

2m11.2930.5

Université de Montréal

Régulation de l'expression des intégrines de type RGD  
chez les cellules des muscles lisses vasculaires

Par

Emilie Viel

**Programme de biologie moléculaire**

Faculté des études supérieures

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

Octobre, 2001

©Emilie Viel, 2001



QH  
506  
U54  
2002  
V.007

## **Page d'identification du jury**

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Régulation de l'expression des intégrines de type RGD  
chez les cellules des muscles lisses vasculaire

présenté par:

Emilie Viel

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Martin Sirois, président-rapporteur

Dr Gaétan Thibault, directeur

Dr Jean St-Louis, membre du jury

Mémoire accepté le:

## SOMMAIRE

L'athérosclérose est un des processus importants impliqués dans le développement de la maladie cardiovasculaire. Le remodelage vasculaire, caractérisé par la modification de la matrice extracellulaire (ECM) et la croissance des cellules des muscles lisses vasculaires (VSMC) est observé lors de l'établissement de l'athérosclérose. Les modifications de l'ECM sont perçues, entre autres, par les intégrines de type RGD (Arg-Gly-Asp) capables d'initier certaines voies de signalisation par les foyers d'adhésion et de modifier leur affinité pour le ligand. Par conséquent, les intégrines de type RGD deviennent des facteurs potentiels dans l'apparition du remodelage vasculaire. L'hypothèse de cette étude est que les VSMC modulent l'expression des intégrines de type RGD lorsqu'elles sont stimulées par des facteurs de croissance et que les intégrines sont directement impliquées dans la croissance des VSMC. Cette hypothèse a été vérifiée par la stimulation *in vitro* des VSMC de l'aorte et de l'artère mésentérique par l'angiotensine II, le PDGF-BB et la thrombine. La quantification de fibronectine par ELISA a montré l'augmentation de la sécrétion de fibronectine par les VSMC stimulées, indiquant l'implication de ces agents dans l'altération de l'ECM. Les intégrines de type RGD  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  exprimées par les VSMC en culture ont été identifiées par une analyse de type Western et par un test de radioliation. Ce test n'a pas permis de discriminer les intégrines  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  entre elles. Le test de radioliation marquant spécifiquement les intégrines de type RGD à l'aide de l'échistatine iodée a permis d'évaluer l'augmentation qualitative de liaisons entre l'intégrine et le ligand en fonction des stimulations. Des tests de saturation des récepteurs ont permis de calculer les pKd (constantes de dissociation) et les Bmax (quantité de récepteurs exprimés) des intégrines de type RGD. Nous avons observé l'augmentation de l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$  dans les deux types cellulaires en présence d'angiotensine II. Nos résultats ont montré que le PDGF-BB n'a pas d'effet sur les intégrines étudiées alors que la thrombine augmente l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$ , l' $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  et l' $\alpha_v\beta_3$  chez les VSMC aortiques ainsi que l'expression de l' $\alpha_v\beta_3$  chez les VSMC mésentériques. En présence d'acide

rétinoïque, l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$  est augmentée, suggérant que l'intégrine puisse être un marqueur de la cellule différenciée puisque l'acide rétinoïque est un agent de différenciation cellulaire. Finalement, la localisation des intégrines étudiées aux foyers d'adhésion par une immunolocalisation suggère l'activation de certaines voies de signalisation par les intégrines. Il est connu que les voies de signalisation activées par les intégrines de type RGD sont les mêmes que celles activées par l'angiotensine II et la thrombine. Par conséquent, l'augmentation de l'expression des intégrines de type RGD pourrait permettre à l'angiotensine II et la thrombine d'amplifier leur signal initial par les mêmes voies de signalisation. Si tel est le cas, l'altération de l'expression des intégrines de type RGD pourrait être une cible thérapeutique contre le remodelage vasculaire.

Mots-clés: intégrines, remodelage vasculaire, matrice extracellulaire, foyers d'adhésion, régulation

## SUMMARY

Atherosclerosis is one of the most important pathological processes implicated in the development of cardiovascular disease. The formation of atherosclerotic plaques occurs as a result of vascular remodelling. Vascular remodelling is characterised by the alteration of the extracellular matrix (ECM) and vascular smooth muscle cells (VSMC) growth. The changes in the ECM can be detected by the RGD-dependent integrins which can activate certain signalling pathways at the focal adhesion sites and modulate their ligand affinity. Therefore, RGD-dependent integrins are potentially implicated in vascular remodelling. We hypothesise that VSMC are able to modulate RGD-dependent integrins expression when these cells are stimulated by growth factors and that integrins might be directly implicated in VSMC growth. We tested our hypothesis *in vitro* using aortic and mesenteric VSMC stimulation by angiotensin II, PDGF-BB and thrombin. Fibronectin quantification by ELISA has shown increases in fibronectin secretion by VSMC upon stimulation. These results indicate that all the growth factors we tested are implicated in ECM alteration. The RGD-dependent integrins  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  were identified by western blot in addition to echistatin-based assay. The echistatin-based assay whereby  $^{125}\text{I}$ -echistatin specifically binds to RGD-dependent integrins was used to evaluate qualitative increases in ligand bound to integrin for each stimulation.  $pK_d$  (dissociation constant) and  $B_{max}$  (receptor quantities expressed) of integrins were calculated with saturation test based on the echistatin-based assay. We observed an increase of  $\alpha_8\beta_1$  expression in both cell types when stimulated with angiotensin II. Our results show no effect on integrins when these cells are stimulated with PDGF-BB. However, thrombin increases integrins  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  and  $\alpha_v\beta_3$  expression in aortic VSMC and increases the  $\alpha_v\beta_3$  expression in mesenteric VSMC. The expression is further increased with the addition of retinoic acid suggesting that this integrin is a cellular differentiation marker because retinoic acid is a cellular differentiation factor. Also, the localisation of integrins at focal adhesion sites by immunolocalisation suggests certain signalling pathways may be activated by way of integrins. It is known that the signalling pathways activated by RGD-dependent integrins, angiotensin II and

thrombin are the same. Therefore, our results suggest that angiotensin II and thrombin modulate the expression of integrins in order to amplify the initial signal. If so, alteration in integrin expression may be used as a therapeutic target for vascular remodelling.

Keyword: integrins, vascular remodelling, extracellular matrix, focal adhesion, regulation.

## TABLE DES MATIERES

<b>TABLE DES MATIERES</b> .....	i
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	iv
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	v
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	vii
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	ix
 <b><u>CHAPITRE1. INTRODUCTION</u></b>	
1.1 Généralités .....	1
1.2 Particularité des VSMC .....	2
1.2.1 Les deux phénotypes.....	2
1.2.2 Modulation du phénotype .....	3
1.2.2.1 Généralités .....	3
1.2.2.2 Modulation par la matrice extracellulaire .....	4
1.2.2.3 Réorganisation du cytosquelette .....	6
1.2.2.4 Inhibition du phénotype synthétique .....	8
1.3 Matrice extracellulaire .....	9
1.3.1 Généralités .....	9
1.3.2 Fibronectine .....	10
1.4 Intégrines .....	12
1.4.1 Structure des intégrines .....	12
1.4.2 Fonctions .....	16
1.4.2.1 Modulation de l'affinité pour le ligand (inside-out) .....	16
1.4.2.2 Signalisation intracellulaire: mécanisme outside-in .....	18
1.4.2.2.1 Activation des protéines tyrosine kinases .....	18
1.4.2.2.2 Modification des fonctions cellulaires .....	22
1.4.2.2.3 Concentrations intracellulaires d'ions .....	23
1.4.2.2.4 Métabolisme des lipides et activation de Rho .....	24



1.4.3 Étude pharmacologique .....	24
1.5 But du projet .....	26
<b><u>CHAPITRE 2. MATERIEL ET METHODES</u></b>	
2.1 Culture cellulaire .....	28
2.1.1 Cellules des muscles lisses de l'aorte thoracique .....	28
2.1.2 Cellules des muscles lisses mésentériques .....	29
2.2 Protéines solubilisées .....	30
2.3 Dosage protéique par Bradford .....	31
2.4 Test de radioliation .....	31
2.5 Test ELISA (Enzyme Link Immunosorbay Assay) .....	33
2.6 Buvarpage de type Western .....	34
2.7 Analyse de croissance cellulaire .....	35
2.8 Profil radioactif d'intégrine de type RGD marquées à I <sup>125</sup> .....	36
2.9 Dosage d'ADN par crystal violet .....	37
2.10 Analyse de la densité de récepteurs exprimés .....	37
2.10.1 Courbe de saturation .....	37
2.10.2 Courbe de Scatchard .....	38
2.11 Immunocytochimie .....	40
2.12 Analyse statistique .....	41
<b><u>CHAPITRE 3. RESULTATS</u></b>	
3.1 Identification des conditions expérimentales .....	42
3.1.1 Caractérisation cellulaire .....	42
3.1.2 Passage cellulaire .....	45
3.2 Sécrétion de fibronectine .....	45
3.2.1 Dosage de fibronectine sécrétée par les VSMC de l'aorte .....	46
3.2.2 Dosage de fibronectine sécrétée par les VSMC mésentériques .....	46
3.3 Identification des intégrines de type RGD .....	49
3.3.1 Buvarpage de type Western avec les protéines des VSMC aortique .....	49
3.3.2 Buvarpage de type Western avec les protéines des VSMC mésentériques .....	51
3.4 Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD .....	53

3.4.1	Étude des intégrines de type RGD des VSMC aortiques	.....53
3.4.1.1	Stimulation de la synthèse d'ADN	.....53
3.4.1.2	Stimulation de la synthèse protéique	.....55
3.4.1.3	Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD	.55
3.4.1.4	Quantité de récepteurs exprimés	.....58
3.4.1.5	Expression des intégrines de type RGD en fonction d'une réaction concentration-réponse	.....60
3.4.1.6	Inhibition de la prolifération cellulaire et modification de l'expression des intégrines de type RGD	.....60
3.4.2	Étude des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques	.64
3.4.2.1	Stimulation de la synthèse d'ADN	.....65
3.4.2.2	Stimulation de la synthèse protéique	.....65
3.4.2.3	Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD	.65
3.4.2.4	Quantité de récepteurs exprimés	.....69
3.4.2.5	Expression des intégrines de type RGD en fonction d'une réaction concentration-réponse	.....69
3.5	Localisation des intégrines de type RGD aux foyers d'adhésion	.....72
3.5.1	Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC aortiques aux foyers d'adhésion	.....72
3.5.2	Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques aux foyers d'adhésion	.....73
<b><u>CHAPITRE 4. DISCUSSION</u></b>		
4.1	Expression des intégrines de type RGD	.....78
4.2	Modulation de l'expression des intégrines de type RGD	.....79
4.3	Localisation des intégrines aux foyers d'adhésion	.....88
CONCLUSION		.....91
RÉFÉRENCES		.....92

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Familles d'intégrines .....	13
Tableau II. pKd des intégrines exprimées par les VSMC aortiques après différentes stimulations .....	59
Tableau III. Bmax des intégrines exprimées par les VSMC aortiques après différentes stimulations .....	59
Tableau IV. pKd des intégrines exprimées par les VSMC mésentériques après différentes stimulations .....	70
Tableau V. Bmax des intégrines exprimées par les VSMC mésentériques après différentes stimulations .....	70

## LISTES DES FIGURES

Figure 1. Différentes formes de collagène de type I régulent l'activité de la cycline E-cdk2 .....	5
Figure 2. Représentation schématique des voies de signalisation de Cdc42, Rac et Rho dans les cellules de mammifères .....	7
Figure 3. Domaines de liaison de la fibronectine pour différentes molécules ..	11
Figure 4. Structure des intégrines .....	14
Figure 5. Modèle de la modulation de l'affinité des intégrines pour leur ligand ..	18
Figure 6. Formation des foyers d'adhésion .....	20
Figure 7. Modèle de la voie de signalisation de pp125 <sup>FAK</sup> .....	21
Figure 8. Modèle de la voie de signalisation de Shc .....	21
Figure 9. Courbes de saturation et courbes de Scatchard (encart) de l'intégrine $\alpha 8\beta 1$ des VSMC mésentériques en fonction des facteurs de croissance .....	39
Figure 10. Visualisation de la caractérisation cellulaire .....	43
Figure 11. Identification du passage cellulaire à étudier .....	44
Figure 12. Sécrétion de fibronectine par les VSMC aortiques .....	47
Figure 13. Sécrétion de fibronectine par les VSMC mésentériques .....	48
Figure 14. Identification des intégrines de type RGD exprimées par les VSMC aortiques .....	50
Figure 15. Identification des intégrines de type RGD exprimées par les VSMC mésentériques .....	52
Figure 16. Stimulation de la synthèse d'ADN chez les VSMC aortiques .....	54
Figure 17. Stimulation de la synthèse protéique chez les VSMC aortiques .....	56
Figure 18. Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD des VSMC aortiques .....	57
Figure 19. Expression des intégrines de type RGD et stimulation des VSMC aortiques en fonction de concentrations croissantes d'All .....	61

Figure 20. Expression des intégrines de type RGD et stimulation des VSMC aortiques en fonction de concentrations croissantes de thrombine	..62
Figure 21. Expression des intégrines de type RGD et stimulation des VSMC aortiques en présence d'acide rétinoïque (AR)	.....63
Figure 22. Stimulation de la synthèse d'ADN chez les VSMC mésentériques	..66
Figure 23. Stimulation de la synthèse protéique chez les VSMC mésentériques	..67
Figure 24. Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques	.....68
Figure 25. Expression des intégrines de type RGD et stimulation des VSMC mésentériques en fonction de concentrations croissantes de thrombine	.....71
Figure 26. Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC aortiques aux foyers d'adhésion	.....74
Figure 27. Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC aortiques aux foyers d'adhésion (suite)	.....75
Figure 28. Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques aux foyers d'adhésion	.....76
Figure 29. Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques aux foyers d'adhésion (suite)	.....77
Figure 30. Modèle de l'implication des intégrines de type RGD dans la croissance des VSMC en présence de thrombine ou d'angiotensine II	.....90

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ac	Anticorps
bFGF	Facteur de croissance basique des fibroblastes
BSA	Albumine de sérum bovin
CAS	Substrat associé à crk
Cdk	Kinase dépendante de la cycline
CRK	Protéine originant du virus du sarcome aviaire
Ctrl	Contrôle
DO	Densité optique
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
ECM	Matrice extracellulaire
ERK	<i>Extracellular signal-related kinase</i>
FAK	Kinase des foyers d'adhésion
FBS	Sérum foetal de bovin
FCS	Sérum foetal de veau
GAP	Protéine activée par la GTPase
GDP	Guanine diphosphate
GEF	Facteur d'échange de guanine
GTP	Guanine triphosphate
GTPase	Guanine triphosphatase
I	Inhibiteur
IADPS	Isoleucine-alanine-aspartate-proline-sérine
ILK	Kinase liant l'intégrine
JNK	Kinase c-jun N-terminale
kDa	Kilodalton
LC	Site compétent pour le ligand

LPA	Acide lysophosphatidique
LVD	Leucine-valine-aspartate
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MIDAS	<i>metal ion-dependent adhesion site</i>
MLC	Chaîne légère de la myosine
MLCK	Kinase de la chaîne légère de la myosine
MMP	Métalloprotéase de la matrice
PAGE	Electrophorèse
PAK	Kinase activant p21
PBS	Tampon sel-phosphate
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PIP2	Phosphate phosphatidylinositol
PKA	Protéine kinase A
POR1	Partenaire de rac
pp125 <sup>FAK</sup>	Kinase des foyers d'adhésion
Ras	Protéine originant du sarcome murin
REDV	Arginine-glutamate-aspartate-valine
RGD	Arginine-glycine-aspartate
ROK	Rho kinase
Rpm	Rotation par minute
SDS	Sulfate dodécyl de sodium
SH	Domaine homologue à src
Smemb-myosin	Myosine embryogénique
SOS	Son of sevenless
Src	protéine originant du sarcome aviaire rous
TGFβ	Facteur de croissance transformant bêta
VSMC	Cellules des muscles lisses vasculaires
WASP	protéine du syndrome de Wiskott aldrich

## **REMERCIEMENTS**

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Gaétan Thibault de m'avoir permis de réaliser ce projet ainsi que de l'intérêt et de la confiance qu'il m'a accordée durant ces deux années. Je tiens également à exprimer ma reconnaissance envers Geneviève Lapalme pour son support technique.

Je remercie le Dr Christian Deschepper pour la patience qu'il m'a témoignée lors de l'utilisation de son équipement de laboratoire.

Finalement, merci Ahmad pour ton immense soutien tout au long de ma maîtrise, tu es une source de motivation inépuisable.



## CHAPITRE 1. INTRODUCTION

### **1.1 Généralités**

Une des causes premières de mortalité au monde est la maladie cardiovasculaire sous toutes ses formes (Levy *et al*, 1990). Parmi celles-ci sont retrouvées les lésions d'athérosclérose et de resténose qui peuvent mener à l'ischémie du cœur qui, en cas extrême, aboutit à l'infarctus. Ces pathologies impliquent, entre autres, la sécrétion anormale d'hormones par les cellules endothéliales retrouvées dans la partie interne de la paroi vasculaire (tunique intima) et un dysfonctionnement du cycle cellulaire des cellules des muscles lisses de la couche médiane (tunique média) (Reilly, 1991; Ross, 1993). Ces types cellulaires contrôlent le diamètre artériel, la résistance périphérique et le flux sanguin. Les altérations de la pression artérielle, du flux sanguin et des forces mécaniques jouent un rôle important dans l'adaptation des vaisseaux sanguins adultes menant à l'apparition de l'hypertension (Langille, 1993; Folkow, 1990).

