alpha 5$ (A), $\alpha 8$ (B) et αv (C) est présenté. Ces expériences ont été réalisées à quatre reprises.

À la figure 19, la proportion des sous-unités α et β impliquées dans la liaison intégrine-désintégrine est semblable quelles que soient les différentes stimulations réalisées sur les fibroblastes cardiaques. Les sous-unités $\alpha 5$, αv et particulièrement $\alpha 8$ sont fortement impliquées dans la formation des complexes $\alpha\beta$ en présence de l'échistatine. Toutefois, les sous-unités $\beta 1$, $\beta 3$ et $\alpha 3$ semblent être impliquées d'une manière lâche dans le complexe intégrine-désintégrine.

Localisation des intégrines au niveau des foyers d'adhésion

L'immunolocalisation des différentes intégrines au niveau des fibroblastes cardiaques est réalisée par un double marquage avec un anticorps contre la vinculine, protéine participant à la formation des foyers d'adhésion (Figures 20 et 21). Chaque sous-unité des intégrines est présente de manière diffuse sur la surface de la cellule. Toutefois, de faibles stries sont observées à la périphérie des cellules. Ces sites correspondent aux foyers d'adhésion identifiés par un marquage contre la vinculine. Pour la sous-unité $\beta 3$, le marquage de l'anticorps semble se limiter aux foyers d'adhésion.

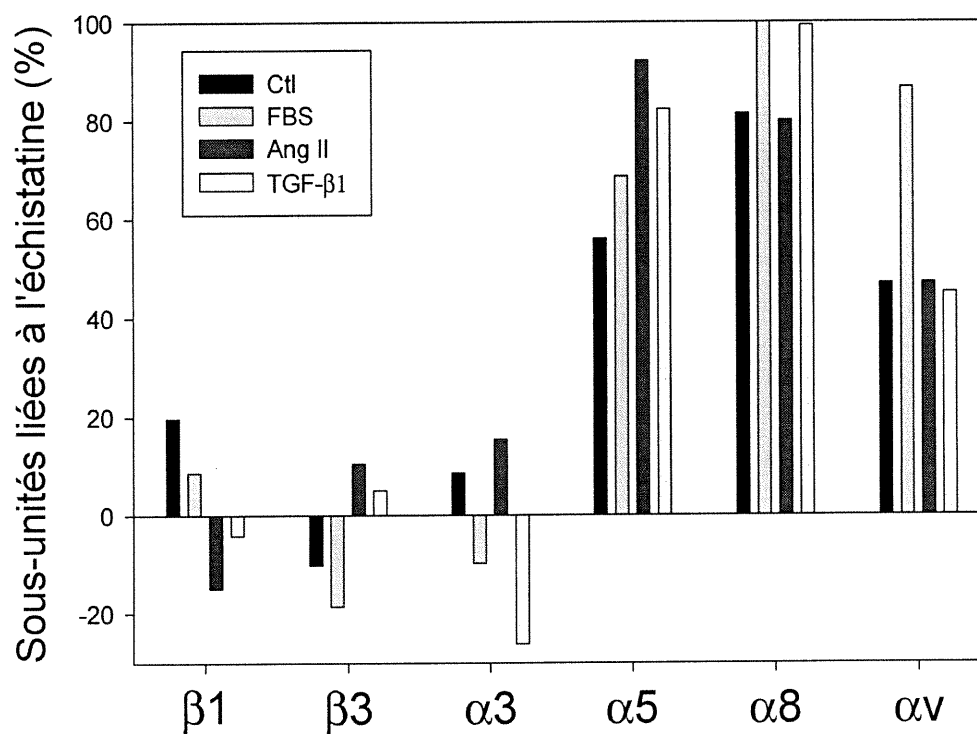


Figure 19: Interaction des sous-unités dans le complexe intégrine-échistatine. L'étude est effectuée avec des protéines obtenues de cellules stimulées ou non avec des facteurs de croissance (FBS, Ang II et TGF-β1). En parallèle avec la saturation des intégrines par l'échistatine, des immunobuvardages sont réalisés pour connaître l'implication de chaque sous-unité dans la liaison intégrine-échistatine.

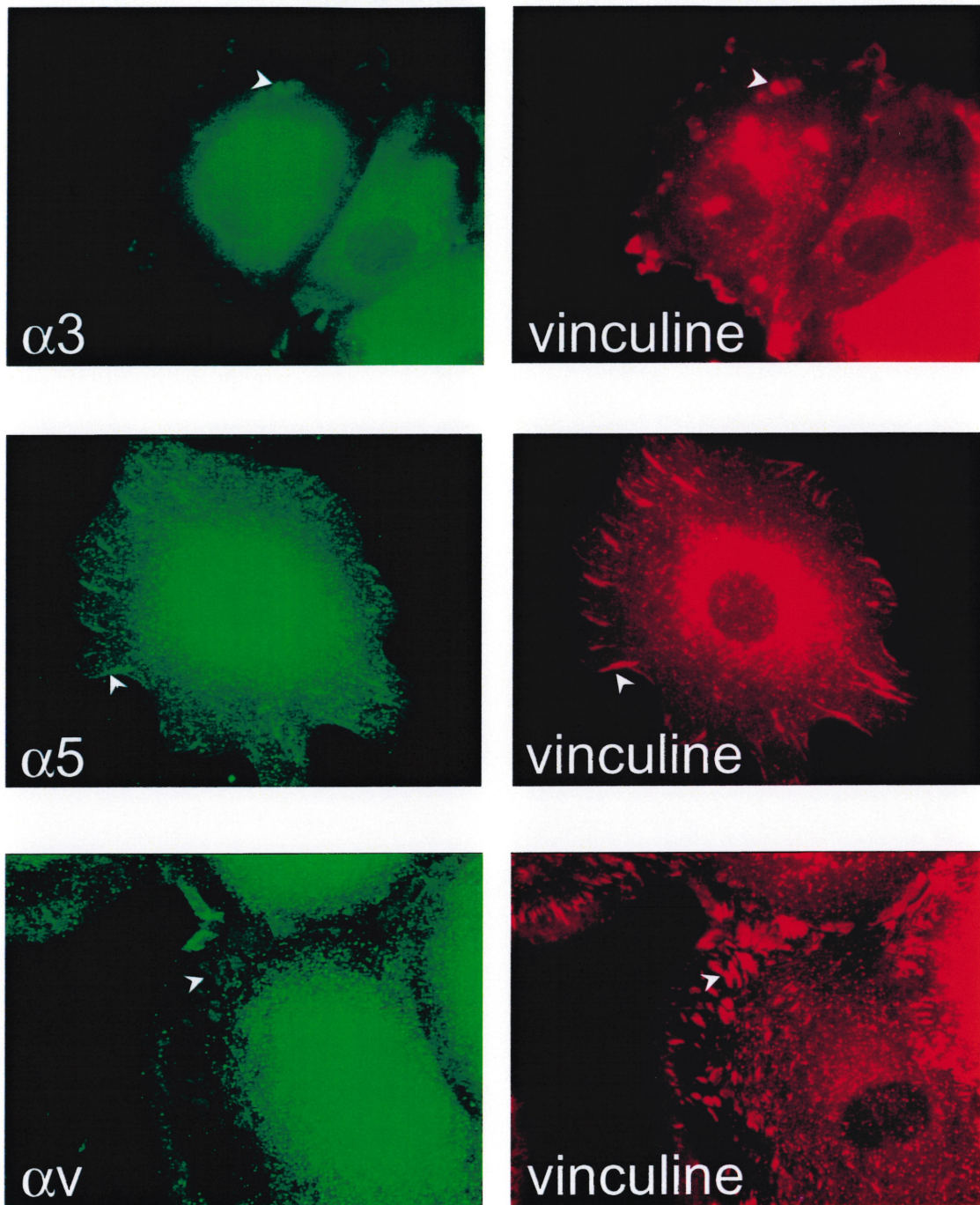


Figure 20: Localisation des intégrines ($\alpha 3$, $\alpha 5$ et αv) au niveau des foyers d'adhésion. À la surface des fibroblastes cardiaques, les intégrines sont immunolocalisées par un double marquage avec un anticorps contre la vinculine qui est une protéine présente aux foyers d'adhésion. L'anticorps de détection conjugué à la fluorescéine marque en vert les sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 5$, αv , $\alpha 8$ et $\beta 1$. Le marquage rouge par un anticorps secondaire conjugué avec la rhodamine permet la localisation de la vinculine et de la sous-unité $\beta 3$. Les flèches montrent les foyers d'adhésion.

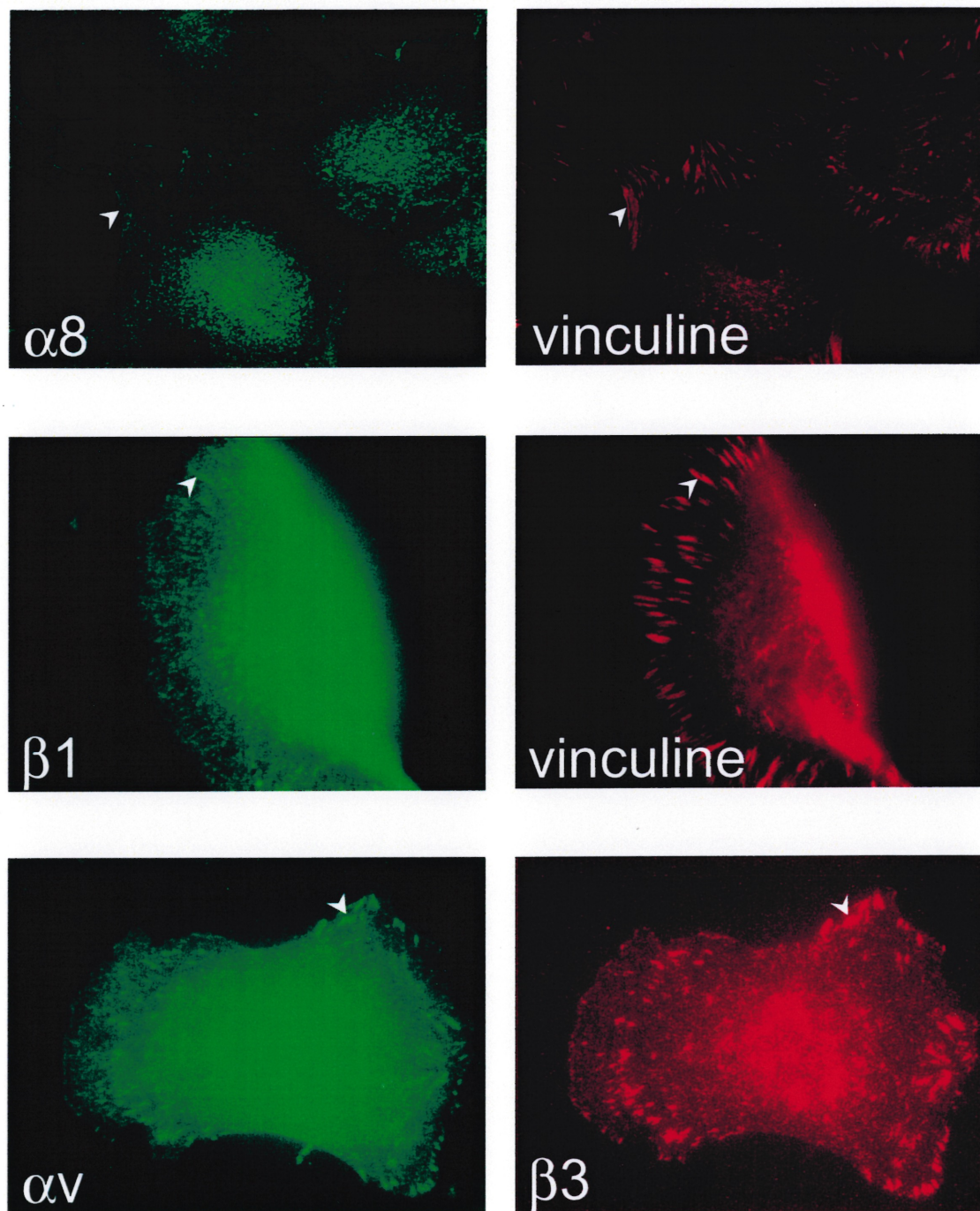


Figure 21: Localisation des intégrines ($\alpha 8$, $\beta 1$ et $\beta 3$) au niveau des foyers d'adhésion. Les flèches montrent les foyers d'adhésion.

CHAPITRE 4:

Discussion

Chapitre 4 : Discussion

Afin de caractériser l'interaction des intégrines envers une désintégrine, nous avons employé une nouvelle approche élaborée par notre laboratoire, utilisant l' ^{125}I -échistatine pour détecter et quantifier les intégrines. Sous des conditions non dénaturantes, l'échistatine forme un complexe stable au SDS avec les intégrines RGD-dépendantes, permettant de les visualiser par autoradiographie et immunobuvardage (Thibault, 2000). Ainsi, par cette méthode pharmacologique, plusieurs intégrines ont été détectées, notamment $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 3/5/\nu\beta 1$ et $\alpha\nu\beta 3$ sur les fibroblastes cardiaques de rats, $\alpha\nu\beta 1$ et $\alpha\nu\beta 3$ sur les fibroblastes dermiques humains et $\alpha\text{IIb}\beta 3$ sur les plaquettes (Thibault *et al*, 2001; Thibault, 2000). Plusieurs ouvrages ont démontré que l'échistatine est un puissant inhibiteur de la liaison d'un ligand avec les intégrines $\alpha\nu\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (Kumar *et al*, 1997; Juliano *et al*, 1996; Pfaff *et al*, 1994; Scarborough *et al*, 1991, 1993).

L'intégrine est une protéine hétérodimérique et l'échistatine semble stabiliser cette structure dimérique, de manière qu'en présence de SDS, ce dimère puisse être analysé par SDS-PAGE. Par ailleurs, une étude récente démontre que la liaison d'un antagoniste induit un changement de conformation des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta 3$ et $\alpha\nu\beta 3$, dont la structure demeure stable suite à un traitement au SDS (Zolotarjova *et al*, 2001). En effet, la liaison de l'antagoniste

XP280, et non des peptides RGDS, induit un changement de conformation de l'hétérodimère. Ce changement de conformation est stable au SDS, à la réduction, mais pas au chauffage ni au traitement avec de l'EDTA. De plus, la conformation stable du récepteur est maintenue pendant plusieurs jours, même après la dissociation de l'inhibiteur. La stabilité du complexe pourrait être causée par des interactions non-covalentes entre les sous-unités. Cette étude appuie donc la validité de la formation et l'utilisation du complexe intégrine-échistatine, même si une variable a pu être observée, soit la dissociation des intégrines peut être causée par un agent réducteur.

En utilisant cette méthode pharmacologique d'analyse des intégrines de type RGD, notre étude suggère plusieurs observations: (1) la localisation des intégrines au niveau des foyers d'adhésion sur les membranes, (2) des changements de l'expression des intégrines détectés par l'échistatine suite à la stimulation des cellules avec des facteurs de croissance et (3) une déplétion des sous-unités spécifiques à certaines intégrines lors de la saturation des intégrines par l'échistatine.

Les intégrines retrouvées sur les fibroblastes cardiaques de rats adultes semblent localisées majoritairement sur les membranes extracellulaires. Une purification de membranes plasmiques a été réalisée par la méthode d'un système à deux phases, contenant du dextran et du polyéthylène glycol. L'échistatine ajoutée aux protéines de la fraction purifiée en membranes

permet de visualiser une forte présence des intégrines par la formation de complexes intégrine-échistatine, détectant la presque totalité des intégrines sur la surface cellulaire. De plus, cette fraction purifiée possède une grande activité enzymatique de la 5'-nucléotidase, marqueur spécifique des membranes. Des études antérieures ont démontré la présence des intégrines sur la surface de la cellule en utilisant un anticorps monoclonal inhibant l'adhésion cellulaire et la chromatographie d'affinité avec des ligands extracellulaires (Tamkun *et al*, 1986; Pytela *et al*, 1985). Un traitement des cellules avec des protéases abolit la capacité des cellules à s'attacher à la fibronectine, indiquant la présence d'un récepteur protéique sur les cellules (Tarone *et al*, 1982). De plus, les intégrines peuvent être marquées selon une procédure d'iodation et de biotinylation pour les protéines de la surface cellulaire (Pytela *et al*, 1985; Lebien *et al*, 1982). Finalement, les intégrines possèdent des propriétés de solubilité observées chez les protéines membranaires (Pytela *et al*, 1985; Mimms *et al*, 1981). Ainsi, les intégrines détectées par l'échistatine sont des protéines intégrées dans la membrane, présentes sur la surface cellulaire.

L'analyse des fractions membranaires et l'immunocytochimie confirment une localisation des intégrines au niveau des membranes et aux foyers d'adhésion. Plusieurs ouvrages ont déjà montré la localisation des différentes sous-unités aux foyers d'adhésion chez les cellules cardiaques et autres types cellulaires (Hartner *et al*, 1999; Dogic *et al*, 1998; Ashizawa *et al*, 1996; DiPersio *et al*, 1995; Liaw *et al*, 1995; Schnapp *et al*, 1995; Terracio *et al*, 1991). Cependant,

le marquage diffus sur la surface cellulaire suggère que plusieurs récepteurs ne sont pas impliqués dans l'adhésion. Ces récepteurs pourraient être présents en surplus ou en attente sur la surface de la cellule. Une étude a observé que seulement une fraction des récepteurs de la fibronectine présente sur la surface cellulaire est nécessaire pour une adhésion cellulaire complète (Brown et Juliano, 1987). Une augmentation de l'occupation du récepteur ne semble pas contribuer à l'adhésion. Les auteurs ont alors proposé la présence de "spare receptors" sur la surface cellulaire. Toutefois, l'existence de "spare receptors" est suggérée suite à une expérience réalisée avec un ligand de haute affinité immobilisé sur une surface. En présence d'un ligand de faible affinité ou un ligand soluble, une plus grande proportion de récepteurs serait nécessaire pour obtenir un effet similaire pour l'adhésion.