Un des processus souvent retrouvé dans les cas d'hypertension est l'épaississement de la paroi vasculaire. Ceci est causé par la prolifération et la migration des cellules des muscles lisses vasculaires (VSMC) de la média vers l'intima (Bondjers, 1994; Ross *et al.*, 1986; Border *et al.*, 1994). Puis, leur prolifération dans l'intima entraîne la formation de la néointima suite à la sécrétion de facteurs de croissance et de protéines de la matrice extracellulaire par les cellules avoisinantes (cellules endothéliales, macrophages, VSMC) (Bondjers, 1994; Ross *et al.*, 1986; Border *et al.*, 1994). Le remodelage vasculaire peut également être observé lors de la division anormale des VSMC sans impliquer la migration cellulaire.

Il a été démontré à maintes reprises, que les intégrines (récepteurs d'adhésion cellulaire) sont impliquées dans la prolifération cellulaire, la migration et la synthèse de la matrice extracellulaire (ECM). Ces modifications sont l'essence de l'hypertension. Durant ces processus, l'ostéopontine (protéine

adhésive soluble de l'ECM) est surrégulée et, via les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_v\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_5$ , diminue l'adhésion des VSMC aux protéines insolubles de l'ECM pour permettre la migration cellulaire (Liaw *et al.*, 1995). Également, le récepteur  $\alpha_2\beta_1$  entraîne la contraction des fibres de collagène (protéines de l'ECM) et la migration des VSMC (Skinner *et al.*, 1994). Finalement, les cytokines présentes dans la lésion vasculaire, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et le facteur de croissance bêta transformant (TGF $\beta$ ), augmentent l'expression de la sous-unité  $\beta_1$  qui facilite la migration et la prolifération des VSMC (Janat *et al.*, 1992). Ces observations suggèrent que les intégrines seraient des régulateurs de l'angiogénèse, processus important dans la pathogénèse impliquant les vaisseaux (Hillis *et al.*, 1996).

Au fil de cette recherche, nous tenterons de cerner la problématique entourant l'implication des intégrines dans le remodelage vasculaire. Il sera tout d'abord traité, dans cette partie, de la particularité de prolifération de la cellule musculaire lisse lorsqu'elle est mise en culture. Ensuite, il sera fait mention des protéines de la matrice extracellulaire qui font le lien entre les intégrines et plusieurs aspects du processus de remodelage vasculaire. Finalement, la structure et les fonctions des intégrines seront approfondies.

## **1.2 Particularité des VSMC**

### **1.2.1 Les deux phénotypes**

La cellule musculaire lisse vasculaire est retrouvée sous deux formes : le phénotype contractile et le phénotype synthétique. Les VSMC de la media d'artères normales sont des cellules complètement différenciées et sont décrites comme étant contractiles. Elles ne prolifèrent pas et sécrètent très peu de protéines. Elles sont arrangées en couches concentriques et contiennent des myofilaments ainsi qu'un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique peu développés (Thyberg *et al.*, 1990). Les marqueurs fortement exprimés par ce

phénotype sont, entre autres, l' $\alpha$ -actine des muscles lisses, la desmine, les chaînes lourdes de la myosine et la tropomyosine (Gabbiani *et al.*, 1984; Aikawa *et al.*, 1993; Kocher *et al.*, 1994).

Au contraire, les VSMC retrouvées dans l'intima des lésions athéromateuses sont des cellules indifférenciées ayant un phénotype synthétique. Elles sont composées de peu ou parfois d'aucun myofilaments, ont un grand pouvoir de division cellulaire et contiennent un imposant réticulum endoplasmique rugueux et des vésicules de Golgi développées (Thyberg *et al.*, 1990). Les marqueurs surrégulés du phénotype synthétique sont la myosine embryogénique (Smemb-myosin), la kinase de la chaîne légère de la myosine embryogénique (MLCK-210 kDa), la caldesmone à faible poids moléculaire et la vimentine (Reckless *et al.*, 1994; Kuro-o *et al.*, 1991; Gallagher *et al.*, 1994). Cependant, l'expression des marqueurs du phénotype contractile n'est pas totalement inhibée mais simplement sous-régulée par le phénotype synthétique (Gabbiani *et al.*, 1984; Aikawa *et al.*, 1993; Kocher *et al.*, 1994). Le phénotype synthétique est retrouvé dans les cultures des VSMC. Lorsque les cellules de la tunique média d'artères normales de mammifères sont isolées et mises en culture, elles réorganisent leurs protéines structurales en une architecture similaire à celle des cellules retrouvées dans la néointima d'où la comparaison des VSMC *in vitro* avec les VSMC au phénotype synthétique *in vivo* (Song *et al.*, 2001). La culture cellulaire est devenue, par conséquent, un model expérimental permettant d'étudier la régulation des structures et fonctions des VSMC (Chambley-Campbell *et al.*, 1979).

## **1.2.2 Modulation du phénotype**

### **1.2.2.1 Généralités**

La modulation du phénotype des VSMC peut survenir à deux niveaux: le contrôle de l'expression des gènes caractéristiques des VSMC; et les conditions

environnementales locales pouvant intervenir dans le programme de régulation transcriptionnelle. Le contrôle du phénotype différencié (contractile) des VSMC a été hautement attribué à une dépendance des conditions environnementales: facteurs de croissance, stress mécanique, influences neuronales, composants de l'ECM et interaction cellule-cellule (Owens, 1995). Il a été démontré que les cellules endothéliales peuvent sécréter des facteurs positifs et négatifs de différenciation des VSMC.

En effet, les cellules endothéliales (tunique intima) sécrètent l'héparine, le TGF- $\beta$  (facteurs anti-prolifératifs) (Campbell *et al.*, 1986) et des agonistes vasoconstricteurs tel que l'angiotensine II qui augmentent l'expression des marqueurs du phénotype contractile (Turla *et al.*, 1991). Les cellules endothéliales sécrètent également le PDGF et le facteur de croissance basale des fibroblastes (bFGF) qui peuvent aussi être produits par les VSMC et agir de manière autocrine ou paracrine sur la division cellulaire (Gajdusek *et al.*, 1982 : Hannan *et al.*, 1988).

Quant au stress mécanique, il serait un stimulus pour les mécanorécepteurs. Ceux-ci entraîneraient la réorientation des cellules et l'augmentation de la synthèse protéique, de la synthèse d'ADN et de la production de l'ECM (Kanda *et al.*, 1994). L'ECM a de profonds effets sur les comportements de la cellule incluant la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire.

### **1.2.2.2 Modulation par la matrice extracellulaire**

Le remodelage vasculaire ainsi que la resténose et l'athérosclérose impliquent l'altération de l'ECM par plusieurs types cellulaires. Ce phénomène est également observé dans les systèmes de culture. *In vivo*, les macrophages infiltrés et les VSMC activées augmentent la sécrétion de métalloprotéases de la matrice (MMP) qui contribuent à la dégradation de l'ECM (Galis *et al.*, 1994). Les VSMC de la média normale sont entourées d'une ECM dense composée de fibres de collagène de type I, III, IV, V et VI et de laminine (Voss *et al.*, 1986; Katsuda *et al.*, 1992; McCullagh *et al.*, 1980). Il semble que l'ECM de la média

normale soit non permissive à la prolifération des VSMC alors que la dégradation de l'ECM est requise pour induire leur migration et leur prolifération (Raines *et al.*, 1999). Dans les conditions environnementales normales, les fibres de collagène lient l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$ . Cette liaison augmente la quantité d'inhibiteurs de cdk2 (p21 et p27) et arrête la progression du cycle cellulaire des VSMC à la phase G1. Lors de lésions vasculaires, les fibres sont transformées en monomères de collagène par les MMP. Cette forme de collagène inhibe la cycline E-cdk2 permettant ainsi de poursuivre le cycle cellulaire des VSMC (figure 1) (Koyama *et al.*, 1996). Ainsi, les monomères de collagène permettent l'apparition du phénotype synthétique.

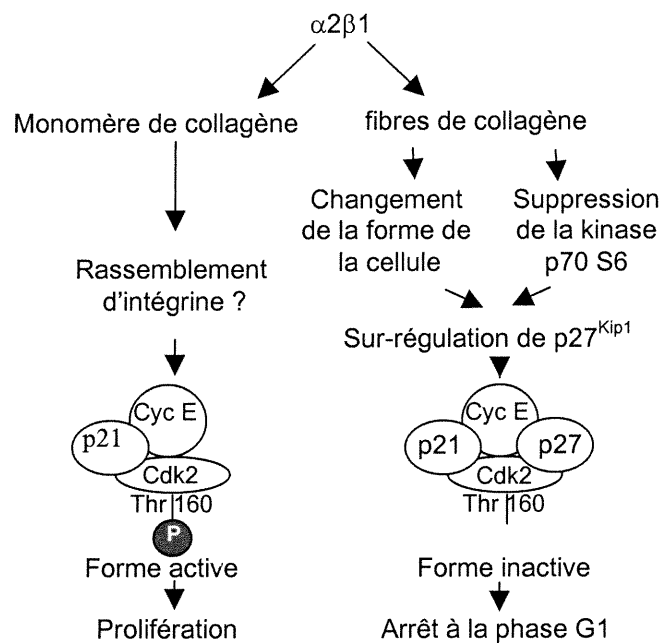


Figure 1. **Différentes formes de collagène de type I régulent l'activité de la cycline E-cdk2.** En condition non-permissive (fibres de collagène), la surrégulation de p21<sup>Cip1</sup> et p27<sup>Kip1</sup> prévient la progression du cycle cellulaire. La sous-régulation de p27<sup>Kip1</sup> stimulée par le collagène monomérique permet à la cellule de se répliquer en réponse aux facteurs de croissance. Cyc E (cycline E), cdk2 (kinase dépendante de la cycline). Tiré de Raines *et al.* (2000).

Les VSMC en culture produisent une variété de protéines de l'ECM incluant les collagènes, l'élastine, la laminine, les glycosaminoglycans, l'ostéopontine, la ténascine C, la thrombospondine et la fibronectine. Les protéines anti-adhésives telles que l'ostéopontine, la thrombospondine et la ténascine C sont impliquées dans la migration cellulaire (Sage *et al.*, 1991). La laminine, un constituant de la média normale, inhibe le changement du phénotype contractile en phénotype

synthétique alors que la fibronectine permet cette conversion (Hedin *et al.*, 1988). La fibronectine a été la protéine de l'ECM la plus étudiée puisqu'elle est associée au changement de phénotype. L'apparition du phénotype synthétique sur une matrice de fibronectine dépend de l'interaction entre la protéine et son récepteur cellulaire (Bottger *et al.*, 1989). En effet, les effets du collagène polymérisé (permettant la différenciation cellulaire) sont inhibés en présence des récepteurs de fibronectine  $\alpha_5\beta_1$  qui modulent l'assemblage des fibres de fibronectine (Koyama *et al.*, 1996). La régulation du phénotype synthétique par l'ECM semble être intimement liée à la formation de foyers d'adhésion activant la voie des MAPK accompagnée de la réorganisation du cytosquelette (Hedin *et al.*, 1997).

### 1.2.2.3 Réorganisation du cytosquelette

Lorsque les VSMC en culture adhèrent à la fibronectine ou au support de plastique, elles réorganisent leur actine suivant des événements séquentiels distincts. Les cellules s'attachent et commencent à s'étaler sur le substrat organisant l'actine en filopodes (minces prolongements membranaires) et en lamellipodes (fins feuillets membranaires). A cette étape, le contact avec le support est stabilisé, de petits foyers d'adhésion sont formés progressivement menant à l'organisation des fibres d'actine en fibres de stress (Huttenlocher *et al.*, 1995). Les fibres de stress sont des rassemblements de filaments d'actine qui traversent la cellule jusqu'aux foyers d'adhésion retrouvés spécifiquement au contact de la membrane plasmique avec le support. Les foyers d'adhésion sont un regroupement d'intégrines qui permet d'augmenter l'adhésion de la cellule au support. (Schoenwaelder *et al.*, 1999).

Les Rho-like GTPase sont les régulateurs clés de l'organisation du cytosquelette d'actine. Leur activité est stimulée par les signaux intracellulaires ou les stimuli extracellulaires. Les protéines Rho sont des membres de la superfamille Ras et celles impliquées spécifiquement dans les stimuli

extracellulaires sont RhoA, Cdc42 et Rac ayant chacune leur voie moléculaire distincte décrite dans la figure 2.

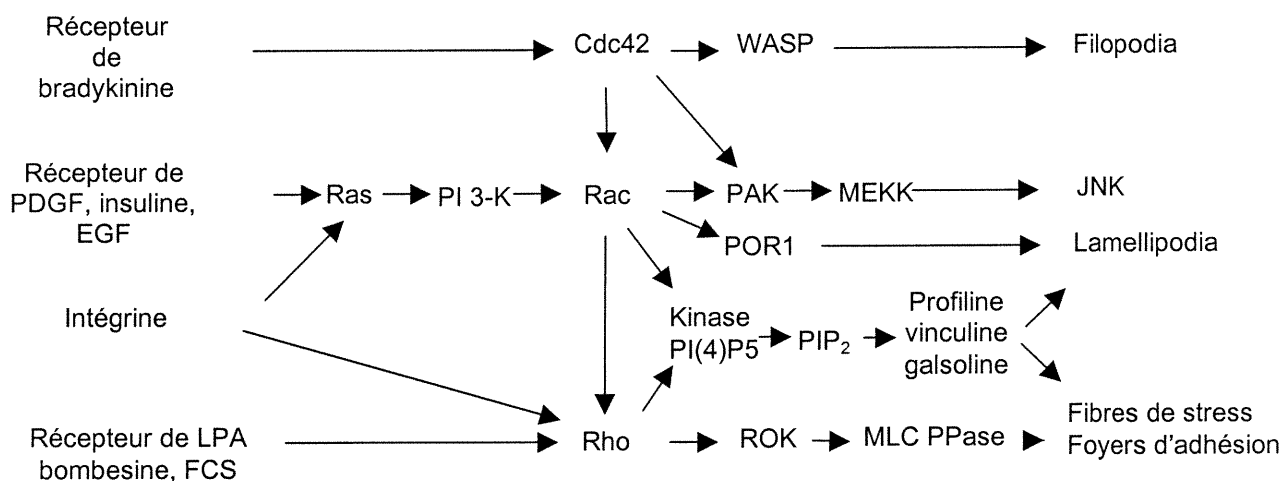


Figure 2. Représentation schématique des voies de signalisation de Cdc42, Rac et Rho dans les cellules de mammifères. Modifié de Schmidt *et al.* (1998)

L'activation de Cdc42 est requise pour réguler les phases précoces d'étalement cellulaire sur la fibronectine et mène à l'activation de Rac. Ces deux molécules sont impliquées dans la migration et l'invasion cellulaire par la formation d'une lamellipodia étirée (Keely *et al.* 1997; Price *et al.*, 1998). RhoA contrôle la production de fibres de stress et de foyers d'adhésion en réponse aux agents mitogènes entre autres ou à l'activation par Rac (Ridley *et al.*, 1992). RhoA stimule la contraction du complexe actine-myosine contribuant à l'assemblage de fibres de stress et de foyers d'adhésion (Schoenwaelder *et al.*, 1999).

La formation de foyers d'adhésion est rarement observée *in vivo*, à l'exception des sites de hauts stress hydrodynamiques où l'on retrouve les cellules endothéliales vasculaires (Yamada *et al.*, 1995). Les foyers d'adhésion ont été avant tout observés *in vitro* lorsque les cellules adhèrent à un substrat de fibronectine (Burrige *et al.*, 1996). L'organisation de l'actine et la distribution des intégrines sont étroitement liées. Lorsque les intégrines lient les protéines de l'ECM, elles se rassemblent le long de la membrane cellulaire et s'associent au cytosquelette. RhoA activé par les intégrines contribue à l'assemblage des fibres

de stress et des foyers d'adhésion en stimulant la contraction basée sur les fibres actomyosines (Burrige *et al.*, 1996; Burrige *et al.*, 1997). RhoA-GTP active plusieurs kinases sérine/thréonine qui inhibent l'activation de la phosphatase de la myosine en la phosphorylant. Par conséquent, l'augmentation de la chaîne légère de la myosine phosphorylée permet l'assemblage de filaments de myosine et la contraction. Ces effets résultent en la formation d'un paquet de filaments d'actine dont la tension est transmise aux intégrines par leur association au cytosquelette (Schoenwaelder *et al.*, 1999). C'est un système de boucle positive étant donné qu'un plus grand rassemblement d'intégrines entraîne une augmentation de l'adhésion à l'ECM permettant une réorganisation plus grande des filaments (Giancotti *et al.*, 1999).

Les fibres de stress et les foyers d'adhésion peuvent servir de marqueurs du phénotype synthétique retrouvé en culture. Il est possible également d'inhiber l'apparition du phénotype synthétique en culture en utilisant différents substrats ou en modifiant certains facteurs (Schoenwaelder *et al.*, 1999). La cellule perd alors tout contact avec le substrat, ceci étant causé par l'inhibition de la formation de foyers d'adhésion (Lampugnani *et al.*, 1990).

#### **1.2.2.4 Inhibition du phénotype synthétique**

La sous-régulation du phénotype synthétique des cellules en culture est possible lorsque la matrice extracellulaire le permet. Il a été démontré (Hedin *et al.*, 1988) que la laminine inhibe la conversion du phénotype contractile en phénotype synthétique des VSMC en culture. Les fibres de collagène modulent également le phénotype par une diminution de la formation de foyers d'adhésion ainsi que le retardement de l'étalement cellulaire. Ceci diminue la prolifération cellulaire et le niveau d'inhibiteur de la kinase dépendante de la cycline (cdk) (Folkman *et al.*, 1978; Fang *et al.*, 1996).

De plus, il existe une matrice synthétique, le Matrigel, composée de laminine, collagène, héparane sulfate protéoglycan, entactine et nidogène qui semble être un modèle pour conserver ou retrouver le phénotype contractile en culture cellulaire (Kleinman *et al.*, 1982). Il semblerait que l'activation de MAPkinase par



les foyers d'adhésion, entre autres, serait inhibée lors de la croissance des VSMC sur le Matrigel (Li *et al.*, 1994).

Le perlecan (protéoglycan prédominant dans la membrane basale) peut également être utilisé dans une culture de VSMC afin de conserver le phénotype contractile. Il a été démontré que cette protéine inhibe l'adhésion de la cellule à la fibronectine sans avoir ses propriétés anti-adhésive sur la laminine (Lundmark *et al.*, 2001).

Finalement, de nombreuses études montrent que l'acide rétinoïque agit comme un agent de différenciation cellulaire. En effet, les rétinoïdes, dérivés actifs de la vitamine A, inhibent la prolifération des VSMC en culture en modulant les régulateurs du cycle cellulaire (Wakino *et al.*, 2001). Ils stimulent la différenciation cellulaire en augmentant le niveau de p27<sup>Kip1</sup> tout en diminuant celui des cyclines A et D (nécessaire pour entrer dans la phase S) (Miano *et al.*, 2001).

Ces techniques ont été utilisées dans le but de comprendre les voies de signalisation impliquées dans les modifications de phénotype. Plusieurs font appel à la matrice extracellulaire, facteur primaire menant à la conversion du phénotype des VSMC.

### **1.3 Matrice extracellulaire**

#### **1.3.1 Généralités**

Dans le tissu vasculaire, les cellules occupent normalement un petit volume alors qu'un réseau de macromolécules défini comme l'ECM prend une part considérable du tissu. L'ECM est composée d'une variété de polysaccharides et de protéines sécrétés par les cellules (Wysoki *et al.*, 1996). Les constituants majeurs de l'ECM incluent des molécules cellulaires adhésives et anti-adhésives, telles que la fibronectine, la vitronectine, la laminine et la ténascine; des composants structuraux comme les collagènes et l'élastine; et des protéoglycans, un complexe construit de protéines avec des chaînes de

glycosaminoglycans (Stoker *et al.*, 1990). Il existe deux types de matrice extracellulaire: la membrane basale séparant l'intima de la média et la matrice interstitielle enveloppant individuellement les VSMC dans la média. La membrane basale est surtout composée de laminine et de collagène de type IV (Carey, 1991). La laminine est la protéine majeure liant le collagène de type IV et les héparanes sulfates protéoglycans dans le but de construire un réseau de fibres denses (Martin *et al.*, 1987). Il a été démontré que la laminine peut stimuler le mouvement des cellules épithéliales (McCarthy *et al.*, 1983). Le collagène de type IV est le composant structural majeur permettant la formation du réseau de fibres. Hedin *et al.* (1988) ont observé que le collagène de type IV et la laminine supportaient le maintien du phénotype contractile des VSMC.

Quant à la matrice interstitielle, elle contient la thrombospondine, les collagènes de type I et III, les protéoglycans, l'élastine et surtout la fibronectine (Carey, 1991). Il a été rapporté (Hedin *et al.*, 1989) que la fibronectine activait la conversion du phénotype contractile en phénotype synthétique. Ceci lui octroie le rôle majeur dans la détermination du phénotype cellulaire et la migration.

### 1.3.2 Fibronectine

La fibronectine joue un rôle central dans l'adhésion, le réarrangement du cytosquelette, la formation de l'ECM, la migration, la polarité, la prolifération et l'apoptose (Hynes, 1990). C'est une glycoprotéine adhésive de l'ECM présente sous deux formes: soluble dans le plasma et en agrégats à la surface cellulaire. Elle a une forte affinité pour la surface de plusieurs cellules eucaryotes, c'est pourquoi les cellules en suspension s'attachent de préférence à des surfaces enrobées de fibronectine (Ruoslahti *et al.*, 1982).

L'habilité des cellules à lier la fibronectine est attribuée à une séquence présente dans le domaine de la protéine permettant l'attachement cellulaire: le tripeptide L-arginyl-glycyl-L-aspartate (séquence RGD) (Pierschbacher *et al.*, 1984). Les récepteurs reconnaissant cette séquence sont les intégrines de type RGD ( $\alpha_5\beta_1$  par exemple). Cependant, des résidus additionnels dans la région du

segment connectant de type III (IIIICS) (figure 3) contenant les peptides LDV (leucine-aspartate-valine), REDV (arginine-glutamate-aspartate-valine) et IDAPS (isoleucine-aspartate-alanine-proline-sérine) contribuent également à l'adhésion cellulaire par d'autres intégrines :  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_4\beta_7$  (Mould *et al.*, 1990; Mould *et al.*, 1991). Le domaine HepII, quant à lui, permet de stabiliser l'interaction de  $\alpha_5\beta_1$  avec la séquence RGD, peut réguler l'organisation du cytosquelette et est impliqué dans les signaux de la survie cellulaire. Ces signaux sont également médiés en grande partie par les intégrines (Saoncella *et al.*, 1999; Jeong *et al.*, 2001).

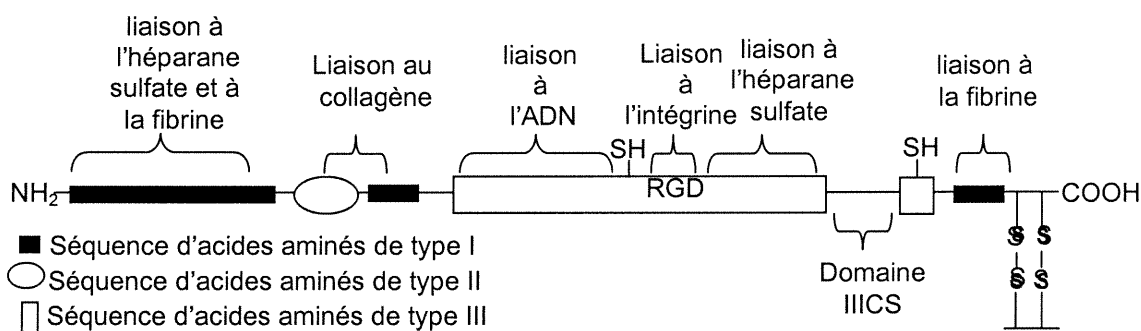


Figure 3. **Domaines de liaison de la fibronectine pour différentes molécules.** Le domaine de liaison à l'intégrine de type RGD correspond au motif RGD et le domaine IIIICS (segment connectant de type III) participe à l'adhésion des intégrines de type RGD à la fibronectine. Modifié de Lodish *et al.* (1997)

Les conséquences (migration, prolifération, etc) d'une modification de la matrice extracellulaire sur les cellules impliquent des contacts avec celle-ci par des récepteurs de surfaces cellulaires. Cette famille de récepteurs est les intégrines reconnaissant des motifs distincts présents dans l'ECM.

## 1.4 Intégrines

### 1.4.1 Structure des intégrines

Les intégrines font partie d'une large famille de récepteurs de surface cellulaire présente dans plusieurs espèces animales allant des éponges aux mammifères (Giancotti *et al.*, 1999). Plusieurs intégrines permettent les interactions cellule-protéine de l'ECM alors que d'autres lient les protéines membranaires entraînant l'adhésion cellule-cellule (Springer, 1990). Cependant, elles ont des caractéristiques communes quant à leur structure moléculaire et leurs fonctions. Ce sont des glycoprotéines dimériques composées de deux sous-unités,  $\beta$  (90 à 115 kDa) et  $\alpha$  (de 120 à 180 kDa) liées par des ponts non covalents. Il a été identifié jusqu'à 17 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  chez les mammifères pouvant se combiner en 23 dimères différents. Chaque intégrine lie un seul ou plusieurs ligands spécifiques résumés dans le tableau I. Le trait commun des ligands d'intégrines est qu'ils utilisent une courte séquence peptidique centrée sur un acide aspartique ou un résidu glutamate comme une part essentielle du site de reconnaissance du récepteur. Les motifs reconnus par les intégrines sont surtout RGD et LDV (Humphries, 1990).

Chaque sous-unité consiste en trois domaines; l'exodomaine (extracellulaire) et les deux cytodomaines (transmembranaire et intracellulaire). L'exodomaine contient plus de 90 % de la molécule soit environ 700 à 900 résidus d'acides aminés. Le domaine transmembranaire (domaine conservé) est composé de 20 à 30 résidus d'acides aminés alors que le domaine intracellulaire consiste à environ 20 à 30 résidus pour la sous-unité  $\alpha$  et 40 à 50 résidus pour la sous-unité  $\beta$  (Hynes, 1992). L'analyse des gènes  $\alpha$  et  $\beta$  a déterminé que les deux sous-unités n'avaient pas de région conservée commune. De plus, des formes d'épissage alternatifs des sous-unités  $\alpha$  ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ) et  $\beta$  ( $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ ) existent. L'expression de ces variants est spécifique aux tissus et au type cellulaire (Zheng *et al.*, 1997). Il y a trois régions hautement conservées dans la famille de

Tableau I. Familles d'intégrines

Sous-unités		Ligands	Site de liaison
$\beta_1$	$\alpha_1$	Collagènes, laminine	DGEA
	$\alpha_2$	Collagènes, laminine	
	$\alpha_3$	Fibronectine, laminine	
		Collagènes	EILDV
	$\alpha_4$	Fibronectine (V25), VCAM-1	
	$\alpha_5$	Fibronectine	RGD
	$\alpha_6$	Laminine	
	$\alpha_7$	Laminine	
	$\alpha_8$	Fibronectine, téna-scine	
		Néphronectine	RGD
$\alpha_v$	Vitronectine, fibronectine	RGD	
$\beta_2$	$\alpha_L$	ICAM-1, ICAM-2	
	$\alpha_M$	C3b (inactivé), fibrinogène	
		Facteur X, ICAM-1	
	$\alpha_X$	Fibrinogène, C3b (inactivé)	GPRP
$\beta_3$	$\alpha_{IIb}$	Fibrinogène, fibronectine, vitronectine, thrombospondine	RGD, KQAGDV
		facteur Von Willbrand	
	$\alpha_v$	Vitronectine, fibrinogène, fibronectine	RGD
		Facteur Von Willebrand, collagènes	
$\beta_4$	$\alpha_6$	Laminine	
$\beta_5$	$\alpha_v$	Vitronectine	RGD
$\beta_6$	$\alpha_v$	Fibronectine	RGD
$\beta_7$	$\alpha_4$	Fibronectine (V25), VCAM-1	EILDV
	$\alpha_{IEL}$	?	
$\beta_8$	$\alpha_v$	?	

Abréviations: DGEA, Asp-Arg-Glu-Ala; RGD, Arg-Gly-Asp; EILDV, Glu-Iso-Leu-Asp-Val; GPRP, Gly-Pro-Arg-Pro; KQAGDV, --Ala-Gly-Asp-Val. Adapté de Hynes (1992).

la sous-unité  $\beta$ : la région de liaison du ligand dans la tête, une région riche en asparagine dans la tige et le domaine transmembranaire (Burke, 1999).

La représentation des intégrines à partir d'images de microscopie électronique (figure 4) montrent que les intégrines possèdent une tête en globule du côté N-terminal (extracellulaire) composée de parties provenant des deux sous-unités (Nermut *et al.*, 1988). Tous les exodomains des sous-unités  $\beta$  ont 4 répétitions repliées en boucles d'un segment riche en cystéine. Le N-terminal est fortement replié sur lui-même grâce à des ponts disulfures permettant la formation du globule (Calvete *et al.*, 1991). Le N-terminal de toutes les sous-unités  $\alpha$  contient un segment homologue de 7 répétitions dont les 4 dernières contiennent des séquences (Asp-x-Asp-x-Asp-gly-x-x-Asp) contribuant aux propriétés de liaison des cations divalents (Hynes, 1992). Les cations divalents sont essentiels pour la fonction du récepteur. La nature de ces cations peut affecter l'affinité et la spécificité du ligand en plus d'être nécessaire à l'association des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  entre elles.

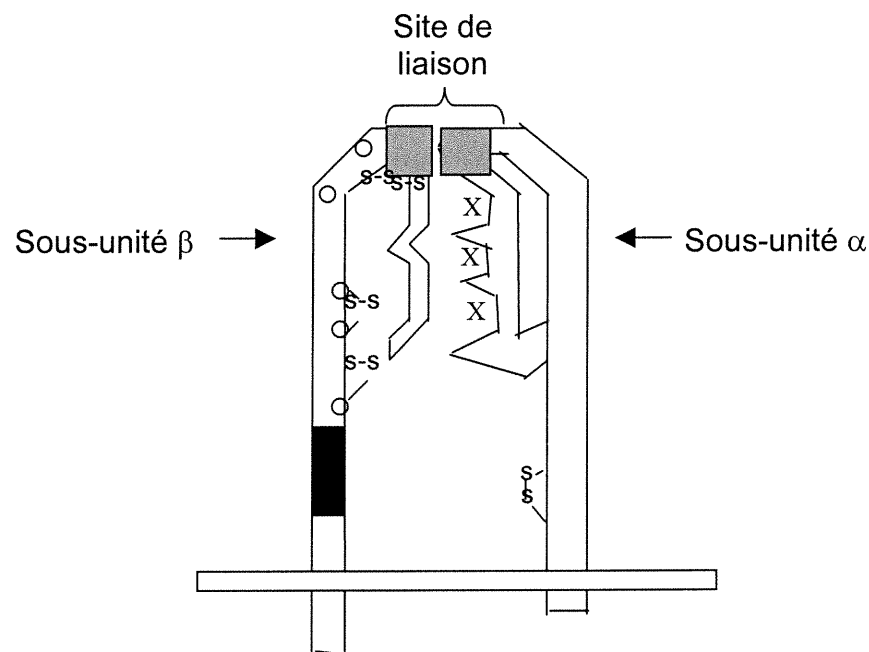


Figure 4. **Structure des intégrines.** La partie noire est les répétitions riches en cystéine de la sous-unité  $\beta$ . Les sites (X) pour la liaison des cations divalents sont situés sur la sous-unité  $\alpha$ . L'arrangement des polypeptides et des ponts disulfures déterminent la tête de l'intégrine. Les parties grises représentent le site de liaison du ligand. Tiré de Hynes (1992).

Les cations divalents peuvent agir comme effecteurs, permettant la liaison du ligand; comme antagoniste, inhibant la liaison du ligand; et comme sélecteur, changeant la spécificité du ligand. Une des raisons possibles expliquant l'influence des cations sur la fonction des intégrines est que le ligand et les cations divalents partagent une poche de liaison commune (D'Souza *et al.*, 1994). La présence de cations divalents maintient l'intégrité et la forme de la poche de liaison pour le ligand. Par conséquent, la liaison des intégrines à leur ligand (ECM) est un processus dépendant des cations (Mizejewski, 1999). Il existerait deux sites de liaison des cations: le site compétent pour le ligand (LC) qui permet au ligand de lier, et le site inhibiteur (I) spécifique au  $\text{Ca}^{2+}$  qui augmente le niveau de dissociation du ligand. Le site I est allostérique à la poche de liaison du ligand, par conséquent, il peut lier le  $\text{Ca}^{2+}$  même lorsque le ligand est déjà attaché à l'intégrine. Ceci fournit un mécanisme potentiel de libération du contact de la cellule avec la matrice extracellulaire. C'est avant tout la coordination entre les sites LC et I qui régulent la liaison du ligand à l'intégrine (Plow *et al.*, 2000). Il a été localisé deux types de site LC; les sites EF-hand situés dans la sous-unité  $\alpha$  et le site MIDAS (**Metal Ion-Dependent Adhesion Site**) dans la sous-unité  $\beta$  (Lin *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1999). Dans les deux cas, les ions  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  peuvent s'y lier en contribuant positivement à l'interaction ligand-intégrine. Le site I par contre est spécifique au  $\text{Ca}^{2+}$  et inhibe la liaison du ligand à l'intégrine.

Les cations divalents  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  sont des régulateurs physiologiques potentiels de l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines. Plus particulièrement le  $\text{Mn}^{2+}$  qui, en faible concentration, pourvoit intégralement au besoin de cations divalents lors de l'étalement cellulaire sur l'ECM (Staatz *et al.*, 1989). Plusieurs études ont d'ailleurs démontré que le  $\text{Mn}^{2+}$  augmente fortement la liaison de l'intégrine à l'ECM en comparaison aux autres cations régulièrement utilisés dans les études *in vitro* ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Thibault, 2000; Chen *et al.*, 2001; Elices *et al.*, 1991; Mould *et al.*, 1998). Il a également été observé une implication des cations divalents dans certains mécanismes de réparation de la paroi vasculaire. En effet, le niveau plasmatique de  $\text{Mg}^{2+}$ , durant le processus d'apparition des

lésions vasculaires, augmente et le ratio  $Mg^{2+}/Ca^{2+}$  passe de 0.4:1 à 1:1. Le  $Mg^{2+}$  permet généralement la fonction d'adhésion cellulaire alors que le  $Ca^{2+}$  l'inhibe. Une cellule ne pouvant migrer sur une matrice extracellulaire que lorsqu'elle y adhère, cette augmentation de ratio peut avoir un effet pro-migratoire des VSMC. Ainsi, l'effet pro-migratoire observé facilite la réparation de la paroi vasculaire (Grzesiak *et al.*, 1995).