L'angiotensine II et le TGF- β 1 semblent participer au développement de l'hypertrophie cardiaque et à l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire (Kawano *et al*, 2000a; Lee A.A. *et al*, 1995). Dans la présente étude, une augmentation de la densité des sites d'intégrines, surtout pour l'intégrine α 8 β 1, est observée suite à une stimulation par l'Ang II et le TGF- β des fibroblastes cardiaques en culture. Toutefois, il n'y a aucune modification significative de l'affinité des intégrines envers l'échistatine avec la présence de ces facteurs de croissance. Il a été montré que l'Ang II et le TGF- β 1 ont un effet sur la régulation de l'expression de certaines intégrines (Graf *et al*, 2000;

Kawano *et al*, 2000a; Kim et Yamada, 1997). Notamment, l'angiotensine II stimule l'expression des sous-unités α_v , β_1 , β_3 et β_5 chez les fibroblastes cardiaques de rats adultes, résultant en une augmentation de l'attachement des cellules aux protéines de la matrice (Kawano *et al*, 2000a). L'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est augmentée par l'Ang II et le TGF- β_1 chez les fibroblastes cardiaques de rats néonataux (Graf *et al*, 2000). Des ouvrages rapportent que l'angiotensine II et le PDGF-BB peuvent agir sur la modulation de l'affinité des intégrines présentes sur les cellules vasculaires lisses humaines, sans modification de l'expression des intégrines (Kappert *et al*, 2000; Seki *et al*, 1996). En effet, une augmentation de l'adhésion et de l'étalement des cellules vasculaires lisses médiée par les intégrines β_1 est observée suite à une incubation avec ces facteurs de croissance. L'Ang II et le PDGF-BB semblent modifier les voies de signalisation intracellulaire par le récepteur AT-1 et l'activation de la protéine kinase C, respectivement, induisant un changement de l'affinité et de l'avidité du récepteur (Kappert *et al*, 2000).

Comme les protéines sont incubées avec de l'échistatine sous des conditions non dénaturantes, nous nous attendions à saturer toutes les intégrines dans une liaison intégrine-désintégrine ce qui aurait eu pour conséquence d'épuiser l'extrait cellulaire des sous-unités des intégrines correspondantes, sauf si ces sous-unités sont impliquées dans la formation de dimères non détectables par l'échistatine, telles que $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_4\beta_1$. En parallèle, nous avons donc

détection des sous-unités α et β avec des anticorps spécifiques. Ces sous-unités apparaissent sur immunobuvardage avec un poids moléculaire variant entre 90 et 180 kDa, nous permettant de déduire qu'elles n'interagissent pas avec leur homologue, comme pour les sous-unités α_3 , β_1 et β_3 . Ainsi, suite aux expériences de saturation, nous observons que les complexes hétérodimériques $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$ et $\alpha_v\beta_1$ sont saturables par l'échistatine et sont dans un état d'activité maximale envers l'échistatine. En effet, les sous-unités α_5 , α_8 et α_v montrent une forte implication dans le complexe intégrine-échistatine. L'absence de baisse de la sous-unité β_1 suggère soit (1) une réserve importante de la sous-unité β_1 sur la surface des fibroblastes cardiaques ou (2) la formation de complexes hétérodimériques RGD-indépendantes. Des études ont proposé une présence en excès des sous-unités β sur la surface cellulaire. Par exemple, la surexpression de la sous-unité α_4 augmente la maturation du précurseur de β_1 ainsi que la quantité de sous-unité β_1 sur la surface cellulaire (Jaspers *et al*, 1994). Plusieurs intégrines sont exprimées sur la surface des fibroblastes cardiaques de rats adultes, dont le récepteur prédominant est l'intégrine RGD-indépendante $\alpha_1\beta_1$ (MacKenna *et al*, 2000). Ainsi, les sous-unités détectées sous une forme libre peuvent participer à la formation d'un hétérodimère $\alpha\beta$ RGD-indépendant tel que $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_4\beta_1$.

À cause d'une faible participation de la sous-unité β_3 au complexe intégrine-échistatine, une fraction des intégrines $\alpha_v\beta_3$ serait dans un état réceptif envers l'échistatine, avec la majorité de ces intégrines dans un état non fonctionnel ou de basse affinité et ce, malgré une forte implication de la sous-unité α_v dans le complexe intégrine-désintégrine. La sous-unité β_3 est retrouvée seulement chez l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$, présente uniquement chez les plaquettes, et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, éliminant la possibilité d'une intégrine RGD-indépendante sur les fibroblastes cardiaques. Ainsi, la sous-unité β_3 pourrait être présente en excès sur les fibroblastes cardiaques. Par ailleurs, la sous-unité α_v est également retrouvée chez les fibroblastes cardiaques dans la formation du complexe dimérique $\alpha_v\beta_1$. L'implication de la sous-unité α_v dans un complexe intégrine-échistatine pourrait être de haute affinité, mais sa présence sur la surface cellulaire pourrait être restreinte.

L'intégrine $\alpha_3\beta_1$ semble être dans un état non fonctionnel et de faible affinité pour l'échistatine, car la sous-unité α_3 se retrouve sous une forme libre sur les immunobuvardages. Or, la sous-unité α_3 participe uniquement à la formation dimérique de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$. Toutefois, plusieurs ouvrages diffèrent quant à la reconnaissance ou non d'un motif RGD par le récepteur $\alpha_3\beta_1$ (Ruoslahti, 1996; Hynes, 1992). Ainsi, la liaison de l'intégrine $\alpha_3\beta_1$ avec un ligand portant le motif RGD peut être de faible affinité ou présente seulement sous certaines conditions.

L'état d'inactivité de l'intégrine pourrait être régulé par la conformation de l'hétérodimère dont les sites de reconnaissance pour le ligand sont inaccessibles. Une étude récente démontre que l'association des séquences proximales du domaine cytoplasmique des sous-unités α et β régule l'activation de l'intégrine et les changements de conformation (Lu *et al*, 2001). Ainsi, l'association des régions proximales retient l'intégrine dans une conformation inactive, alors que la dissociation résulte en une activation. La signalisation intracellulaire et la liaison d'un ligand semblent réguler cet équilibre.

L'analyse actuelle par immunobuvardage des sous-unités demeure qualitative, compliquant l'interprétation des résultats. Une analyse plus quantitative donnerait une meilleure idée sur l'état d'activité des différentes intégrines envers l'échistatine. Au niveau de la deuxième bande radioactive qui comporte les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 1$, l'affinité de ces intégrines individuelles envers l'échistatine peut être difficilement déterminée. Les différentes intégrines retrouvées sur les membranes des fibroblastes cardiaques pourraient être purifiées en utilisant une colonne d'immunoaffinité avec un anticorps spécifique contre chaque intégrine (Kumar *et al*, 1997). L'étude de l'état d'activité des intégrines pourrait être réalisée par un essai immunologique de type ELISA dont les récepteurs purifiés seraient ajoutés dans des puits contenant différentes concentrations d'échistatine immobilisée (Juliano *et al*, 1996). Les intégrines liées à l'échistatine seraient détectées en ajoutant un

anticorps contre chaque intégrine individuelle, suivi d'un anti-IgG conjugué à l'alkaline phosphatase et finalement du substrat pour l'alkaline phosphatase pour la mesure de l'absorbance.

Des études d'activation permettraient de vérifier la capacité des intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ à modifier leur état d'activité envers l'échistatine. D'ailleurs, plusieurs auteurs ont souligné que l'intégrine $\alpha v\beta 3$ peut exister sous différents états d'activation selon le ligand (Byzova *et al*, 2000, Byzova et Plow, 1998; Bennett *et al*, 1997; Pelletier *et al*, 1996). L'activation des intégrines peut être induite par des chimioattractants et par un traitement des cellules avec des agents tels que le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et l'ADP (Byzova et Plow, 1998; Sadhu *et al*, 1998). Ainsi, plusieurs types de récepteurs peuvent causer un changement rapide des intégrines vers un état actif (Sugimori *et al*, 1997). La protéine kinase C et la kinase phosphatidyl-3-inositide semblent contribuer à la signalisation intracellulaire pouvant mener à l'activation des intégrines (Kolanus et Seed, 1997). De plus, les intégrines peuvent être activées par les cations divalents et par des anticorps monoclonaux stimulateurs (Sugimori *et al*, 1997; Seki *et al*, 1996; Faull *et al*, 1993).