En tant que liaison au ligand, il est clair que la partie N-terminale du domaine extracellulaire de chaque sous-unité contribue à la formation du site de liaison. La sous-unité  $\alpha$  est d'ailleurs associée à la spécificité du ligand. Cependant, la séquence complète du site de liaison des intégrines n'a pas été encore établie, par contre le résidu D119 et les séquences S211-G222 de la sous-unité  $\beta_3$  et les séquences G184-G193 de la sous-unité  $\alpha_{11b}$  semblent être importantes pour la liaison du ligand à l'intégrine  $\alpha_{11b}\beta_3$  (Charo *et al.*, 1994; Kamata *et al.*, 1996). Du côté intracellulaire, le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  interagit directement avec les protéines du cytosquelette et quelques protéines intermédiaires impliquées dans les voies de signalisation démontrant ainsi que la sous-unité  $\beta$  procure une spécificité de signal intracellulaire (Horwitz *et al.*, 1986; Duband *et al.*, 1986). De telles interactions avec la sous-unité  $\alpha$  n'ont pas été mises en évidence.

## 1.4.2 Fonctions

### 1.4.2.1 Modulation de l'affinité pour le ligand ("inside-out")

Le premier rôle attribué aux intégrines a été l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire. L'adhésion des intégrines à leur ligand peut être régulée en changeant l'affinité ou en modifiant l'avidité du récepteur (agrégation des intégrines) pour permettre à la cellule de migrer. La modulation de l'affinité des intégrines est le mécanisme "inside-out" par lequel l'information est transmise de l'intérieur de la cellule vers le domaine extracellulaire de l'intégrine altérant la



capacité de la liaison du ligand (O'Toole *et al.*, 1994; Crowe *et al.*, 1994). Ce mécanisme est utilisé par la cellule, entre autres, pour la migration. Le domaine cytoplasmique joue un rôle clé dans ce mécanisme, notamment les motifs hautement conservés GFFKR de la sous-unité  $\alpha$  et KLLxxxxD de la sous-unité  $\beta$  (O'Toole *et al.*, 1991; Crowe *et al.*, 1994). La délétion d'un des deux motifs entraîne une conformation de haute affinité pour le ligand (Hughes *et al.*, 1995). L'effet de tels mutants suggèrent que ces deux motifs pourraient interagir via des ponts salins entre l'arginine (R) et l'aspartate (D) pour donner une contrainte structurale à l'intégrine. Ceci garderait l'intégrine dans une conformation de faible affinité (O'Toole *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1995).

L'activation de l'intégrine (haute affinité pour le ligand) par le mécanisme "inside-out" pourrait être expliquée à partir du modèle proposé par Kim *et al.* (1992) (figure 5). L'exemple permettant de cerner la problématique serait l'activation de l'intégrine  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . L' $\alpha_{IIb}\beta_3$  est l'intégrine la plus abondante sur les plaquettes sanguines et permet l'agrégation plaquettaire. Sous sa forme inactive, la plaquette circule librement, ne peut se lier au fibrinogène (protéine de l'ECM) et l'intégrine est sous une forme de faible affinité. Lors de lésions vasculaires, des agonistes spécifiques aux plaquettes (la thrombine, les nucléotides adénine ou le collagène) sont libres d'activer ces dernières par des récepteurs cellulaires. Ces derniers vont activer les cascades classiques de transduction de signaux incluant les sérine-thréonine kinases, le métabolisme des phospholipides, les petites protéines liant le GTP (small GTP-binding proteins) et les protéines G (Marguerite *et al.*, 1979; Shattil *et al.*, 1992). Par la suite, un complexe activateur de l'intégrine (CAI) composé de petites protéines G ou R-Ras va se lier au domaine cytoplasmique des deux sous-unités et générer de l'énergie permettant de changer la conformation de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$  pour la rendre active. Ainsi, les plaquettes activées peuvent lier le fibrinogène et s'agréger. Au contraire, un complexe de molécule de signalisation H-Ras va inactiver l'intégrine et inhiber l'agrégation plaquettaire (Aplin *et al.*, 1998).

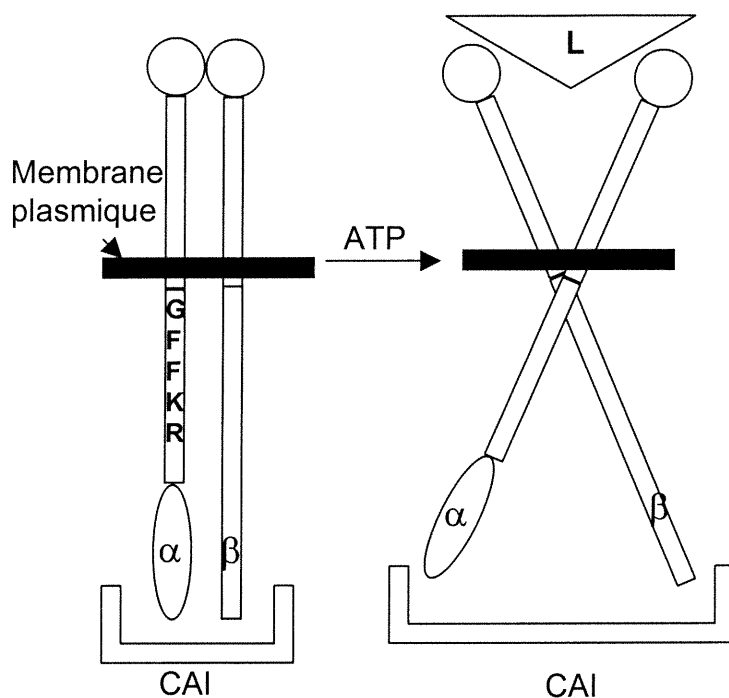


Figure 5. **Modèle de la modulation de l'affinité des intégrines pour leur ligand.** Le complexe activateur de l'intégrine (CAI) interagit avec le domaine cytoplasmique et induit des changements dans la conformation de l'intégrine. La séquence GFFKR est importante pour conserver une faible affinité pour le ligand (L). Ce mécanisme est ATP-dépendant. Tiré de Schwartz *et al.* (1995)

Il est clair que la présence de cations divalents ( $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ ) est requise pour l'exposition des sites de liaison. Ces cations ne changent pas directement la conformation de l'intégrine mais sont nécessaires pour une haute affinité entre le ligand et l'intégrine. Ils permettent également la liaison du domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta$  aux protéines de cytosquelette (Humphries, 1996).

#### 1.4.2.2 Signalisation intracellulaire: mécanisme "outside-in"

##### 1.4.2.2.1 Activation des protéines tyrosine kinases

La participation des intégrines dans la phosphorylation de protéines intracellulaires a été démontrée dans plusieurs études. L'analyse de l'activation des plaquettes par les agonistes a révélé la phosphorylation et l'activation de la tyrosine kinase pp72syk simultanément à l'activation de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$  (Bellis *et al.*, 1997). Les intégrines catalysent également la phosphorylation de

sérine/thréonine comme les MAPK (Mitogen-activated protein kinase) et utilisent le mécanisme d'autophosphorylation pour activer la kinase ribosomale p70 et la kinase des foyers d'adhésion (pp125<sup>FAK</sup>) (Thomas, 1992; Blenis, 1993). La voie de FAK est activée par la plupart des intégrines alors que l'activation des tyrosines kinases telles que Fyn par l'adaptateur Shc est restreinte à certaines sous-familles d'intégrines (Giancotti *et al.*, 1999).

Pp125<sup>FAK</sup> a une structure distincte puisqu'elle ne possède aucun domaine homologue à ceux des autres tyrosines kinases. Elle n'a aucun déterminant permettant l'ancrage membranaire mais contient des séquences capables de lier les domaines SH3 et SH2 des protéines. Par conséquent, la pp125<sup>FAK</sup> est un substrat pour les autres kinases (Berman *et al.*, 2000). Elle est retrouvée aux foyers d'adhésion à proximité de plusieurs protéines du cytosquelette (taline et paxilline) et des molécules de signalisation telles que la p130<sup>cas</sup> (figure 6). Elle n'a pas de contact direct avec la queue cytoplasmique  $\beta$  de l'intégrine mais y est liée par l'intermédiaire de ILK (integrin-linked kinase) (Tu *et al.*, 2001). Son activation commence par le rapprochement de deux intégrines afin de permettre l'autophosphorylation de la pp125<sup>FAK</sup> sur la tyrosine 397 créant un site de liaison pour le domaine SH2 de Src ou Fyn (Figure 7) (Schlaepfer *et al.*, 1994). La kinase Src phosphoryle ensuite la paxilline, la tensine et p130<sup>cas</sup>, cette dernière étant impliquée dans la progression du cycle cellulaire régulé par JNK (Kinase c-jun N-terminale) (Schlaepfer *et al.*, 1997). Pp125<sup>FAK</sup> se combine également à la phosphoinositide 3-OH kinase (PI-3K) et l'active (Chen *et al.*, 1996). Finalement, Src phosphoryle la tyrosine 925 de pp125<sup>FAK</sup> afin de créer un site de liaison pour le complexe Grb2/mSOS (RasGDP/GTExchange factor Sos) (Schlaepfer *et al.*, 1994) qui activera ERK (extracellular signal-regulated kinase) par l'intermédiaire de Ras.

Il est également possible d'activer la voie Ras par l'intermédiaire de la cavéoline-1 (Cav) (Figure 8) qui sert d'adaptateur membranaire. Lorsque l'intégrine lie l'ECM, Fyn est activée et son domaine SH3 interagit avec la molécule Shc. Shc est alors phosphorylée par Fyn sur la tyrosine 317 et se

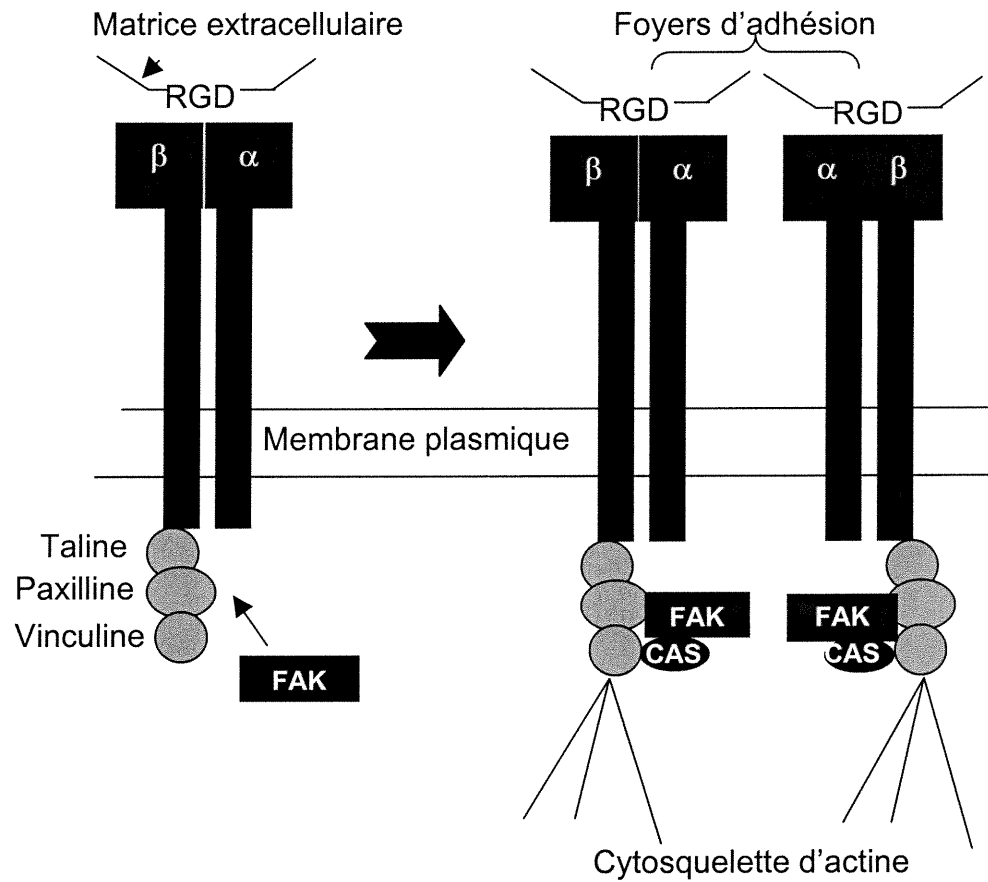


Figure 6. **Formation des foyers d'adhésion.** La liaison à la matrice extracellulaire permet le regroupement des intégrines et leurs associations aux protéines du cytosquelette. FAK s'autophosphoryle lors du rapprochement d'au moins 2 intégrines. Tiré de Giancotti *et al.* (1999).

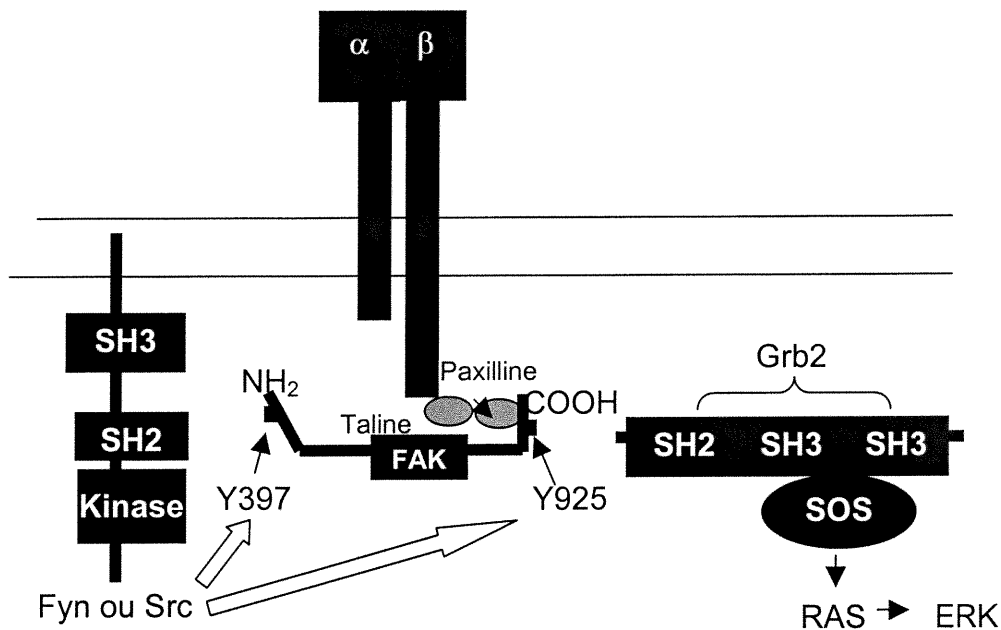


Figure 7. **Modèle de la voie de signalisation de pp125<sup>FAK</sup>**. Par le regroupement des intégrines, pp125<sup>FAK</sup> s'autophosphoryle sur la tyrosine 925 et active plusieurs molécules de signalisation dont Src, Fyn, Crk et Ras. Cela entraîne la prolifération et la progression du cycle cellulaire. Y : tyrosine. Tiré de Giancotti *et al.* (1999)

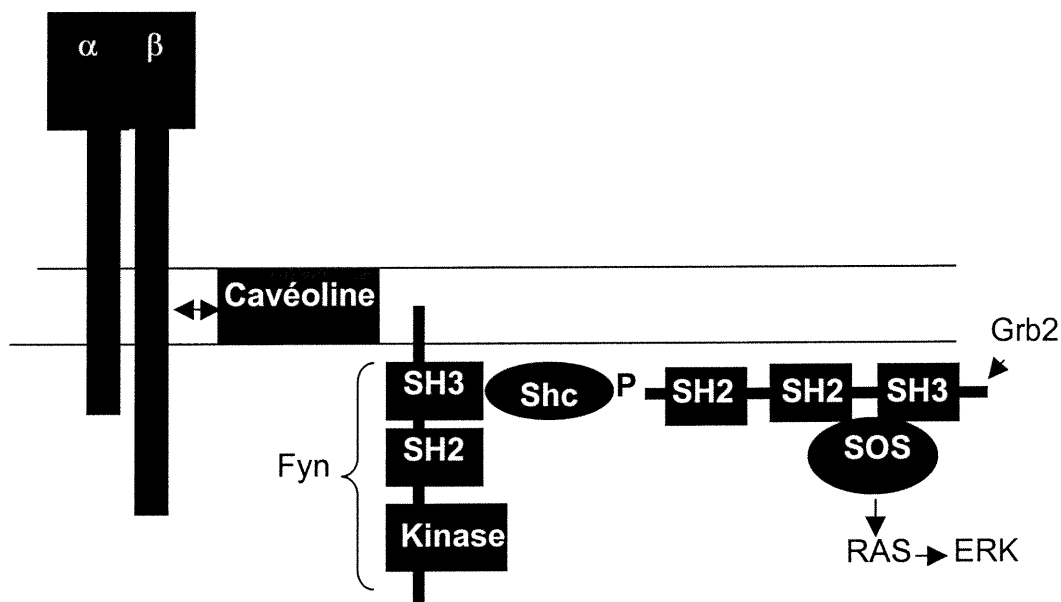


Figure 8. **Modèle de la voie de signalisation de Shc**. Lorsque les intégrines lient leur ligand, la cavéoline transmet le signal à la tyrosine kinase Fyn qui s'active et par l'intermédiaire de Shc activée se combine à mSOS pour entraîner la cascade des MAPK. Tiré de Giancotti *et al.* (1999)

combine au complexe Grb2/mSOS pour activer la voie des MAPkinases (Wary *et al.*, 1998).

#### 1.4.2.2 Modification des fonctions cellulaires

Les intégrines régulent plusieurs fonctions cellulaires dont la plus étudiée est sans contredit la progression du cycle cellulaire. L'apoptose (mort cellulaire programmée) est un événement intracellulaire contrôlé par des facteurs externes tels que les hormones, les cytokines, les facteurs de croissance et les signaux générés par les contacts de la cellule avec l'ECM (appelé anoikis) (Lunardi-Iskandar *et al.*, 1995; Ruoslahti *et al.*, 1994). L'utilisation d'anticorps neutralisant anti- $\beta_1$  entraîne le détachement des cellules de la membrane basale et stimule leur suicide (Pullan *et al.*, 1996). De plus, les cellules endothéliales et épithéliales, sans leur substrat naturel et en présence de peptide RGD ou de substrat synthétique non adhésif, vont en apoptose (Meredith *et al.*, 1993; Frisch *et al.*, 1994). Par conséquent, l'adhésion n'est pas suffisante dans l'activation de l'anoikis puisque le type de substrat est également un facteur important.

Il semble que la fonction des intégrines dans l'anoikis soit causée par l'activation de signaux de transduction qui influenceraient l'activité de gènes spécifiques et leurs produits. Par exemple, l'effet protecteur de l' $\alpha_5\beta_1$  (récepteur de la fibronectine) est associé à l'activation du gène *bcl-2*. En effet, la perte d'ancrage cellulaire à l'ECM active une caspase qui clive et active à son tour MEKK-1 (une kinase en amont de la voie de signalisation JNK). Le produit du clivage de MEKK-1 entraîne l'apoptose. Par conséquent, l'ancrage par l'intégrine prévient le clivage de MEKK-1 en maintenant l'expression de Bcl-2 (une protéine anti-apoptotique qui bloque l'activation de la caspase) (Cardone *et al.*, 1997). Concernant l' $\alpha_v\beta_3$  son effet protecteur est associé à la suppression de l'activité du gène *p53* (O'Brien *et al.*, 1996; Stromblad *et al.*, 1996).

La protection contre l'anoikis utilise également la voie de phosphoinositide 3-kinase (PI-3K) dont les produits lipidiques fournissent un signal protecteur agissant par l'intermédiaire de PKB/Akt en bloquant l'activation des mécanismes

d'apoptose. L'activation est médiée via les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_1\beta_1$  (Khwaja *et al.*, 1997; Wary *et al.*, 1996). Les intégrines ont également été directement impliquées dans plusieurs autres fonctions cellulaires telles que la différenciation de plusieurs types cellulaires et l'expression de gènes incluant *c-fos*, PDGF-B, I- $\kappa$ B (Brandley *et al.*, 1989; Streuli *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1994).

#### 1.4.2.2.3 Concentrations intracellulaires d'ions

Le mouvement d'ions tels que le  $\text{Ca}^{2+}$  et le  $\text{H}^+$  sont d'importants composants dans les voies de signalisation cellulaire. Le  $\text{Ca}^{2+}$  fonctionne comme second messenger régulant une variété de protéines kinases, phosphatases et d'autres enzymes alors que le  $\text{H}^+$  joue un rôle mal cerné dans la progression du cycle cellulaire (Berridge, 1993; Perkins *et al.*, 1994). Le transport de ces ions pourraient être régulé par l'adhésion cellulaire via les intégrines (Bhattacharya *et al.*, 2000). Les peptides RGD produisent la constriction d'artérioles associée à l'augmentation de calcium intracellulaire dans les VSMC (Yi *et al.*, 1997). Les ligands de l' $\alpha_5\beta_1$  initient l'augmentation de calcium intracellulaire dans les VSMC artériolaires (Davis *et al.*, 2001). Un concept nouvellement établi a permis de d'identifier un des événements impliqués dans l'influx calcique médié par les intégrines. Il a été démontré que la calréticuline, une protéine intracellulaire liant la sous-unité  $\alpha$  de l'intégrine, est essentielle à la modulation de l'influx du calcium par un mécanisme intégrine-dépendant. L'intégrine qui n'est pas liée à son ligand ne peut pas lier la calréticuline pour une raison de conformation inadéquate de l'intégrine. A l'inverse, l'intégrine liée à son ligand peut lier la calréticuline. Ainsi, étant mobilisée à proximité de la membrane plasmique, la calréticuline est utilisée comme système de réserve et de transport de calcium (Coppolino *et al.*, 1997). Les intégrines peuvent aussi être impliquées en synergie avec le PDGF dans l'activation du transporteur Na-H et dans l'élévation intracellulaire du pH (Schwartz *et al.*, 1989). Ces effets proviennent du regroupement des intégrines en foyers d'adhésion et sont communs aux membres des sous-familles de  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  et  $\beta_3$ .

#### 1.4.2.2.4 Métabolisme des lipides et activation de Rho

L'adhésion cellulaire via les intégrines produit une augmentation rapide du niveau de phosphatidylinositol phosphate (PIP<sub>2</sub>), effet médié par Rho. L'augmentation de la synthèse de PIP<sub>2</sub> par Rho provient de l'activation de phosphatidylinositol 5-kinase (PI 5-kinase). Lors de l'activation de Rho par les intégrines, la PI5-kinase forme un complexe avec Rho activé selon une conformation indépendante de GTP menant à l'activation de la kinase. Par la suite, la kinase phosphoryle le phosphatidylinositol 4-phosphate, ce qui génère le PIP<sub>2</sub> (Chong *et al.*, 1994). Ce résultat est particulièrement intéressant puisque PIP<sub>2</sub> peut interagir avec Rho et, en synergie, réguler la polymérisation de l'actine et la formation de foyers d'adhésion (Stossel, 1993). Les intégrines peuvent également activer directement PLC qui entraîne l'hydrolyse de PIP<sub>2</sub> (Breuer *et al.*, 1989). L'hydrolyse de PIP<sub>2</sub> mène à la production de diacylglycérol et de IP<sub>3</sub>, ce dernier induisant la relâche de calcium des compartiments intracellulaires (Rana *et al.*, 1990). De plus, la PI-3kinase, impliquée dans le métabolisme des lipides, est transloquée à la membrane plasmique et peut être phosphoryler par pp125<sup>FAK</sup> lorsque la cellule est stimulée par l'adhésion ou le PDGF (Chen *et al.*, 1994). La phosphorylation de PI-3kinase mène à la production de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate en utilisant le PIP<sub>2</sub> comme substrat. Étant donné que les éléments du métabolisme des lipides (PIP<sub>2</sub> et PI-3K) interagissent avec pp125<sup>FAK</sup> et Rho, les changements du phosphatidylinositol peuvent coordonner les réponses cellulaires générées par les intégrines (Longhurst *et al.*, 1998).

### 1.4.3 Étude pharmacologique

Les intégrines sont impliquées dans plusieurs processus fondamentaux causant les maladies humaines communes. Au niveau des vaisseaux, l' $\alpha_{11b}\beta_3$  est



responsable de l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus (Matsuno *et al.*, 1994). Dans les lésions vasculaires, l' $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  permettent l'adhésion et la migration des cellules endothéliales et musculaires lisses entraînant la resténose ou l'athérosclérose (Liaw *et al.*, 1995). Il a d'ailleurs été démontré que l'utilisation d'antagonistes de l' $\alpha_v\beta_3$  ou de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$  inhibe l'hyperplasie de l'intima après une blessure vasculaire (Slepian *et al.*, 1998). La plupart des intégrines ont également été impliquées dans la croissance et la progression de tumeurs primaires. Par exemple, un haut niveau d' $\alpha_5\beta_1$  est corrélé avec un bas niveau de transformation de certaines tumeurs. A l'inverse, l' $\alpha_v\beta_3$  semble être positivement corrélé avec l'augmentation de mélanomes malins (Chan *et al.*, 1991). La perte ou le gain de l'expression de certaines intégrines est directement impliqué dans la progression tumorale et la formation de métastases. Il est clair que les cellules tumorales doivent migrer efficacement sur l'ECM pour entrer dans la circulation et s'implanter dans un nouveau site. Ce sont les intégrines retrouvées en foyers qui influencent l'affinité de la liaison à l'ECM et, par conséquent, la migration cellulaire (Ingebar, 1992). Il est important de prévenir ou d'inhiber les processus amenants à ces pathologies par des manipulations thérapeutiques. La plus fréquente des thérapies est l'utilisation d'anticorps anti-intégrine qui dans le cas de l' $\alpha_{IIb}\beta_3$  empêchent l'agrégation plaquettaire ou dans le cas de l' $\alpha_v\beta_3$  inhibent la migration cellulaire (Hillis *et al.*, 1996). Les peptides synthétiques semblent aussi être efficaces contre la formation de métastases. L'utilisation de désintégrines est également fréquente puisque leurs motifs miment ceux de certaines protéines de l'ECM (Gould *et al.*, 1990). Les désintégrines occupent les sites spécifiques à l'attachement des ligands sur les intégrines. Par conséquent, le traitement de tumeur par les désintégrines implique l'inhibition de l'attachement de la cellule tumorale aux plaquettes sanguines. Ainsi la tumeur ne peut plus s'étendre par la migration de métastases dans la circulation sanguine (Rudolph *et al.*, 1990).

Les désintégrines sont des toxines hémorragiques présentes dans le venin de serpents. Elles ont un faible poids moléculaire (49-84 acides aminés) et contiennent une boucle RGD/KGD maintenue dans une conformation correcte

par des ponts disulfures. La famille contient l'échistatine et la flavoridine qui lient l' $\alpha_{11b}\beta_3$ , l' $\alpha_v\beta_3$  et l' $\alpha_5\beta_1$  avec une affinité similaire, l'éristostatine, la bistatine et la barbourine qui ne lient que l' $\alpha_{11b}\beta_3$  et la krystine qui interagit avec l' $\alpha_v\beta_3$  et l' $\alpha_{11b}\beta_3$  (Pfaff *et al.*, 1994). Les désintégrines ont été utilisées pour bloquer l'adhésion cellulaire mais également comme sonde afin d'évaluer la densité d'intégrine exprimée par certains types cellulaires (Yang *et al.*, 1996; Musial *et al.*, 1990; Marcinkiewicz *et al.*, 1996). Des résultats récents définissent l'échistatine comme sonde radioactive permettant d'identifier, de caractériser et de mesurer l'expression des intégrines de type RGD sur des cellules en culture (Thibault, 2000). Cette désintégrine est un outil pharmacologique puisqu'elle possède toutes les caractéristiques d'un ligand pour son récepteur.

## 1.5 But du projet

En plus d'être des récepteurs d'adhésion dont l'affinité est modulable par les facteurs de croissance, les intégrines sont également impliquées dans la régulation de plusieurs voies de signalisation. Elles affectent notamment la prolifération des cellules des muscles lisses vasculaires lorsqu'il y a une modification au niveau de la matrice extracellulaire. Comme il a été discuté, la fibronectine est associée à l'apparition du phénotype synthétique des VSMC en culture. Cette protéine contient le motif RGD spécifique aux intégrines de type RGD et peut affecter la réponse cellulaire par l'intermédiaire de ces intégrines. Par conséquent, les intégrines peuvent être impliquées dans la stimulation des VSMC.

Les intégrines de type RGD exprimées par les VSMC en culture seront à l'étude. L'hypothèse sous-jacente de cette recherche est que les intégrines de type RGD sont des participants actifs dans la croissance des VSMC. En d'autres mots, l'expression des intégrines de type RGD est modifiée par les facteurs de croissance dans le but d'amplifier leur signal initial de prolifération cellulaire. Afin de déterminer la régulation de l'expression des intégrines de type RGD des

VSMC, les intégrines exprimées par les VSMC de rats Sprague Dawley en culture seront identifiées à l'aide de l'échistatine. Cet outil d'analyse servira à évaluer la densité de récepteurs exprimés en fonction d'agonistes de la croissance cellulaire. Les agonistes utilisés seront l'angiotensine II, le PDGF-BB et la thrombine qui sont souvent retrouvés dans les lésions vasculaires et qui affectent la croissance des VSMC. Par la suite, la localisation cellulaire des intégrines aux foyers d'adhésion donnera un indice de leur implication dans la prolifération des VSMC par l'activation possible de voies de signalisation.

Peu d'études se sont attardées à la régulation des intégrines de type RGD sous leur forme hétérodimérique. Nous tenterons par ce travail d'éclaircir le processus de prolifération des VSMC au niveau de la régulation de l'expression des intégrines de type RGD.

## CHAPITRE 2. MATERIEL ET METHODES

### **2.1 Culture cellulaire**

#### **2.1.1 Cellules des muscles lisses de l'aorte thoracique**

La culture cellulaire des VSMC aortiques est effectuée selon le protocole de Eguchi *et al.* (1994). L'aorte thoracique est prélevée de 7 rats mâles Sprague Dawley (Charles River Co., Wilmington, Massachusetts) pesant entre 250 à 300 g et sacrifiés par décapitation. Les organes sont recueillis dans le milieu F-12 (GibcoBRL Life Technologies, Burlington, Ontario) (2 mmol/L L-glutamine, 10 % FBS, 1% gentamicine, 100 unités/mL pénicilline et 100 µg/mL streptomycine). Les 7 aortes sont nettoyées de leur tissu adipeux et coupées longitudinalement. La partie interne du tissu est légèrement grattée dans le but d'éliminer les cellules endothéliales de l'intima. Par la suite, les aortes subissent une digestion dans une solution de milieu F-12 contenant 12 mg de collagénase type I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) durant 7 min à 37°C avec agitation. La média est séparée mécaniquement de l'adventice et coupée en fins morceaux digérés à deux reprises par 1 mg/mL collagénase type I dans 12 mL de F-12 durant 30 min à 37°C avec agitation. Après une centrifugation de 5 min à 2000 tours/min, le culot cellulaire est resuspendu dans 12 mL de F-12 additionnée de 0.5 mg/mL collagénase de type I et 0.5 mg/mL élastase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, 3.67 U/mg) puis incubé durant 11/2 h à 37°C avec agitation. Les agrégats cellulaires restants sont réduits en les faisant passer 2 à 3 fois dans une seringue avec des aiguilles variant de 16G à 21G. La suspension cellulaire est filtrée (100 µm Nylon, Falcon) puis centrifugée à 2000 tours/min pendant 5 min. Le culot de cellules est resuspendu dans le DMEM faible en glucose (GibcoBRL Life Technologies, Burlington, Ontario) (0.04 mol/L NaHCO<sub>3</sub>, 0.015 mol/L HEPES, pH 7.4) supplémenté de 10 % FBS, 2 mmol/L L-glutamine, 100 unités/mL pénicilline et

100 µg/mL streptomycine et 30 ng/mL de gentamicine. La culture cellulaire est incubée à 37°C et 10 % CO<sub>2</sub>.

### **2.1.2 Cellules des muscles lisses mésentériques**

La culture cellulaire des VSMC mésentériques est effectuée selon le protocole de Touyz *et al.* (1999). L'artère mésentérique est prélevée de 7 rats mâles Sprague Dawley (Charles River Co., Wilmington, Massachusetts) pesant entre 250 à 300 g et sacrifiés par décapitation. Les organes sont recueillis dans le milieu F-12 (GibcoBRL Life Technologies, Burlington, Ontario) (2 mmol/L L-glutamine, 10 % FBS, 1% gentamicine, 100 unités/mL penicilline et 100 mg/mL streptomycine). Les 7 artères sont digérées par 90 mg de collagénase de type I / 30 mL de F-12 durant 15 min à 37°C avec agitation. Le tissu adipeux des artères est enlevé mécaniquement et les artères subissent une dernière digestion dans 25 mL de milieu F-12 (2 mg/mL de BSA, 2 mg/mL collagénase de type I, 0.12 mg/mL élastase et 0.36 mg/mL soybean trypsin inhibitor) durant 1 h. Les agrégats cellulaires sont réduits en les faisant passer 2 à 3 fois dans une seringue avec des aiguilles variant de 16G à 21G. La suspension cellulaire est filtrée (100 µm Nylon, Falcon) puis centrifugée à 2000 tours/min pendant 5 min. Le culot cellulaire est resuspendu dans le DMEM faible en glucose (0.04 mol/L NaHCO<sub>3</sub> et 0.015 mol/L HEPES) supplémenté de 10 % FBS, 2 mmol/L L-glutamine, 100 unités/mL penicilline et 100 µg/mL streptomycine et 30 ng/mL de gentamicine. La culture cellulaire est incubée à 37 °C et 10 % CO<sub>2</sub>.

La caractérisation des cultures cellulaires avec des marqueurs cytologiques (voir section 2.11) indique que plus de 95 % de cellules sont des cellules des muscles lisses. Les milieux des 2 types cellulaires sont changés chaque 2 jours par du DMEM faible en glucose frais avec suppléments. Les passages cellulaires dans des pétri de 15 cm se font toutes les 3 semaines par 2 lavages au PBS suivi d'un traitement à la trypsine 0.05 % (Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON) durant 4 min.

Les VSMC du passage 2 sont passées dans des boîtes de 24 puits (0.25 mL/cm<sup>2</sup>) (Maxisorp Nunc, Napierville, IL) à une densité de  $6.5 \times 10^4$  des VSMC aortiques et  $4.0 \times 10^4$  des VSMC mésentériques jusqu'à une confluence de 80 % (environ 2 jours). Les cultures cellulaires sont mises à jeun pendant 48 h pour les VSMC aortiques et 24 h pour les VSMC mésentériques. Elles sont stimulées durant 48 h avec les facteurs de croissance suivants: la (Sar<sup>1</sup>) angiotensine II ( $10^{-7}$  mol/L) obtenue de Bachem California Inc. (Torrance, CA) et plus stable à la dégradation par les aminopeptidases, le PDGF-BB (10 ng/mL) provenant de Bachem California Inc. (Torrance, CA), la thrombine (2 U/mL) achetée de Calbiochem (San Diego, CA) et le FBS (10 %) obtenu de Wisent Inc. (St-Bruno, Québec). Chaque facteur de croissance a été dilué dans le DMEM faible en glucose (100 unités/mL pénicilline, 100 mg/mL streptomycine, 10 ng/mL gentamicine). Afin d'alléger le texte, la (Sar<sup>1</sup>) angiotensine qui a été utilisée tout au long de cette recherche sera dénommée angiotensine II (All).