Les intégrines peuvent adopter différents états d'affinité régulés par des facteurs intracellulaires et extracellulaires. Selon la régulation cytoplasmique de l'intégrine et la concentration extracellulaire du calcium, du magnésium et du

manganèse, l'hétérodimère subit un changement structural modifiant l'exposition de la surface de liaison de l'intégrine pour le ligand (Legler *et al*, 2001). Plusieurs modèles montrant les différents états d'activation des intégrines ont déjà été proposés (Legler *et al*, 2001; Plow *et al*, 2000; Humphries, 1996; Mould, 1996). Selon les résultats obtenus dans cette étude, nous proposons un modèle qui présente les intégrines RGD-dépendantes selon quatre états d'activité différents (Figure 22). Par exemple, les intégrines peuvent être actives suite à une liaison avec un ligand. Ainsi, ces intégrines peuvent participer à la formation d'un complexe intégrine-ligand, étant alors dans un état de haute affinité. Dans notre étude, les récepteurs $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ et $\alpha v\beta 1$ semblent être dans un état fonctionnel ou de haute affinité. Les intégrines peuvent également être connues dans un état non fonctionnel, pouvant se lier avec un ligand, mais avec une faible affinité. Cet état de repos peut être modifié vers un état fonctionnel suite à une stimulation appropriée, comme l'activation des intégrines $\alpha IIb\beta 3$ sur les plaquettes par la thrombine. Les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ sur les fibroblastes cardiaques pourraient être dans un état non fonctionnel, ayant une conformation inapte pour la liaison de l'échistatine. Finalement, cette étude a permis de détecter les intégrines sous une forme dissociée, c'est-à-dire que les sous-unités se retrouvent libres sur la surface cellulaire et non impliquées dans la formation d'un hétérodimère $\alpha\beta$. En effet, les sous-unités $\alpha 3$, $\beta 1$ et $\beta 3$ ne semblent pas interagir avec leur homologue suite à leur détection sur immunobuvardage par des anticorps

reconnaissant les sous-unités α et β libres. Il aurait été intéressant de vérifier la présence d'intégrines n'ayant pas lié l'échistatine avec des anticorps reconnaissant spécifiquement les complexes hétérodimériques $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$, si ceux-ci existent. Dans ce modèle, l'intégrine dissociée peut également expliquer la présence en excès d'une sous-unité, ou bien l'implication de la sous-unité dans un hétérodimère RGD-indépendant.

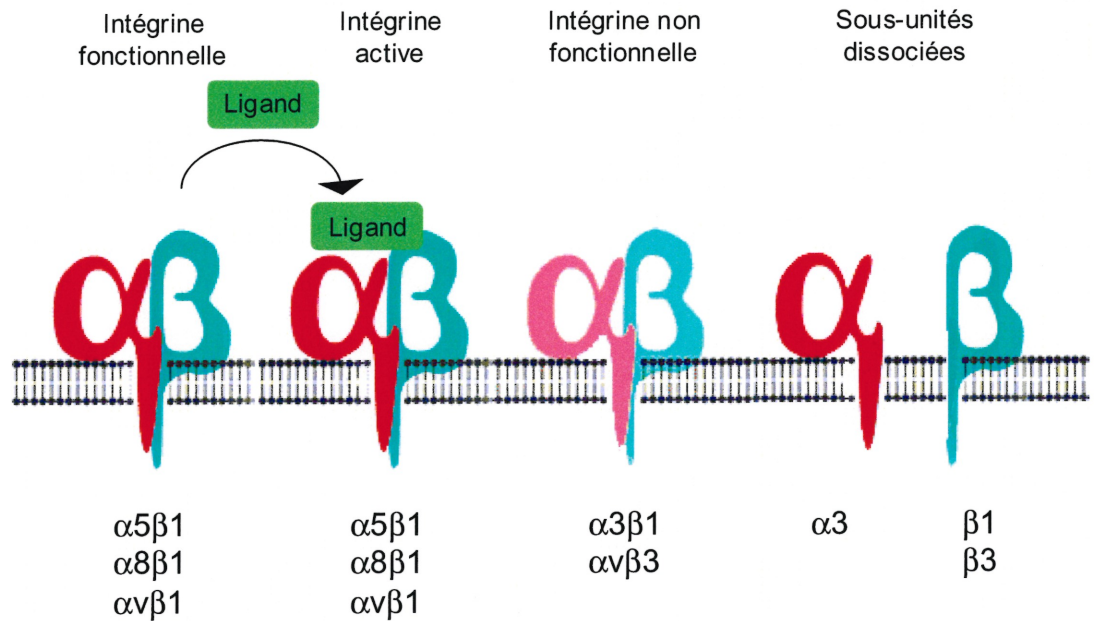


Figure 22: Modèle des différents états d'activité des intégrines RGD-dépendantes. D'après notre étude, les intégrines se retrouvent sur la surface cellulaire sous différents états d'activité qui permettent ou non leur liaison avec un ligand. Les intégrines fonctionnelles sont aptes à lier un ligand grâce à leur conformation régulée par les cations divalents ou la signalisation cellulaire. Les intégrines actives ou de haute affinité interagissent avec un ligand. Les intégrines non fonctionnelles peuvent participer à une liaison intégrine-ligand avec une faible affinité. Elles peuvent devenir actives et dans un état de haute affinité suite à une stimulation appropriée. Finalement, la présence d'intégrines dissociées est détectée par les sous-unités α et β libres. Adapté selon Legler et al (2001).

Conclusion

Les intégrines participent à diverses fonctions de la cellule à travers la signalisation cellulaire, et ce, selon leur affinité pour leur ligand. Cette étude a été réalisée grâce à une nouvelle méthode d'analyse des intégrines RGD-dépendantes, utilisant l'¹²⁵I-échistatine qui forme un complexe intégrine-échistatine stable au SDS. Localisées au niveau des foyers d'adhésion sur les membranes de fibroblastes cardiaques, les intégrines $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 3\beta 1/\alpha 5\beta 1/\alpha v\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ ont une activité modulable envers l'échistatine. Selon le modèle que nous proposons, les intégrines $\alpha 8\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 1$ sont dans un état fonctionnel et semblent être dans un état de haute affinité, fortement impliquées dans la formation d'un complexe intégrine-désintégrine. Par contre, les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ semblent être dans un état non fonctionnel ou de basse affinité. Une activation cellulaire en présence d'agonistes pourrait modifier leur état d'activité envers l'échistatine. Les sous-unités résiduelles $\alpha 3$, $\beta 1$ et $\beta 3$ semblent être sous forme libre, ce qui peut être expliqué par la présence d'hétérodimères $\alpha\beta$ RGD-indépendants ou d'un excès de sous-unités sur la surface de la cellule. L'ajout de l'angiotensine II et du facteur de croissance transformant- β aux fibroblastes en culture augmente l'expression des intégrines sur la surface cellulaire, sans toutefois modifier l'affinité de ces récepteurs pour l'échistatine.

Références

Albelda SM, Buck CA. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4:2868-80.

Andrieux A, Rabiet MJ, Chapel A, Concord E, Marguerie G. 1991. A highly conserved sequence of the Arg-Gly-Asp-binding domain of the integrin beta 3 subunit is sensitive to stimulation. *J Biol Chem.* 266:14202-7.

Aota S, Nomizu M, Yamada KM. 1994. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem.* 269:24756-61.

Ashizawa N, Graf K, Do YS, Nunohiro T, Giachelli CM, Meehan WP, Tuan TL, Hsueh WA. 1996. Osteopontin is produced by rat cardiac fibroblasts and mediates A(II)-induced DNA synthesis and collagen gel contraction. *J Clin Invest.* 98:2218-27.

Bajt ML, Goodman T, McGuire SL. 1995. Beta 2 (CD18) mutations abolish ligand recognition by I domain integrins LFA-1 (alpha L beta 2, CD11a/CD18) and MAC-1 (alpha M beta 2, CD11b/CD18). *J Biol Chem.* 270:94-8.

Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM. 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem.* 171:266-70.

Bennett JS, Chan C, Vilaire G, Mousa SA, DeGrado WF. 1997. Agonist-activated alphavbeta3 on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin. *J Biol Chem.* 272:8137-40.

Berman AE, Kozlova NI. 2000. Integrins: structure and functions. *Membr Cell Biol.* 13:207-44.

Bienkowska J, Cruz M, Atiemo A, Handin R, Liddington R. 1997. The von willebrand factor A3 domain does not contain a metal ion-dependent adhesion site motif. *J Biol Chem.* 272:25162-7.

Bishop JE, Lindahl G. 1999. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovascular Research.* 42:27-44.

Bitan G, Scheibler L, Greenberg Z, Rosenblatt M, Chorev M. 1999. Mapping the integrin alpha V beta 3-ligand interface by photoaffinity cross-linking. *Biochemistry.* 38:3414-20.