Dans le cas du test de l'impact de l'acide rétinoïque (AR) sur les VSMC aortiques, les cellules sont prétraitées à l'AR-9-cis ( $2 \times 10^{-6}$  mol/L) (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO) dilué dans le DMSO 14 mmol/L durant 24 h. Elles sont ensuite stimulées avec l'All ( $10^{-7}$  mol/L) et la thrombine (2 U/mL) en présence ou non (contrôle) d'AR-9-cis  $2 \times 10^{-6}$  mol/L durant 48 h. Les cellules gardées dans le DMEM faible en glucose de base sont quiescentes et sont utilisées comme contrôle basal.

## **2.2 Protéines solubilisées**

Afin d'obtenir des protéines membranaires solubilisées décrit par Thibault (2000), l'addition de 0.1 ml/cm<sup>2</sup> du tampon de lyse (0.05 mol/L Hepes, pH 7.4, 0.15 mol/L NaCl, 1% Nonidet P-40, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 5 μmol/L pepstatin, 10 μmol/L leupeptin, 50 KIU/mL Aprotinin, 1 mmol/L PMSF) est nécessaire. Les échantillons sont gardés à 4°C durant 20 min puis le matériel cellulaire est recueilli et centrifugé (15 000 tours/min) durant 20 min à 4°C. Une

portion du surnageant (contenant les protéines solubilisées) est dosée en duplicata avec le réactif de Bradford (BioRad, Mississauga, ON, dilution 1/5) (Bradford, 1976) pour déterminer la concentration de protéines à partir d'une courbe standard. Le reste est conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à son utilisation lors des tests de radioliation.

### **2.3 Dosage protéique par Bradford**

La courbe standard est tracée en faisant varier la concentration de BSA de 0, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16 et 0.20  $\mu\text{g}$  de protéines par  $\mu\text{L}$  dans un volume total de 100  $\mu\text{L}$ . Les différentes concentrations de la courbe standard et 2 ou 4  $\mu\text{L}$  de protéines solubilisées (section 2.2) dans un volume total de 100  $\mu\text{L}$  sont dosés en présence de 2 mL du réactif de Bradford (BioRad protein assay) préparé selon les recommandations du manufacturier. La densité optique (DO) est mesurée à partir d'un blanc (eau) à une longueur d'onde de 595 nm puis la courbe standard de la concentration de protéines en fonction de la DO est tracée. Elle permet de calculer la concentration de protéines ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) dans les échantillons recueillis à partir des DO. Le tout est dosé en duplicata.

### **2.4 Test de radioliation**

Le protocole de radioliation décrit par Thibault (2000) consiste à marquer l'intégrine de type RGD avec l' $^{125}\text{I}$ -échistatine. Le principe est le suivant: l'échistatine contenant le motif RGD peut être reconnu par les intégrines de type RGD provenant des protéines cellulaires solubilisées. L'échistatine iodée sert de sonde radioactive.

Plusieurs quantités d' $^{125}\text{I}$ -échistatine (Bachem California Inc., Torrance, VA) soient 75 000, 100 000, 150 000, 200 000 et 250 000 cpm sont ajoutées à 25  $\mu\text{g}$  de protéines afin de déterminer les conditions idéales de liaison. Il s'avère qu'au-delà de 150 000 cpm la saturation des récepteurs est atteinte. Il a donc été

choisit une concentration de 150 000 cpm pour les tests subséquents. Il est important, pour une liaison maximale entre l'échistatine et l'intégrine, d'inclure un cation divalent. Dans nos tests, le manganèse ( $Mn^{2+}$ ) est ajouté au mélange réactionnel.

Le mélange réactionnel du test de radioliasion est le suivant: 5  $\mu$ L d' $^{125}I$ -échistatine (150 000 cpm), 25  $\mu$ g de protéines solubilisées et du tampon de liaison (0.05 mol/L Hepes, 5 mmol/L  $MnCl_2$ , pH 7.4) pour avoir un volume totale de 40  $\mu$ L. Dans le cas de stimulations dans les plaques de 24 puits, les protéines sont solubilisées avec 100  $\mu$ L de tampon de lyse (section 2.2) ajouté dans chaque puits suivi d'un volume de 150  $\mu$ L d' $^{125}I$ -échistatine (150 000 cpm) en présence de  $Mn^{2+}$ . La réaction se déroule directement dans les puits. La réaction dure environ 90 min à la température de la pièce puis 20% de tampon d'échantillon (6% SDS, 10% glycérol, Tris-HCl 0.0625 mmol/L pH 6.8, bleu de bromophénol) sont ajoutés pour arrêter la réaction. Les complexes formés (intégrines- $^{125}I$ -échistatine) sont séparés sur un gel SDS-PAGE 6% d'acrylamide, sans chauffage ni  $\beta$ -mercaptoéthanol selon le protocole de Laemmli (1970) dans un système mini-Protean II cell (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON). Les échantillons migrent simultanément avec l'échelle standard (Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON, Canada; n° de catalogue 10748-010) à 100 volts dans le gel de concentration (0.125 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 % SDS, 4% Acrylamide/bis, 0.05% ammonium persulfate, 0.1% TEMED) durant 15 min. Puis la migration se fait à 150 volts dans le gel de migration (0.375 mol/L Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS, 6% Acrylamide/bis, 0.05 % ammonium persulfate, 0.05 % TEMED) jusqu'à ce que le marqueur protéique rouge (60-65 kDa) soit sur le point d'être élué. Les protéines sont colorées avec 0.05% Bleu de Coomassie R250 durant 45 min puis le gel est décoloré 15 min dans la solution 1 (5 volumes de méthanol, 1 volume d'acide acétique et 5 volume d'eau distillée) et 45 min dans la solution 2 (1 volume de méthanol, 9 volumes d'acide acétique et 1 volume d'eau distillée). Après un séchage de 30 min, le gel est exposé sur un film X-OMAT AR5 (Kodak, Eastman Kodak Co., Rochester, NY) pendant 1 h à  $-80$  °C. L'autoradiographie obtenue par le développement du film permet



d'observer les bandes radioactives correspondant aux complexes formés: intégrines de type RGD-<sup>125</sup>I-échistatine.

## 2.5 Test ELISA (Enzyme Link ImmunoSorbent Assay)

Le test ELISA décrit par Rennard *et al* (1980) a la particularité de doser la concentration de fibronectine de façon indirecte. Le principe est le suivant: l'Ac anti-fibronectine est mis en présence de la fibronectine du milieu cellulaire. Les complexes (Ac-fibronectine) se forment et lorsqu'ils sont mis dans des puits enrobés de fibronectine, les Ac en complexe avec la fibronectine cellulaire ne peuvent pas s'y lier. Seul l'Ac libre lie la fibronectine enrobant le puits. Par conséquent, l'Ac lié à la fibronectine d'enrobage est dosé.

Un volume de 25 µL de milieux provenant des cultures cellulaires stimulées est incubé 16 h à 4°C avec l'anticorps anti-fibronectine (Calbiochem, San Diego, CA) dilué 1:1430 dans le tampon ELISA (0.02 mol/L NaPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.15 mol/L NaCl, 0.05 % Tween 20). Le volume totale de la réaction est de 700 µL. Les échantillons de la courbe standard sont des concentrations de fibronectine plasmatique de rats variant de 0.625 ng/µL à 2.85X10<sup>-4</sup> ng/µL dans le tampon ELISA. Ces derniers subissent le même traitement que les échantillons des cultures. Chaque échantillon (200 µL en triplicata) est incubé dans les 96 puits Immulon II (Dynatech) enrobés de 200 ng/puits de fibronectine de rats durant 30 min. La plaque est lavée avec le tampon ELISA. Chaque puits est incubé avec 200 µL du deuxième anticorps anti-lapin couplé à la peroxydase de Raifort (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON) dilué 1:5000 dans le tampon ELISA avec 3% BSA durant 2 h à 24 °C. Après les lavages, les puits sont incubés à l'obscurité dans 200µL de la solution substrat (2.2 mmol/L O-phénylènediamine, 0.098 mol/L citrate phosphate, pH 5.0, 3 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 10 min et la réaction est arrêtée par 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 mol/L. Les densités optiques sont

lues à 490 nm et à partir de la courbe standard, les concentrations de fibronectine des milieux cellulaires sont déterminées.

## 2.6 Buvarbage de type Western

Les anticorps dirigés contre les intégrines ont été fournis par le laboratoire du Dr. L.M. Schnapp (Département de médecine, Mount Sinai of School Medicine, NY; anti- $\alpha 8$ ), du Dr. L. Reichardt (Howard Hughes Medical Institute, University of California, San Francisco, CA; anti- $\alpha 8$ , n<sup>o</sup> 2415) et du Dr. R.O. Hynes (Howard Hughes Medical Institute, Cambridge, MA; anti- $\alpha 5$ , 160C; anti- $\beta 1$ , 130L) ou acheter chez Chemicon International, Inc. (Temecula, CA; anti- $\alpha v$ , AB1930; anti- $\alpha v$  P3G8; anti- $\alpha 5$ , AB1949) et chez Pharmingen Canada (Mississauga, ON, Canada; anti- $\beta 3$ , F11; anti- $\beta 1$ , Ha2/5). Les anticorps anti-lapin ou anti-souris IgG couplés à la peroxydase de Raifort proviennent de Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ON), l'anti-hamster IgG biotinylé a été acheté chez Pharmingen Canada (Mississauga, ON, Canada) et la streptavidine-péroxydase de Raifort et le Hybond ECL chez Amersham Pharmacia Biotech Canada (Oakville, ON).

Le test de radioliation (section 2.4) est effectué avec 40  $\mu$ g de protéines solubilisées (section 2.2) pour la détection des sous-unités  $\alpha 8$ ,  $\alpha v$ ,  $\alpha 5$  ou  $\beta 1$  et 60  $\mu$ g de protéines solubilisées pour détecter la sous-unité  $\beta 3$ . Les complexes radioactifs sont séparés, sans chauffage ni  $\beta$ -mercaptoéthanol, sur un SDS-PAGE de 6% d'acrylamide. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Hybond<sup>TM</sup> ECL<sup>TM</sup>, Amersham Pharmacia Biotech Canada, Oakville, ON) durant 1 h à 4 °C dans le tampon de transfert (20% méthanol, 0.05 mol/L Tris, 0.38 mol/L glycine, pH 8.3). Cette membrane est exposée sur un film à -80 °C durant 1 h et l'autoradiographie fournit un premier film (film 1). La membrane est ensuite mise dans le tampon de blocage (0.05 mol/L NaPO<sub>4</sub>, pH 7.4, 0.154 mol/L NaCl, 0.05% Tween 20, 5% sérum de veau) pendant 1 heure à 24 °C pour bloquer les sites non spécifiques. Après 4 lavages, la membrane est conservée dans le tampon de lavage (0.05 mol/L NaPO<sub>4</sub>, pH

7.4, 0.154 mol/L NaCl, 0.05% Tween 20) à 4 °C durant 16 h. Par la suite, elle est incubée avec l'anticorps spécifique dirigé contre la sous-unité de l'intégrine recherchée.

Les anticorps anti- $\alpha_8$ ,  $\alpha_5$ ,  $\alpha_v$  AB1930 et  $\beta_1$  130L sont dilués 1:1000, les anticorps anti- $\alpha_v$  P3G8 et  $\beta_1$  Ha2/5 sont dilués 1:500 et l'anti- $\beta_3$  F11 est dilué 1:250. Toutes les dilutions se font avec le tampon de lavage. L'incubation avec le premier Ac est de 90 min pour les 2 anti- $\alpha_8$ , les 2 anti- $\alpha_5$ , l'anti- $\alpha_v$  AB1930 et l'anti- $\beta_1$  130L ou de 120 min pour l'anti- $\alpha_v$  P3G8, l'anti- $\beta_3$  F11 et l'anti- $\beta_1$  Ha2/5 à la température ambiante. Après 4 lavages, la membrane est incubée avec le deuxième anticorps. L'anti-lapin couplé à la peroxydase (dilué 1:20 000, avec 2% de sérum de veau) reconnaît les 2 anti- $\alpha_8$ , l'anti- $\alpha_v$  AB1930, les 2 anti- $\alpha_5$  et l'anti- $\beta_1$  130L. L'anti-souris couplé à la peroxydase (dilué 1:500) reconnaît l'anti- $\alpha_v$  P3G8 et l'anti- $\beta_3$  F11. L'anti-hamster couplé à la biotine (dilué 1:500) reconnaît l'anti- $\beta_1$  Ha2/5.

L'incubation avec le deuxième anticorps est de 60 min dans le cas de l'anti-lapin et 120 min pour l'anti-souris et l'anti-hamster. Dans le dernier cas de l'anti-hamster, une incubation supplémentaire avec la streptavidine-péroxydase de raifort durant 30 min est nécessaire. Les épitopes reconnues par les anticorps sont révélés à l'aide du kit SuperSignal (SuperSignal, Pierce, Brockville, ON) selon les recommandations du fournisseur. Ceci fournit un deuxième film (Film 2). Les deux films sont ensuite superposés afin de déterminer si le signal du film 1 se confond à celui du film 2. Si tel est le cas, la bande radioactive du film 1 correspond à l'intégrine identifiée du film 2.

## 2.7 Analyse de croissance cellulaire

L'incorporation de thymidine tritiée donne un indice de la prolifération cellulaire et permet la mesure de la synthèse d'ADN *de novo*. L'indice d'hypertrophie cellulaire et de synthèse protéique *de novo* est fourni par l'incorporation de leucine tritiée .

Après 6 h de stimulation, 1  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  [ $^3\text{H}$ ]-thymidine ou 2  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  [ $^3\text{H}$ ]-leucine (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) sont ajoutés au milieu de stimulation. L'incorporation de thymidine tritiée et leucine tritiée est dosée à la fin des 48 h de stimulation par 3 lavages cellulaires au PBS suivis d'une précipitation de 30 min au TCA (10 g/dL). Les cellules précipitées sont lavées 2 fois au méthanol 95% et séchées à l'air. Un volume de NaOH 0.2 mol/L est ajouté aux cellules puis le tout est incubé avec agitation durant 90 min à 24 °C. Le même volume de HCl 0.2 mol/L est ensuite ajouté et 50  $\mu\text{L}$  de l'échantillon/mL de liquide à scintillation sont comptés au compteur bêta.

## 2.8 Profil radioactif d'intégrine de type RGD marquées à l' $^{125}\text{I}$ :

Le test de radioliation (section 2.4) est effectué avec des protéines solubilisées (section 2.2) provenant de cultures cellulaires stimulées ou non de l'aorte et de l'artère mésentérique. Les complexes radioactifs (intégrines de type RGD-échistatine iodée) sont séparés par SDS-PAGE 6 % d'acrylamide. Après le séchage, le gel est exposé sur un écran de PhosphorImager à 24 °C pendant 2 h puis chaque bande radioactive est quantifiée par un système PhosphorImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). En parallèle, la quantité totale de protéines est mesurée par un dosage de Bradford après une stimulation de 48 h dans les 24 puits avec les mêmes facteurs de croissance utilisés pour dresser le profil radioactif.

L'expression des intégrines de type RGD en fonction des facteurs de croissance peut être analysée par la relation suivante :

$$\frac{\text{Quantification (PhosphorImager)} \times \text{le facteur de correction}}{\text{quantité totale de protéines } (\mu\text{g})}$$

le facteur de correction étant le volume total du test de radioligand par rapport au volume chargé sur le gel. Ce calcul permet une quantification qui tient compte des variations des quantités de protéines ce qui donne une quantification nette.

## **2.9 Dosage d'ADN par crystal violet**

La réplication de l'ADN est mesurée par la coloration au crystal violet (Kueng *et al*, 1989) qui marque l'ADN totale. Une solution de glutaraldéhyde 1 % est ajoutée aux cultures cellulaires et agitée rapidement durant 15 minutes. Après 3 lavages à l'eau, la coloration au crystal violet (200 mmol/L MES, 0.1 % crystal violet, pH 6.0) avec agitation durant 20 min est suivie de 5 lavages à l'eau et d'un séchage. Le colorant fixé à l'ADN est solubilisé dans l'acide acétique 10 g/dL et la densité optique est lue à 570 nm.

## **2.10 Analyse de la densité de récepteurs exprimés**

### **2.10.1 Courbe de saturation**

Les courbes de saturation sont utilisées afin de déterminer la quantité maximale de sonde nécessaire pour bloquer tous les sites de liaison des intégrines retrouvées dans un échantillon protéique. Il est possible, à partir de quantités connues de ligand, d'estimer la quantité de récepteurs lorsque la liaison du ligand aux sites de liaison atteint un plateau.

Le test de radioligand (section 2.4) est effectué avec 25 µg de protéines solubilisées (section 2.2) et 9 concentrations différentes d'échistatine iodée: 750 000, 500 000, 250 000, 125 000, 62 500, 31 250, 15 625, 7 813 et 0 cpm. Les protéines solubilisées proviennent de cellules stimulées dans les Pétri de 15 cm. Les 9 réactions sont faites dans les mêmes conditions et les complexes formés sont séparés par SDS-PAGE 6% d'acrylamide. Chaque bande est quantifiée

(section 2.7) par une exposition de 2 h à 24 °C dans le système de PhosphorImager. En parallèle, une courbe standard de la quantification au PhosphorImager en fonction de la radioactivité est effectuée. Quelques  $\mu\text{L}$  de radioactivité en quantités croissantes sont déposés sur une membrane de nitrocellulose et quantifiés avec les bandes radioactives obtenues par SDS-PAGE. La courbe standard permet de transformer les données relatives du PhosphorImager (données brutes) en radioactivité (cpm). La liaison non spécifique du ligand au récepteur n'a pas été vérifiée puisqu'une étude antérieure (Thibault, 2000) a démontrée que l'EDTA inhibe complètement la liaison.

Les courbes de saturation (figure 9) sont tracées de la façon suivante : la quantité relative d'échistatine iodée liée (B) en fonction de la quantité totale d'échistatine ajoutée dans le mélange réactionnel.

### **2.10.2 Courbe de Scatchard**

A partir des courbes de saturation, il est possible de calculer les constantes de dissociation ( $K_d$ ), ce qui nous donne un indice de l'affinité de la sonde pour le récepteur. La quantité totale de récepteur ( $B_{\text{max}}$ ) présente dans une suspension protéique peut également être déduite de la courbe de saturation. Pour ce faire, les données obtenues lors du test de saturation sont transformées mathématiquement en courbes de Scatchard (figure 9, dans l'encart) de la façon suivante:

[ B/la quantité d'échistatine iodée libre (F)] en fonction de B.

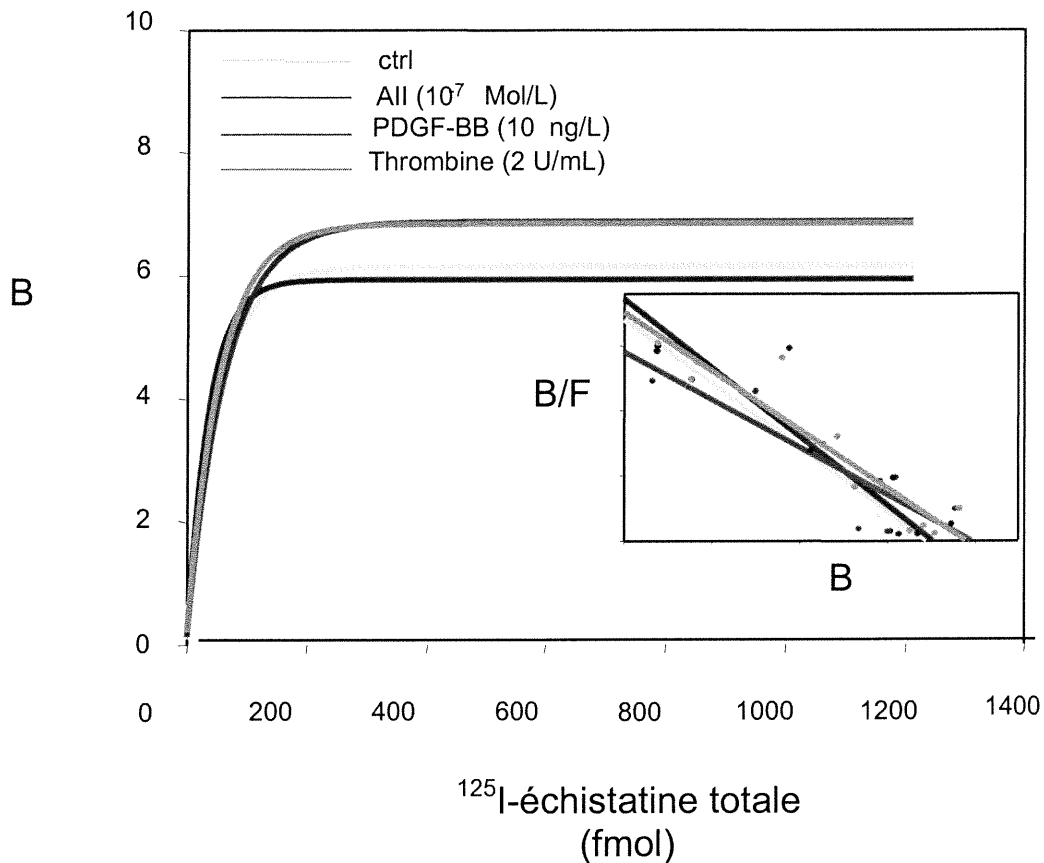


Figure 9. **Courbes de saturation et courbes de Scatchard (encart) de l'intégrine  $\alpha_8\beta_1$  des VSMC mésentériques en fonction des facteurs de croissance.** La radiolisation entre l'intégrine et l'échistatine a été obtenue avec des concentrations d'échistatine variant de 0 à 750 000 cpm.

Les  $K_d$  et les  $B_{max}$  sont calculés à partir de la transformation de la Scatchard par les relations suivantes:

$$K_d = -1/\text{pente}$$

$$B_{max} = [(Y_0/\text{pente})/1000] \times \text{facteur de correction.}$$

- $Y_0$  représente l'ordonnée à l'origine

-Le facteur de correction correspond au volume total du test de radioligand par rapport au volume chargé sur le gel.

Avec cette technique, il est possible de comparer les effets des facteurs de croissance entre eux sur les intégrines de type RGD. Afin de pouvoir faire une

analyse statistique sur les données calculées, les pKd ont été calculés avec la relation suivante :  $-\log Kd = pKd$ .

## 2.11 Immunocytochimie

La caractérisation des cultures cellulaires se fait avec les anticorps suivant: anti-desmine (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO; 1:100, DE-U-10), anti-vimentine (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO; 1:100, V-9), anti-alpha actine musculaire lisse (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO; 1:400, 1A4), anti-chaîne légère de la myosine (Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA; 1:100, G-4) et anti-marqueur des protéines de surfaces des fibroblastes (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO; 1:200, 1B10).

La localisation des intégrines se fait avec certains des anticorps anti-intégrines décrits suivants, dans la section 2.5: anti- $\alpha 8$  (1:100, 2415), anti- $\alpha 5$  (1:150, 160C2), anti- $\alpha v$  (1:100, AB1930), anti- $\beta 1$  (1:100, 130L), anti- $\beta 3$  (1:40, 2C9.G2) et anti-vinculine (Sigma Chemical Co., St-Louis, MO; 1:300, hVIN-1). Les deuxièmes anticorps utilisés sont: anti-souris (Chemicon International, Inc., Temecula, CA; 1:100), anti-lapin (Chemicon international, Inc., Temecula, CA; 1:100), anti-hamster/biotine (Serotec, Hornby, ON; 1:100) et le troisième anticorps dans le cas de la détection de la  $\beta 3$  est l'anti-chèvre (Santa Cruz Biotechnologie, Santa Cruz, CA; 1:50).

Les VSMC mésentériques et aortiques sont ensemencées sur des lames de verre (Nunc, Lab-Tek) de 8 puits non enrobées à une densité de 2 000 cellules par puits. Les cellules sont mises à jeun durant 24 h à une densité de 5 % de confluence cellulaire (après 1 jour environ). Le protocole décrit par Polak *et al* (1983) est suivi. La fixation des cellules est effectuée avec 3.7% de formaldéhyde pendant 10 min puis les membranes cellulaires sont perméabilisées avec 0.1% de Triton X-100 pendant 30 min. La perméabilisation est nécessaire puisque les Ac utilisés reconnaissent le domaine cytoplasmique des intégrines. Les sites non spécifiques sont bloqués dans le tampon de



blochage (3% sérum de chèvre, 3% BSA dans le PBS) durant 25 min puis le double marquage (intégrine-vinculine) dans chaque puits est effectué. Toutes les dilutions d'anticorps sont faites avec le tampon de blocage. Le premier Ac est incubé durant 1h et le deuxième Ac durant 45 min à 4 °C dans une chambre humide. Le deuxième Ac anti-souris couplé à la rhodamine permet de visualiser la vinculine sauf dans le cas de la  $\beta 3$  où l'Ac anti-souris est couplé à la fluorescéine. Le deuxième Ac anti-lapin couplé à la fluorescéine identifie les sous-unités  $\alpha 8$ ,  $\alpha v$ ,  $\alpha 5$  et  $\beta 1$  alors que l'anti-hamster biotine identifie la  $\beta 3$ . Cependant la  $\beta 3$  est visualisée avec un troisième Ac, l'anti-souris couplé à la rhodamine. L'immunofluorescence est observée avec un microscope Axiovert 100M avec l'huile à immersion.

## **2.12 Analyse statistique**

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  l'écart type. Les différences entre les groupes sont analysées par analyse de la variance one way anova de Sigma Stat 5.0 (SPSS science inc., Chicago, IL). Les courbes et les graphiques ont été tracés par Sigma Plot 2000 (SPSS science inc., Chicago, IL). Toutes les expériences ont été répétées au moins 4 fois et les données représentatives sont montrées.

## CHAPITRE 3: RESULTATS

### **3.1 Identification des conditions expérimentales**

#### **3.1.1 Caractérisation cellulaire**

Afin de vérifier la pureté de la culture cellulaire, la caractérisation des cellules de l'aorte et du lit mésentérique est effectuée par immunocytochimie. Le marquage des protéines cellulaires spécifiques (rouge) à certains types cellulaires simultanément à la coloration de tous les noyaux cellulaires (bleue) permet de vérifier la présence de cellules endothéliales ou de fibroblastes. L'analyse se fait de la façon suivante : l'absence de signal fluorescent provenant du marqueur cellulaire exclu le type cellulaire lors de la caractérisation. La coloration des noyaux permet de vérifier la présence de cellules lors du marquage des protéines cellulaires. Les marqueurs cytologiques utilisés sont spécifiques aux VSMC (MHC, desmine), aux fibroblastes (protéines de surface des fibroblastes) ou aux deux types cellulaires (vimentine,  $\alpha$ -actine). L'anticorps anti-vimentine donne un signal pour toutes les cellules de la culture cellulaire de l'aorte (figure 10a) et de la culture cellulaire du lit mésentérique (figure 10d). Le marquage de la desmine s'avère être positif pour toutes les cellules de la culture de l'aorte (figure 10b) et de l'artère mésentérique (figure 10e). L'anticorps anti-protéines de fibroblastes ne détecte aucun épitope connu, malgré la présence de cellules (observée par la coloration des noyaux) de la culture de l'aorte (figure 10c) et de l'artère mésentérique (figure 10f). Les marquages de l' $\alpha$ -actine et de la chaîne lourde de la myosine montrent également la présence des VSMC (données non montrées). Les deux cultures semblent pures au-delà de 95 %.

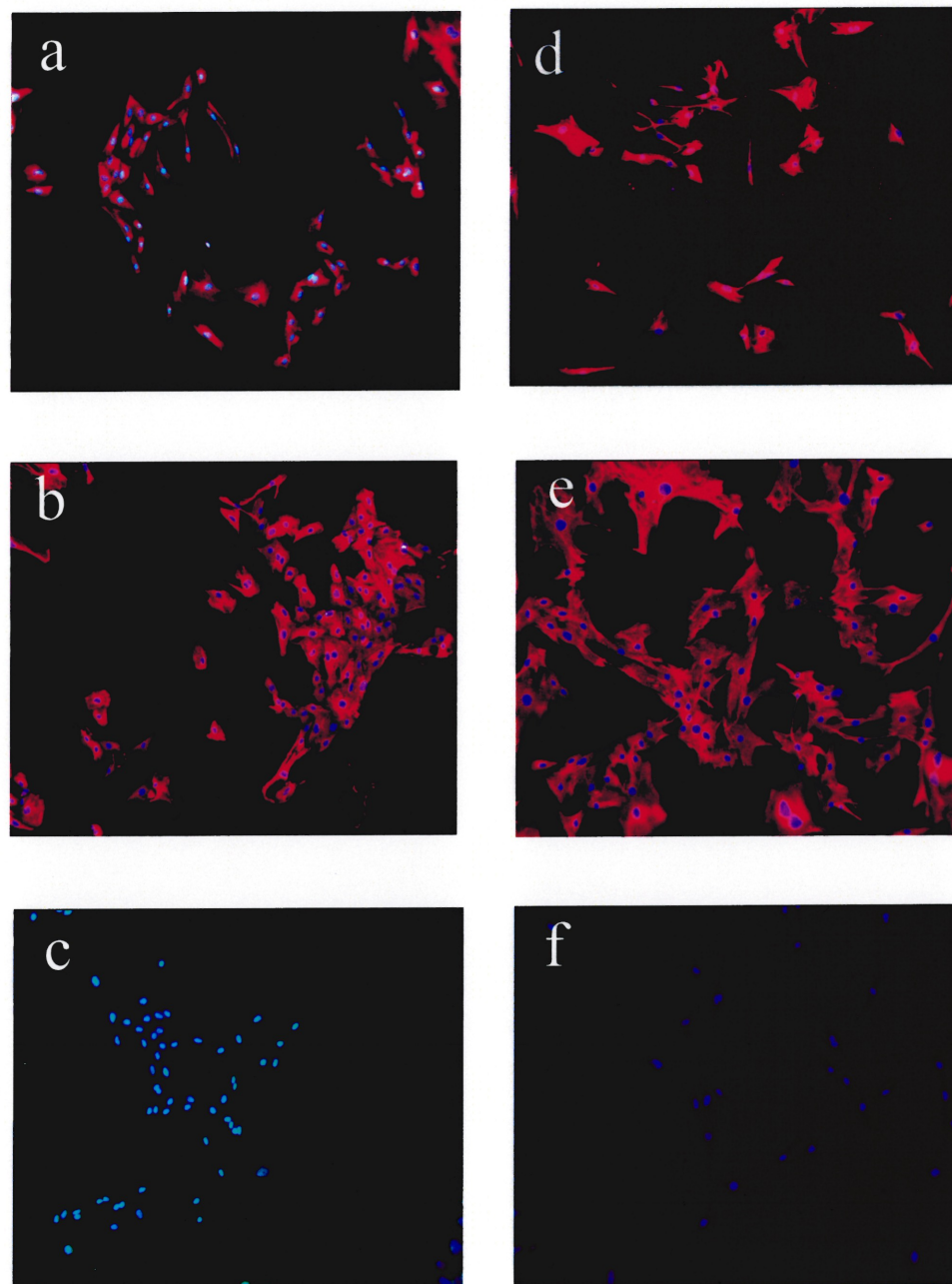


Figure 10. **Visualisation de la caractérisation cellulaire.** Le marquage de protéines cellulaires des cellules de l'aorte (a, b, c) et de l'artère mésentérique (d, e, f) telles que la vimentine (a,d), la desmine (b,e) et les protéines de fibroblastes (c,f) sont traitées avec l'anticorps anti-lapin conjugué à la rhodamine. Tous les noyaux (bleus) sont visibles par la coloration Hoechst. Les cellules ont été ensemencées directement sur une lame de verre de 8 puits au premier passage. Grossissement de 220X.

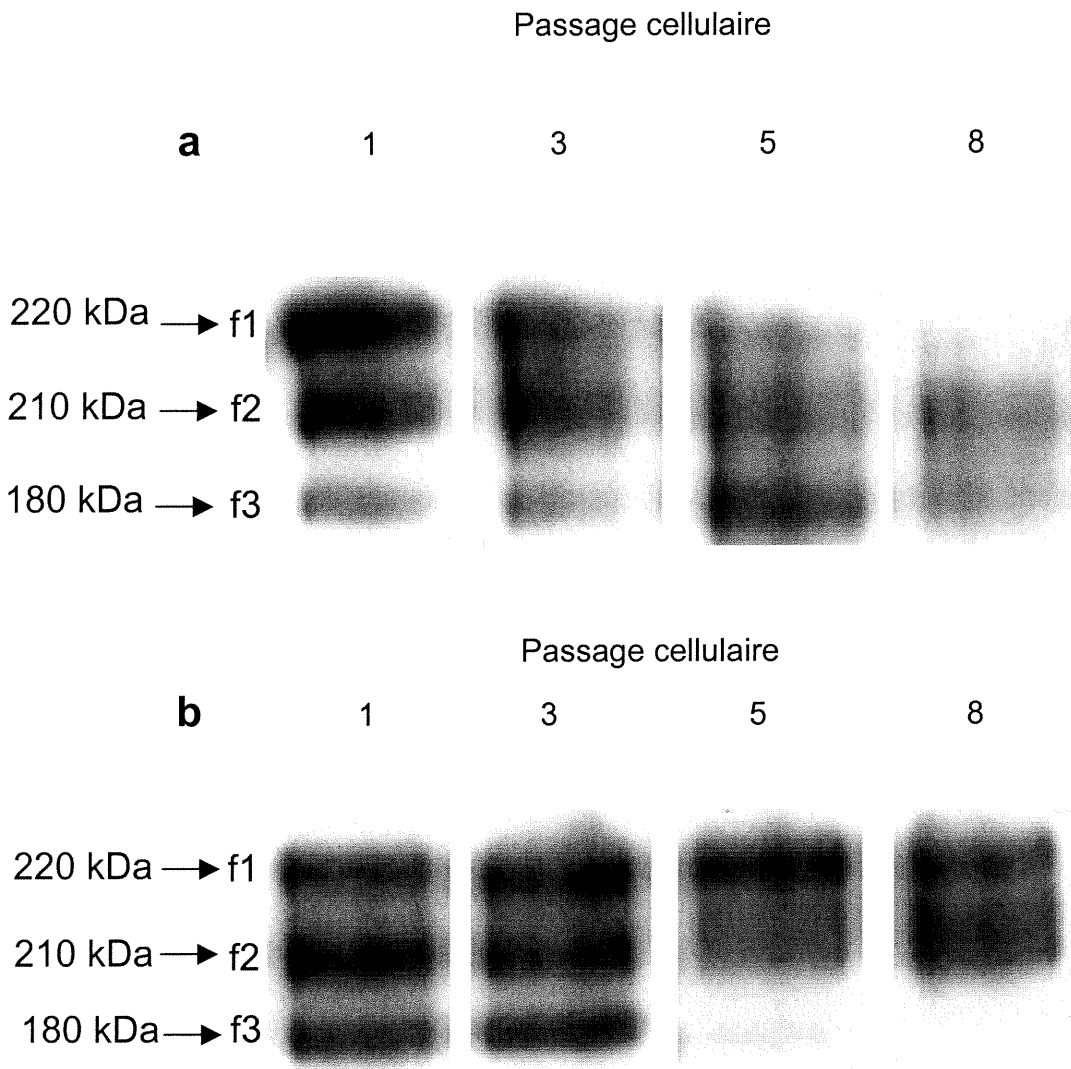


Figure 11. **Identification du passage cellulaire à étudier.** Les intégrines de type RGD ont été marquées par 150 000 cpm d'échistatine-iodée. La sonde (échistatine iodée) a été mélangée avec 25  $\mu$ g de protéines solubilisées puis les complexes ont été visualisés par autoradiographie sur film X-OMAT AR (Kodak ) durant 2 h à  $-80^{\circ}\text{C}$  en fonction des passages cellulaires des VSMC aortiques (a) et (b) mésentériques. Le poids moléculaire de chaque bande radioactive est indiqué par les flèches.