Bitan G, Scheibler L, Mierke DF, Rosenblatt M, Chorev M. 2000. Ligand-integrin alpha v beta 3 interaction determined by photoaffinity cross-linking: a challenge to the prevailing model. *Biochemistry.* 39:11014-23.

Border WA, Noble NA. 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 331:1286-92.

Borg TK, Rubin K, Carver W, Samarel A, Terracio L. 1996. The cell biology of the cardiac interstitium. *Trends Cardiovasc Med.* 6:65-70.

Boudreau NJ, Jones PL. 1999. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J.* 339:481-8.

Bowditch RD, Halloran CE, Aota S, Obara M, Plow EF, Yamada KM, Ginsberg MH. 1991. Integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) recognizes multiple sites in fibronectin. *J Biol Chem.* 266:23323-8.

- Brown PJ, Juliano RL. 1987. Association between fibronectin receptor and the substratum: spare receptors for cell adhesion. *Exp Cell Res.* 171:376-88.
- Buckley CD, Simmons DL. 1997. Cell adhesion: a new target for therapy. *Mol Med Today.* 3:449-56.
- Byzova TV, Kim W, Midura RJ, Plow EF. 2000. Activation of integrin alpha(V)beta(3) regulates cell adhesion and migration to bone sialoprotein. *Exp Cell Res.* 254:299-308.
- Byzova TV, Plow EF. 1998. Activation of alphaVbeta3 on vascular cells controls recognition of prothrombin. *J Cell Biol.* 143:2081-92.
- Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. 2000. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem.* 275:22607-10.
- Calderwood DA, Tuckwell DS, Eble J, Kuhn K, Humphries MJ. 1997. The integrin alpha1 A-domain is a ligand binding site for collagens and laminin. *J Biol Chem.* 272:12311-7.
- Calvete JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriguez J. 1991. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem J.* 274:63-71.
- Calvete JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriguez J. 1989. Complete localization of the intrachain disulphide bonds and the N-glycosylation points in the alpha-subunit of human platelet glycoprotein IIb. *Biochem J.* 261:561-8.
- Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillips DR. 1985. Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem.* 260:1743-9.

Cary LA, Guan JL. 1999. Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front Biosci.* Jan 15;4:D102-13.

Champe M, McIntyre BW, Berman PW. 1995. Monoclonal antibodies that block the activity of leukocyte function-associated antigen 1 recognize three discrete epitopes in the inserted domain of CD11a. *J Biol Chem.* 270:1388-94.

Chang DD, Wong C, Smith H, Liu J. 1997. ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol.* 138:1149-57.

Charo IF, Nannizzi L, Phillips DR, Hsu MA, Scarborough RM. 1991. Inhibition of fibrinogen binding to GP IIb-IIIa by a GP IIIa peptide. *J Biol Chem.* 266:1415-21.

Chua CC, Chua BH, Zhao ZY, Krebs C, Diglio C, Perrin E. 1991. Effect of growth factors on collagen metabolism in cultured human heart fibroblasts. *Connect Tissue Res.* 26:271-81.

Clark EA, Trikha M, Markland FS, Brugge JS. 1994. Structurally distinct disintegrins contortrostatin and multisquamatin differentially regulate platelet tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 269:21940-3.

Clemetson KJ, Clemetson JM. 1998. Integrins and cardiovascular disease. *Cell Mol Life Sci.* 54:502-13.

Coller BS, Seligsohn U, West SM, Scudder LE, Norton KJ. 1991. Platelet fibrinogen and vitronectin in Glanzmann thrombasthenia: evidence consistent with specific roles for glycoprotein IIb/IIIa and alpha v beta 3 integrins in platelet protein trafficking. *Blood.* 78:2603-10.

Coppolino MG, Dedhar S. 2000. Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int J Biochem Cell Biol.* 32:171-88.

Crowe DT, Chiu H, Fong S, Weissman IL. 1994. Regulation of the avidity of integrin alpha 4 beta 7 by the beta 7 cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 269:14411-8.

Curley GP, Blum H, Humphries MJ. 1999. Integrin antagonists. *Cell Mol Life Sci.* 56:427-41.

David FS, Zage PE, Marcantonio EE. 1999. Integrins interact with focal adhesions through multiple distinct pathways. *J Cell Physiol.* 181:74-82.

Dedhar S. 1999. Integrins and signal transduction. *Curr Opin Hematol.* 6:37-43.

Dedhar S, Hannigan GE. 1996. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 8:657-69.

Delcommenne M, Streuli CH. 1995. Control of integrin expression by extracellular matrix. *J Biol Chem.* 270:26794-801.

Della Morte R, Squillaciotti C, Garbi C, Derkinderen P, Belisario MA, Girault JA, Di Natale P, Nitsch L, Staiano N. 2000. Echistatin inhibits pp125FAK autophosphorylation, paxillin phosphorylation and pp125FAK-paxillin interaction in fibronectin-adherent melanoma cells. *Eur J Biochem.* 26:5047-54.

Dennis MS, Carter P, Lazarus RA. 1993. Binding interactions of kistrin with platelet glycoprotein IIb-IIIa: analysis by site-directed mutagenesis. *Proteins.* 15:312-21.

Dickeson SK, Bhattacharyya-Pakrasi M, Mathis NL, Schlesinger PH, Santoro SA. 1998. Ligand binding results in divalent cation displacement from the alpha 2 beta 1 integrin I domain: evidence from terbium luminescence spectroscopy. *Biochemistry*. 37:11280-8.

Dickeson SK, Santoro SA. 1998. Ligand recognition by the I domain-containing integrins. *Cell Mol Life Sci*. 54:556-66.

DiPersio CM, Shah S, Hynes RO. 1995. alpha 3A beta 1 integrin localizes to focal contacts in response to diverse extracellular matrix proteins. *J Cell Sci*. 108:2321-36.

Dogic D, Rousselle P, Aumailley M. 1998. Cell adhesion to laminin 1 or 5 induces isoform-specific clustering of integrins and other focal adhesion components. *J Cell Sci*. 111:793-802.

Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. 1995. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*. 77:863-8.

D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, Lam SC, Plow EF. 1988. Localization of an Arg-Gly-Asp recognition site within an integrin adhesion receptor. *Science*. 242:91-3.

D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, Plow EF. 1990. The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb-IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its alpha subunit. *J Biol Chem*. 265:3440-6.

D'Souza SE, Haas TA, Piotrowicz RS, Byers-Ward V, McGrath DE, Soule HR, Cierniewski C, Plow EF, Smith JW. 1994. Ligand and cation binding are dual functions of a discrete segment of the integrin beta 3 subunit: cation displacement is involved in ligand binding. *Cell*. 79:659-67.

Eghbali M. 1992. Cardiac fibroblasts: function, regulation of gene expression, and phenotypic modulation. *Basic Res Cardiol.* 87:183-9.

Eigenthaler M, Hofferer L, Shattil SJ, Ginsberg MH. 1997. A conserved sequence motif in the integrin beta3 cytoplasmic domain is required for its specific interaction with beta3-endonexin. *J Biol Chem.* 272:7693-8.

Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell.* 101:47-56.

Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G. 1997. Cardiac type-1 angiotensin II receptor status in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension in rats. *Hypertension.* 30:1253-9.

Farhadian F, Contard F, Corbier A, Barrieux A, Rappaport L, Samuel JL. 1995. Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol.* 27:981-90.

Faull RJ, Ginsberg MH. 1996. Inside-out signaling through integrins. *J Am Soc Nephrol.* 7:1091-7.

Faull RJ, Kovach NL, Harlan JM, Ginsberg MH. 1993. Affinity modulation of integrin alpha 5 beta 1: regulation of the functional response by soluble fibronectin. *J Cell Biol.* 121:155-62.

Fernandez C, Clark K, Burrows L, Schofield NR, Humphries MJ. 1998. Regulation of the extracellular ligand binding activity of integrins. *Front Biosci.* 3:D684-700.

Filardo EJ, Brooks PC, Deming SL, Damsky C, Cheresh DA. 1995. Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo. *J Cell Biol.* 130:441-50.

Frank JS, Langer GA. 1974. The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange. *J Cell Biol.* 60:586-601.

Gan ZR, Gould RJ, Jacobs JW, Friedman PA, Polokoff MA. 1988. Echistatin. A potent platelet aggregation inhibitor from the venom of the viper, *Echis carinatus*. *J Biol Chem.* 263:19827-32.

Garsky VM, Lumma PK, Freidinger RM, Pitzenberger SM, Randall WC, Veber DF, Gould RJ, Friedman PA. 1989. Chemical synthesis of echistatin, a potent inhibitor of platelet aggregation from *Echis carinatus*: synthesis and biological activity of selected analogs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:4022-6.

Geladopoulos TP, Sotiroudis TG, Evangelopoulos AE. 1991. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal Biochem.* 192:112-6.

Giancotti FG. 2000. Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol.* 2:E13-4.

Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, Huang TF, Holt JC, Cook JJ, Niewiarowski S. 1990. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. *Proc Soc Exp Biol Med.* 195:168-71.

Graf K, Neuss M, Stawowy P, Hsueh WA, Fleck E, Law RE. 2000. Angiotensin II and alpha(v)beta(3) integrin expression in rat neonatal cardiac fibroblasts. *Hypertension.* 35:978-84.

Green LJ, Mould AP, Humphries MJ. 1998. The integrin beta subunit. *Int J Biochem Cell Biol.* 30:179-84.

Haas TA, Plow EF. 1994. Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol.* 6:656-62.

Hannigan GE, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, Coppolino MG, Radeva G, Filmus J, Bell JC, Dedhar S. 1996. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase. *Nature.* 379:91-6.

Harlan JM. 1993. Leukocyte adhesion deficiency syndrome: insights into the molecular basis of leukocyte emigration. *Clin Immunol Immunopathol.* 67:S16-24.

Harper AE. 1965. Glucose-6-phosphatase. In *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. H-U. Bergmeyer), pp. 788-792. Academic Press, New York and London.

Hartner A, Schocklmann H, Prols F, Muller U, Sterzel RB. 1999. Alpha8 integrin in glomerular mesangial cells and in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 56:1468-80.

Healy JM, Murayama O, Maeda T, Yoshino K, Sekiguchi K, Kikuchi M. 1995. Peptide ligands for integrin alpha v beta 3 selected from random phage display libraries. *Biochemistry.* 34:3948-55.

Hemler ME. 1998. Integrin associated proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 10:578-85.

Horton MA. 1996. Cell adhesion receptors and their ligands as therapeutic targets. In *Adhesion Receptors as Therapeutic Targets* (ed. MA Horton), pp. 1-8. CRC Press, Boca Raton, FL.

Hsueh WA, Law RE, Do YS. 1998. Integrins, adhesion, and cardiac remodeling. *Hypertension*. 31:176-80.

Huang C, Springer TA. 1995. A binding interface on the I domain of lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) required for specific interaction with intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Biol Chem*. 270:19008-16.

Huang TF. 1998. What have snakes taught us about integrins? *Cell Mol Life Sci*. 54:527-40.

Huang TF, Holt JC, Lukasiewicz H, Niewiarowski S. 1987. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem*. 262:16157-63.

Hughes PE, Diaz-Gonzalez F, Leong L, Wu C, McDonald JA, Shattil SJ, Ginsberg MH. 1996. Breaking the integrin hinge. A defined structural constraint regulates integrin signaling. *J Biol Chem*. 271:6571-4.

Hughes PE, O'Toole TE, Ylanne J, Shattil SJ, Ginsberg MH. 1995. The conserved membrane-proximal region of an integrin cytoplasmic domain specifies ligand binding affinity. *J Biol Chem*. 270:12411-7.

Hughes PE, Pfaff M. 1998. Integrin affinity modulation. *Trends Cell Biol*. 8:359-64.

Humphries MJ. 1999. Towards a structural model of an integrin. *Biochem Soc Symp*. 65:63-78.

Humphries MJ. 1996. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 8:632-40.

Humphries MJ, Newham P. 1998. The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol.* 8:78-83.

Hynes RO. 1996. Targeted mutations in cell adhesion genes: what have we learned from them? *Dev Biol.* 180:402-12.

Hynes RO. 1992 Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69:11-25.

Hynes RO. 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell.* 48:549-54.

Limoto DS, Covell JW, Harper E. 1988. Increase in cross-linking of type I and type III collagens associated with volume-overload hypertrophy. *Circ Res.* 63:399-408.

Irie A, Kamata T, Puzon-McLaughlin W, Takada Y. 1995. Critical amino acid residues for ligand binding are clustered in a predicted beta-turn of the third N-terminal repeat in the integrin alpha 4 and alpha 5 subunits. *EMBO J.* 14:5550-6.

Ivaska J, Heino J. 2000. Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci.* 57:16-24.

Jaspers M, de Meirman C, Schollen E, Vekemans S, Cassiman JJ. 1994. Stable expression of VLA-4 and increased maturation of the beta 1-integrin precursor after transfection of CHO cells with alpha4m cDNA. *FEBS Lett.* 353:239-42.

Ju H, Dixon IM. 1996. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol.* 12:1259-67.

Juliano D, Wang Y, Marcinkiewicz C, Rosenthal LA, Stewart GJ, Niewiarowski S. 1996. Disintegrin interaction with alpha V beta 3 integrin on human umbilical vein endothelial cells: expression of ligand-induced binding site on beta 3 subunit. *Exp Cell Res.* 225:132-42.

Juliano R. 1994. Signal transduction by integrins and its role in the regulation of tumor growth. *Cancer Metastasis Rev.* 13:25-30.

Kamata T, Irie A, Tokuhira M, Takada Y. 1996. Critical residues of integrin alphaIIb subunit for binding of alphaIIbbeta3 (glycoprotein IIb-IIIa) to fibrinogen and ligand-mimetic antibodies (PAC-1, OP-G2, and LJ-CP3). *J Biol Chem.* 271:18610-5.

Kamata T, Liddington RC, Takada Y. 1999. Interaction between collagen and the alpha(2) I-domain of integrin alpha(2)beta(1). Critical role of conserved residues in the metal ion-dependent adhesion site (MIDAS) region. *J Biol Chem.* 274:32108-11.

Kamata T, Puzon W, Takada Y. 1994. Identification of putative ligand binding sites within I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29). *J Biol Chem.* 269:9659-63.

Kamata T, Takada Y. 1994. Direct binding of collagen to the I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29) in a divalent cation-independent manner. *J Biol Chem.* 269:26006-10.

Kappert K, Schmidt G, Doerr G, Wollert-Wulf B, Fleck E, Graf K. 2000. Angiotensin II and PDGF-BB stimulate beta(1)-integrin-mediated adhesion and spreading in human VSMCs. *Hypertension.* 35:255-61.

- Kashiwagi H, Schwartz MA, Eigenthaler M, Davis KA, Ginsberg MH, Shattil SJ. 1997. Affinity modulation of platelet integrin α IIb β 3 by β 3-endonexin, a selective binding partner of the β 3 integrin cytoplasmic tail. *J Cell Biol.* 137:1433-43.
- Kawano H, Cody RJ, Graf K, Goetze S, Kawano Y, Schnee J, Law RE, Hsueh WA. 2000a. Angiotensin II enhances integrin and alpha-actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension.* 35:273-9.
- Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, Hsueh WA. 2000b. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation.* 2000 Mar 14;101(10):1130-7.
- Kim LT, Yamada KM. 1997. The regulation of expression of integrin receptors. *Proc Soc Exp Biol Med.* 214:123-31.
- Kolanus W, Seed B. 1997. Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3. *Curr Opin Cell Biol.* 9:725-31.
- Komoriya A, Green LJ, Mervic M, Yamada SS, Yamada KM, Humphries MJ. 1991. The minimal essential sequence for a major cell type-specific adhesion site (CS1) within the alternatively spliced type III connecting segment domain of fibronectin is leucine-aspartic acid-valine. *J Biol Chem.* 266:15075-9.
- Kumar CC. 1998. Signaling by integrin receptors. *Oncogene.* 17:1365-73.
- Kumar CC, Nie H, Rogers CP, Malkowski M, Maxwell E, Catino JJ, Armstrong L. 1997. Biochemical characterization of the binding of echistatin to integrin α v β 3 receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* 283:843-53.

Kwon MS, Park CS, Choi K, Ahnn J, Kim JI, Eom SH, Kaufman SJ, Song WK. 2000. Calreticulin couples calcium release and calcium influx in integrin-mediated calcium signaling. *Mol Biol Cell*. 11:1433-43.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-5.

LaFlamme SE, Akiyama SK, Yamada KM. 1992. Regulation of fibronectin receptor distribution. *J Cell Biol*. 117:437-47.

Lebien TW, Boue DR, Bradley JG, Kersey JH. 1982. Antibody affinity may influence antigenic modulation of the common acute lymphoblastic leukemia antigen in vitro. *J Immunol*. 129:2287-92.

Lee AA, Dillmann WH, McCulloch AD, Villarreal FJ. 1995. Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol*. 27:2347-57.

Lee JO, Rieu P, Arnaout MA, Liddington R. 1995. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell*. 80:631-8.

Legler DF, Wiedle G, Ross FP, Imhof BA. 2001. Superactivation of integrin alphavbeta3 by low antagonist concentrations. *J Cell Sci*. 114:1545-53.

Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. 2000. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res*. 46:214-24.

Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresh DA, Schwartz SM, Giachelli CM. 1995. The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro. *J Clin Invest.* 95:713-24.

Lin CQ, Bissell MJ. 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 7:737-43.

Lin EC, Ratnikov BI, Tsai PM, Gonzalez ER, McDonald S, Pelletier AJ, Smith JW. 1997. Evidence that the integrin beta3 and beta5 subunits contain a metal ion-dependent adhesion site-like motif but lack an I domain. *J Biol Chem.* 272:14236-43.

Loftus JC, O'Toole TE, Plow EF, Glass A, Frelinger AL 3rd, Ginsberg MH. 1990. A beta 3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science.* 249:915-8.

Loftus JC, Smith JW, Ginsberg MH. 1994. Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. *J Biol Chem.* 269:25235-8.

Longhurst CM, Jennings LK. 1998. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci.* 54:514-26.

Lu C, Takagi J, Springer TA. 2001. Association of the membrane proximal regions of the alpha and beta subunit cytoplasmic domains constrains an integrin in the inactive state. *J Biol Chem.* 276:14642-8.

Mackenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. 2000. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res.* 46:257-63.

MacKenna DA, Dolfi F, Vuori K, Ruoslahti E. 1998. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *J Clin Invest.* 101:301-10.

Mamuya WS, Brecher P. 1992. Fibronectin expression in the normal and hypertrophic rat heart. 1992. *J Clin Invest.* 89:392-401.

Marcinkiewicz C, Calvete JJ, Marcinkiewicz MM, Raida M, Vijay-Kumar S, Huang Z, Lobb RR, Niewiarowski S. 1999a. EC3, a novel heterodimeric disintegrin from *Echis carinatus* venom, inhibits alpha4 and alpha5 integrins in an RGD-independent manner. *J Biol Chem.* 274:12468-73.

Marcinkiewicz C, Calvete JJ, Vijay-Kumar S, Marcinkiewicz MM, Raida M, Schick P, Lobb RR, Niewiarowski S. 1999b. Structural and functional characterization of EMF10, a heterodimeric disintegrin from *Eristocophis macmahoni* venom that selectively inhibits alpha 5 beta 1 integrin. *Biochemistry.* 38:13302-9.

Marcinkiewicz C, Rosenthal LA, Mosser DM, Kunicki TJ, Niewiarowski S. 1996. Immunological characterization of eristostatin and echistatin binding sites on alpha IIb beta 3 and alpha V beta 3 integrins. *Biochem J.* 317 :817-25.

Marcinkiewicz C, Vijay-Kumar S, McLane MA, Niewiarowski S. 1997. Significance of RGD loop and C-terminal domain of echistatin for recognition of alphaIIb beta3 and alpha(v) beta3 integrins and expression of ligand-induced binding site. *Blood.* 90:1565-75.

McLane MA, Kowalska MA, Silver L, Shattil SJ, Niewiarowski S. 1994. Interaction of disintegrins with the alpha IIb beta 3 receptor on resting and activated human platelets. *Biochem J.* 301 :429-36.

McLane MA, Marcinkiewicz C, Vijay-Kumar S, Wierzbicka-Patynowski I, Niewiarowski S. 1998. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proc Soc Exp Biol Med.* 219:109-19.

Meredith JE Jr, Winitz S, Lewis JM, Hess S, Ren XD, Renshaw MW, Schwartz MA. 1996. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev.* 17:207-20.

Mimms LT, Zampighi G, Nozaki Y, Tanford C, Reynolds JA. 1981. Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry.* 20:833-40.

Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol.* 135:1633-42.

Mizejewski GJ. 1999. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med.* 222:124-38.

Morré DJ, Morré DM. 1989. Preparation of mammalian plasma membranes by aqueous two-phase partition. *Biotechniques.* 7:946-8, 950-4, 956-8.

Morré DJ, Reust T, Morré DM. 1994. Plasma and internal membranes from cultured mammalian cells. *Methods Enzymol.* 228:448-50.

Mould AP. 1996. Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *J Cell Sci.* 109 :2613-8.

Mould AP, Askari JA, Aota Si, Yamada KM, Irie A, Takada Y, Mardon HJ, Humphries MJ. 1997. Defining the topology of integrin alpha5beta1-fibronectin interactions using inhibitory anti-alpha5 and anti-beta1 monoclonal antibodies. Evidence that the synergy sequence of fibronectin is recognized by the amino-terminal repeats of the alpha5 subunit. *J Biol Chem.* 272:17283-92.

Mould AP, Askari JA, Humphries MJ. 2000. Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha 5beta 1. I. Specificity of ligand binding is determined by amino acid sequences in the second and third NH2-terminal repeats of the alpha subunit. *J Biol Chem.* 275:20324-36.

Mould AP, Garratt AN, Puzon-McLaughlin W, Takada Y, Humphries MJ. 1998. Regulation of integrin function: evidence that bivalent-cation-induced conformational changes lead to the unmasking of ligand-binding sites within integrin alpha5 beta1. *Biochem J.* 331:821-8.

Muchowski PJ, Zhang L, Chang ER, Soule HR, Plow EF, Moyle M. 1994. Functional interaction between the integrin antagonist neutrophil inhibitory factor and the I domain of CD11b/CD18. *J Biol Chem.* 269:26419-23.

Muller U, Wang D, Denda S, Meneses JJ, Pedersen RA, Reichardt LF. 1997. Integrin alpha8beta1 is critically important for epithelial-mesenchymal interactions during kidney morphogenesis. *Cell.* 88:603-13.

Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB. 1997. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int.* 51:1376-82.

Munujos P, Coll-Canti J, Gonzalez-Sastre F, Gella FJ. 1993. Assay of succinate dehydrogenase activity by a colorimetric-continuous method using iodonitrotetrazolium chloride as electron acceptor. *Anal Biochem.* 212:506-9.

- Naik UP, Patel PM, Parise LV. 1997. Identification of a novel calcium-binding protein that interacts with the integrin α IIb cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 272:4651-4.
- Nermut MV, Green NM, Eason P, Yamada SS, Yamada KM. 1988. Electron microscopy and structural model of human fibronectin receptor. *EMBO J.* 7:4093-9.
- Newham P, Humphries MJ. 1996. Integrin adhesion receptors: structure, function and implications for biomedicine. *Mol Med Today.* 2:304-13.
- Niewiarowski S, McLane MA, Kloczewiak M, Stewart GJ. 1994. Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors. *Semin Hematol.* 31:289-300.
- Otey CA, Vasquez GB, Burrige K, Erickson BW. 1993. Mapping of the alpha-actinin binding site within the beta 1 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 268:21193-7.
- O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH. 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol.* 124:1047-59.
- O'Toole TE, Loftus JC, Plow EF, Glass AA, Harper JR, Ginsberg MH. 1989. Efficient surface expression of platelet GPIIb-IIIa requires both subunits. *Blood.* 74:14-8.
- O'Toole TE, Mandelman D, Forsyth J, Shattil SJ, Plow EF, Ginsberg MH. 1991. Modulation of the affinity of integrin α IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of α IIb. *Science.* 254:845-7.

O'Toole TE, Ylanne J, Culley BM. 1995. Regulation of integrin affinity states through an NPXY motif in the beta subunit cytoplasmic domain. *J Biol Chem.* 270:8553-8.

Oxvig C, Springer TA. 1998. Experimental support for a beta-propeller domain in integrin alpha-subunits and a calcium binding site on its lower surface. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4870-5.

Pelletier AJ, Kunicki T, Quaranta V. 1996. Activation of the integrin alpha v beta 3 involves a discrete cation-binding site that regulates conformation. *J Biol Chem.* 271:1364-70.

Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. 1993. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem.* 129:101-20.

Peter K, Bode C. 1996. A deletion in the alpha subunit locks platelet integrin alpha IIb beta 3 into a high affinity state. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 7:233-6.

Pfaff M, Liu S, Erle DJ, Ginsberg MH. 1998. Integrin beta cytoplasmic domains differentially bind to cytoskeletal proteins. *J Biol Chem.* 273:6104-9.

Pfaff M, McLane MA, Beviglia L, Niewiarowski S, Timpl R. 1994. Comparison of disintegrins with limited variation in the RGD loop in their binding to purified integrins alpha IIb beta 3, alpha V beta 3 and alpha 5 beta 1 and in cell adhesion inhibition. *Cell Adhes Commun.* 2:491-501.

Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* 309:30-3.

Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 275:21785-8.

Price RL, Nakagawa M, Terracio L, Borg TK. 1992. Ultrastructural localization of laminin on in vivo embryonic, neonatal, and adult rat cardiac myocytes and in early rat embryos raised in whole-embryo culture. *J Histochem Cytochem.* 40:1373-81.

Puzon-McLaughlin W, Takada Y. 1996. Critical residues for ligand binding in an I domain-like structure of the integrin beta1 subunit. *J Biol Chem.* 271:20438-43.

Pytela R, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1985. Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell.* 40:191-8.

Rieu P, Ueda T, Haruta I, Sharma CP, Arnaout MA. 1994. The A-domain of beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is a receptor for the hookworm-derived neutrophil adhesion inhibitor NIF. *J Cell Biol.* 127:2081-91.

Rojiani MV, Finlay BB, Gray V, Dedhar S. 1991. In vitro interaction of a polypeptide homologous to human Ro/SS-A antigen (calreticulin) with a highly conserved amino acid sequence in the cytoplasmic domain of integrin alpha subunits. *Biochemistry.* 30:9859-66.

Ruoslahti E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:697-715.

Ruwhof C, van der Laarse A. 2000. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res.* 47:23-37.

Sadhu C, Masinovsky B, Staunton DE. 1998. Differential regulation of chemoattractant-stimulated beta 2, beta 3, and beta 7 integrin activity. *J Immunol.* 160:5622-8.

Sato M, Sardana MK, Grasser WA, Garsky VM, Murray JM, Gould RJ. 1990. Echistatin is a potent inhibitor of bone resorption in culture. *J Cell Biol.* 111:1713-23.

Savage B, Marzec UM, Chao BH, Harker LA, Maraganore JM, Ruggeri ZM. 1990. Binding of the snake venom-derived proteins applaggin and echistatin to the arginine-glycine-aspartic acid recognition site(s) on platelet glycoprotein IIb/IIIa complex inhibits receptor function. *J Biol Chem.* 265:11766-72.

Scarborough RM, Rose JW, Hsu MA, Phillips DR, Fried VA, Campbell AM, Nannizzi L, Charo IF. 1991. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus m. barbouri*. *J Biol Chem.* 266:9359-62.

Scarborough RM, Rose JW, Naughton MA, Phillips DR, Nannizzi L, Arfsten A, Campbell AM, Charo IF. 1993. Characterization of the integrin specificities of disintegrins isolated from American pit viper venoms. *J Biol Chem.* 268:1058-65.

Schnapp LM, Breuss JM, Ramos DM, Sheppard D, Pytela R. 1995. Sequence and tissue distribution of the human integrin alpha 8 subunit: a beta 1-associated alpha subunit expressed in smooth muscle cells. *J Cell Sci.* 108:537-44.

Schlaepfer DD, Hunter T. 1998. Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.* 8:151-7.

Schnee JM, Hsueh WA. 2000. Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res.* 46:264-8.

Schneller M, Vuori K, Ruoslahti E. 1997. Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.* 16:5600-7.

Schoenwaelder SM, Burridge K. 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol.* 11:274-86.

Schwartz MA, Baron V. 1999. Interactions between mitogenic stimuli, or, a thousand and one connections. *Curr Opin Cell Biol.* 11:197-202.

Seki J, Koyama N, Kovach NL, Yednock T, Clowes AW, Harlan JM. 1996. Regulation of beta1-integrin function in cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 78:596-605.

Shattil SJ, Ginsberg MH. 1997. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest.* 100:S91-5.

Shattil SJ, O'Toole T, Eigenthaler M, Thon V, Williams M, Babior BM, Ginsberg MH. 1995. Beta 3-endonexin, a novel polypeptide that interacts specifically with the cytoplasmic tail of the integrin beta 3 subunit. *J Cell Biol.* 131:807-16.

Shebuski RJ, Ramjit DR, Sitko GR, Lumma PK, Garsky VM. 1990. Prevention of canine coronary artery thrombosis with echistatin, a potent inhibitor of platelet aggregation from the venom of the viper, *Echis carinatus*. *Thromb Haemost.* 64:576-81.

Sigel AV, Centrella M, Eghbali-Webb M. 1996. Regulation of proliferative response of cardiac fibroblasts by transforming growth factor-beta 1. *J Mol Cell Cardiol.* 28:1921-9.

Smith JW, Cheresch DA. 1991. Labeling of integrin alpha v beta 3 with $^{58}\text{Co(III)}$. Evidence of metal ion coordination sphere involvement in ligand binding. *J Biol Chem.* 266:11429-32.

Smith JW, Cheresch DA. 1990. Integrin (alpha v beta 3)-ligand interaction. Identification of a heterodimeric RGD binding site on the vitronectin receptor. *J Biol Chem.* 265:2168-72.

Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. 1999. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J.* 18:882-92.

Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. 2000. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res.* 46:225-38.

Springer TA. 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:65-72.

Stewart M, Hogg N. 1996. Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem.* 61:554-61.

Sugimori T, Griffith DL, Arnaout MA. 1997. Emerging paradigms of integrin ligand binding and activation. *Kidney Int.* 51:1454-62.

Suzuki S, Naitoh Y. 1990. Amino acid sequence of a novel integrin beta 4 subunit and primary expression of the mRNA in epithelial cells. *EMBO J.* 9:757-63.

Takada Y, Puzon W. 1993. Identification of a regulatory region of integrin beta 1 subunit using activating and inhibiting antibodies. *J Biol Chem.* 268:17597-601.

Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO. 1986. Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell.* 46:271-82.

Tarone G, Galetto G, Prat M, Comoglio PM. 1982. Cell surface molecules and fibronectin-mediated cell adhesion: effect of proteolytic digestion of membrane proteins. *J Cell Biol.* 94:179-86.

Terracio L, Rubin K, Gullberg D, Balog E, Carver W, Jyring R, Borg TK. 1991. Expression of collagen binding integrins during cardiac development and hypertrophy. *Circ Res.* 68:734-44.

Thibault G. 2000. Sodium dodecyl sulfate-stable complexes of echistatin and RGD-dependent integrins: a novel approach to study integrins. *Mol Pharmacol.* 58:1137-45.

Thibault G, Tardif P, Lapalme G. 2001. Comparative specificity of platelet alpha(IIb)beta(3) integrin antagonists. *J Pharmacol Exp Ther.* 296:690-6.

Tozer EC, Hughes PE, Loftus JC. 1996. Ligand binding and affinity modulation of integrins. *Biochem Cell Biol.* 74:785-98.

Trikha M, De Clerck YA, Markland FS. 1994. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta 1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. *Cancer Res.* 54:4993-8.

Tuckwell D, Calderwood DA, Green LJ, Humphries MJ. 1995. Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens. *J Cell Sci.* 108:1629-37.

Tuckwell DS, Brass A, Humphries MJ. 1992. Homology modelling of integrin EF-hands. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site. *Biochem J.* 285:325-31.

Ueda T, Rieu P, Brayer J, Arnaout MA. 1994. Identification of the complement iC3b binding site in the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:10680-4.

van Husen N, Gerlach U. 1984. 5'-nucleotidase, Colorimetric Method. In *Methods of Enzymatic Analysis* (ed. H-U. Bergmeyer), vol.3, pp.113-120. Verlag Chemie, Weinheim; Deerfield Beach, FL.

Van Nhieu GT, Isberg RR. 1991. The *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the alpha 5 beta 1 integrin receptor. *J Biol Chem.* 266:24367-75.

Vogel BE, Lee SJ, Hildebrand A, Craig W, Pierschbacher MD, Wong-Staal F, Ruoslahti E. 1993. A novel integrin specificity exemplified by binding of the alpha v beta 5 integrin to the basic domain of the HIV Tat protein and vitronectin. *J Cell Biol.* 121:461-8.

Vuori K. 1998. Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J Membr Biol.* 165:191-9.

Weber KT. 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 13:1637-52.

Weber KT, Brilla CG. 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 83:1849-65.

Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. 1994. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 26:279-92.

Wei Y, Yang X, Liu Q, Wilkins JA, Chapman HA. 1999. A role for caveolin and the urokinase receptor in integrin-mediated adhesion and signaling. *J Cell Biol.* 144:1285-94.

Wierzbicka-Patynowski I, Niewiarowski S, Marcinkiewicz C, Calvete JJ, Marcinkiewicz MM, McLane MA. 1999. Structural requirements of echistatin for the recognition of alpha(v)beta(3) and alpha(5)beta(1) integrins. *J Biol Chem.* 274:37809-14.

Yamada KM, Miyamoto S. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr Opin Cell Biol.* 7:681-9.

Ylanne J, Chen Y, O'Toole TE, Loftus JC, Takada Y, Ginsberg MH. 1993. Distinct functions of integrin alpha and beta subunit cytoplasmic domains in cell spreading and formation of focal adhesions. *J Cell Biol.* 122:223-33.

Zak R. 1973. Cell proliferation during cardiac growth. *Am J Cardiol.* 31:211-9.

Zhang L, Plow EF. 1997. Identification and reconstruction of the binding site within alphaMbeta2 for a specific and high affinity ligand, NIF. *J Biol Chem.* 272:17558-64.

Zolotarjova NI, Hollis GF, Wynn R. 2001. Unusually stable and long-lived ligand-induced conformations of integrins. *J Biol Chem.* 276:17063-8.

Remerciements

*Je désire remercier Gaétan Thibault pour son accueil dans son laboratoire.
L'expérience vécue m'a donné le goût de participer à la recherche scientifique.*

Je tiens également à remercier Geneviève Lapalme pour ses bons conseils techniques.