### 3.1.2 Passage cellulaire

Dans le but de vérifier l'expression des intégrines de type RGD en fonction des passages cellulaires, les protéines solubilisées des cellules provenant des passages 1, 3, 5 et 8 des cultures cellulaires de l'aorte et du lit mésentérique ont servi au test de radioliation décrit par Thibault (2000). Tous les complexes radioactifs formés sont stables au SDS, ce qui permet de les séparer par électrophorèse. Trois bandes radioactives (f1, f2 et f3) pouvant correspondre à 3 intégrines de type RGD différentes sont observées dans le cas des VSMC aortiques (figure 11a) ou des VSMC mésentériques (figure 11b). La première bande (f1; 220 kDa) disparaît graduellement selon les différents passages des VSMC de l'aorte (figure 11a). La dernière bande (180 kDa) observée dans les VSMC mésentériques diminue d'intensité au passage 5 pour complètement disparaître au passage 8 (figure 11b). La deuxième bande (f2; 210 kDa) ne change pas d'intensité en fonction des passages. Pour les tests subséquents, le passage 3 des cultures cellulaires des VSMC de l'aorte et du lit mésentérique a été utilisé puisque, dans les deux cas, les trois bandes radioactives étaient encore bien présentes à ce passage.

### 3.2 Sécrétion de fibronectine

Ce test vise à examiner l'impact de certains facteurs de croissance sur les VSMC aortiques et mésentériques puisque la sécrétion de fibronectine est un marqueur de stimulation cellulaire. De plus, la fibronectine contient le motif RGD, ce qui implique une interaction avec les intégrines de type RGD. Les facteurs de stimulation angiotensine II ( $10^{-7}$ M), PDGF-BB (10 ng/mL) et thrombine (2 U/mL) ont été choisis en fonction de leur implication dans la pathologie vasculaire, la prolifération et l'hypertrophie des VSMC (Stouffer *et al.*, 1998; McNamara *et al.*, 1996; Bobik *et al.*, 1990).

### **3.2.1 Dosage de fibronectine sécrétée par les VSMC de l'aorte**

Après un jeûne de 48 h, les VSMC ont été stimulées durant 48 h avec les facteurs de croissance. Le test ELISA (figure 12) montre une augmentation significative de la sécrétion de fibronectine en présence de tous les agents. L'augmentation entraînée par la thrombine est de l'ordre d'un facteur de 7 alors que celui-ci est de 4 pour le PDGF-BB et de 2 pour l'All. L'augmentation de la sécrétion de fibronectine en présence de thrombine est pratiquement la même que celle du FBS puisque le témoin positif (FBS) augmente 8 fois la sécrétion basale (témoin) de la protéine. Ces facteurs de croissance sont capables de modifier le cycle normal de la VSMC aortique (vaisseau conducteur) du passage 3, par conséquent, les tests suivants ont pu être entrepris avec ces mêmes facteurs.

### **3.2.2 Dosage de fibronectine sécrétée par les VSMC mésentériques**

Afin de comparer les effets des facteurs de croissance sur les VSMC de vaisseaux conducteurs (aorte) et de vaisseaux de résistance (artère mésentérique), le test ELISA a été réalisé sur les milieux des VSMC mésentériques stimulées (figure 13). L'augmentation significative de la sécrétion de fibronectine par les VSMC mésentériques est observée après avoir mis en quiescence les cellules durant 24 h suivi de la stimulation de 48 h. Le PDGF-BB (10 ng/mL) et la thrombine (2 U/mL) augmente significativement la sécrétion de fibronectine. L'augmentation avec le PDGF-BB est de l'ordre d'un facteur de 1.2 et celle avec la thrombine est d'un facteur de 1.4 comparées à leur témoin respectif. Le FBS augmente par un facteur de 1.8 alors que la sécrétion de fibronectine lors de stimulation par l'All n'augmente pas. La réponse des VSMC mésentériques aux différents facteurs de croissance est quantitativement différente de celle des VSMC de l'aorte, cependant l'effet est quand même observé.

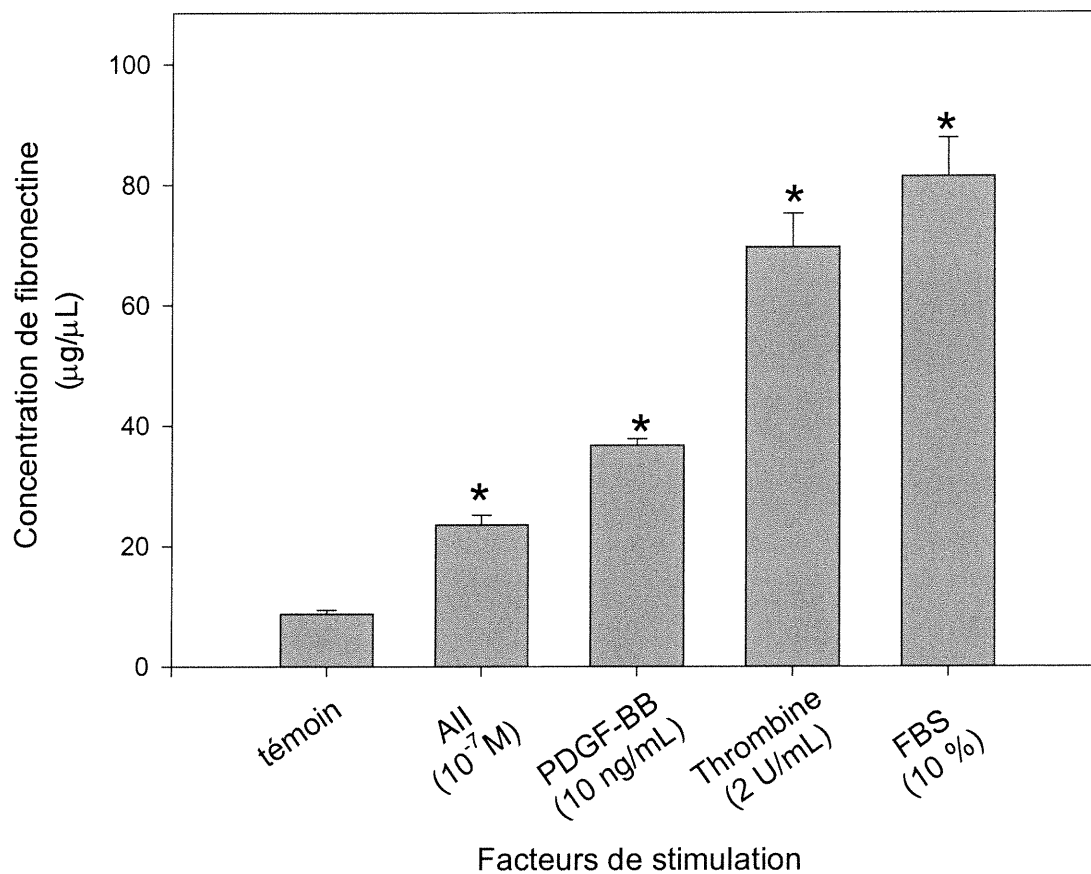


Figure 12. **Sécrétion de fibronectine par les VSMC aortiques.** Les cellules du passage 2 ont étéensemencées dans les boîtes de 24 puits et stimulées durant 48 h. Les concentrations de fibronectine ont été dosées dans les milieux cellulaires par un test ELISA. (N=8; \*P<0.01 versus témoin)

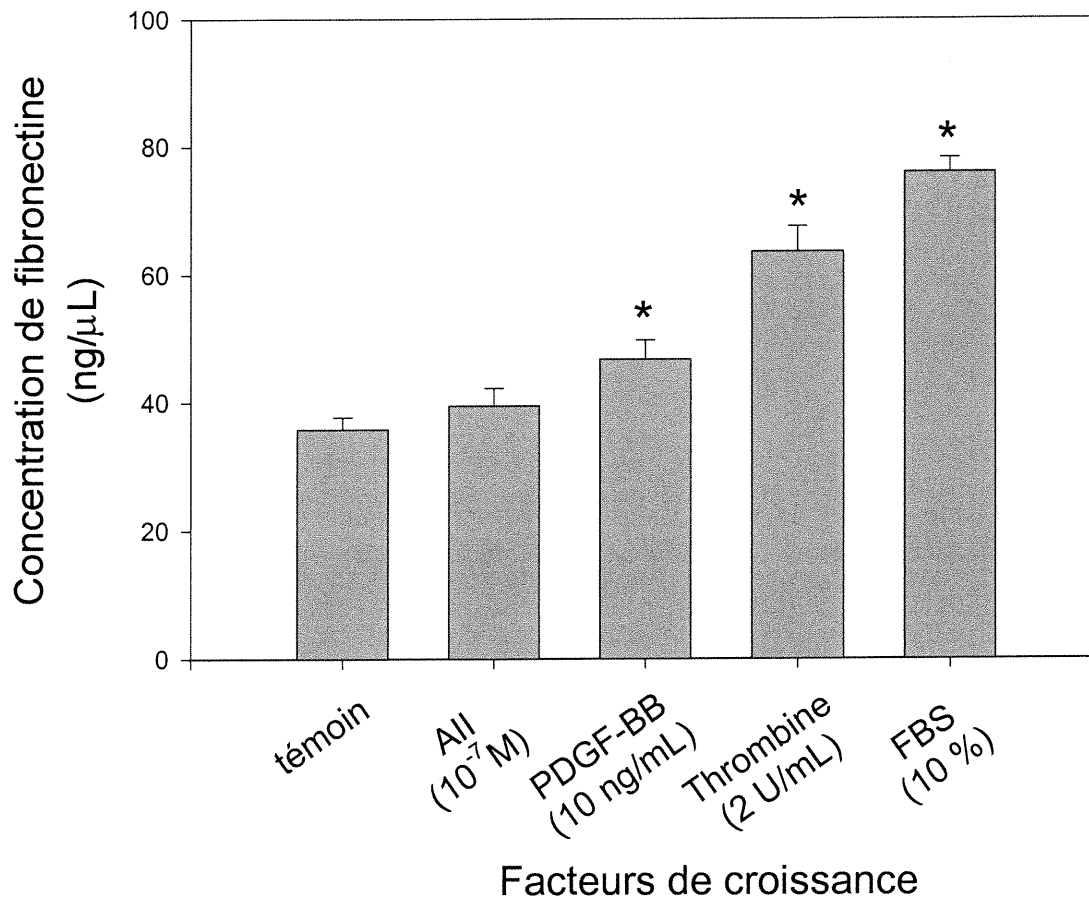


Figure 13. **Sécrétion de fibronectine par les VSMC mésentériques.** Les cellules du passage 2 ont étéensemencées dans les boîtes de 24 puits et stimulées durant 48 h. Les concentrations de fibronectine ont été dosées dans les milieux cellulaires par un test ELISA. (N=8; \*P<0.01 versus Ctrl)



### 3.3 Identification des intégrines de type RGD

Afin d'identifier les intégrines type RGD marquée par l'échistatine iodée, le buvardage de type Western a été effectué avec la même membrane de nitrocellulose ayant servi à l'autoradiographie du test de radiolisation. En superposant l'autoradiogramme et le film d'immunobuvardage obtenu après l'exposition à la chémiluminescence, il est possible d'identifier les protéines radioactives. Si le signal radioactif se confond au signal luminescent, l'intégrine identifiée en immunobuvardage correspond à la bande radioactive. Afin de certifier les résultats, chaque intégrine étudiée a été identifiée à l'aide de deux anticorps reconnaissant les sous-unités  $\alpha$  ou  $\beta$  (sauf pour l'anti- $\beta_3$  à identification unique). De plus, deux concentrations d'échistatine iodée, soient 75 000 et 150 000 cpm, ont été utilisées dans le but d'observer l'augmentation graduelle du signal radioactif et du signal de Western blot tout en gardant la même quantité de protéines étudiées. La concentration la plus forte d'échistatine iodée devrait former plus de complexes radioactifs et le signal de l'anticorps devrait être plus fort. Cette observation permet de déterminer la spécificité de l'Ac pour l'intégrine. Les protéines des fibroblastes cardiaques (ligne 1, figures 14 et 15) sont utilisées comme témoin positif dans l'identification par immunobuvardage.

#### 3.3.1 Buvardage de type Western avec les protéines des VSMC aortiques

La première bande radioactive (f1; 220 kDa) est positive pour les 2 Ac anti- $\alpha_8$  2415 (figure 14a) et L.S. (non montré) et les 2 Ac anti- $\beta_1$  130L (figure 14b) et Ha2/5 (non montré). La deuxième bande radioactive (f2 ; 210 kDa) est reconnue par les anti- $\beta_1$  130L (figure 14b) et Ha2/5 (non montré), les anti- $\alpha_v$  AB1930 (figure 14c) et P3G8 (non montré) et les anti- $\alpha_5$  160C2 (figure 14d) et 1928 (non montré). Finalement, le signal de l'anti- $\beta_3$  F11 (figure 14e), des anti- $\alpha_v$  AB1930

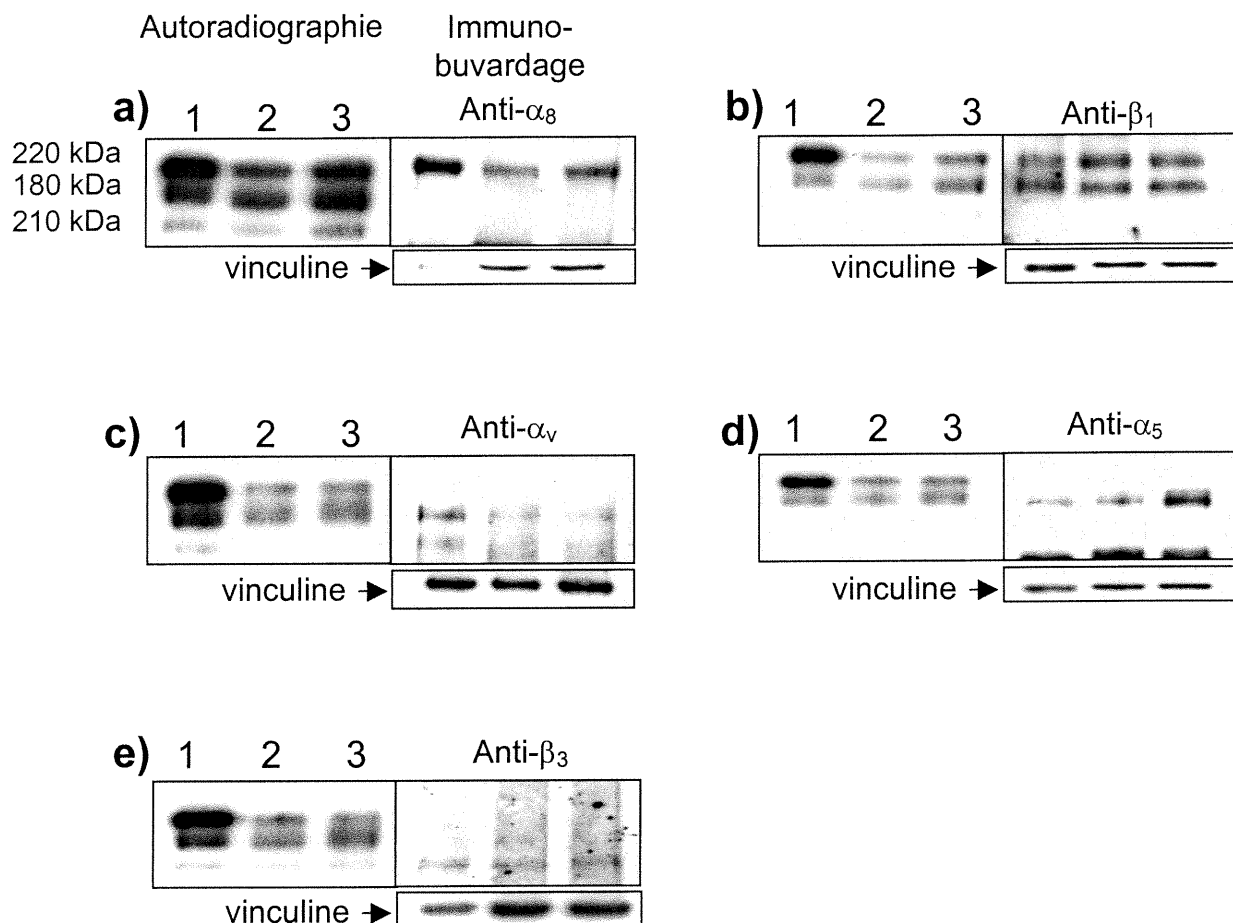


Figure 14. **Identification des intégrines de type RGD exprimées par les VSMC aortiques.** Les autoradiographies ont été obtenues par le test de radiolisation avec 75 000 cpm (ligne 2) et 150 000 cpm (lignes 1 et 3). Les immunobuvardages sont effectués avec la membrane de nitrocellulose ayant servi à l'autoradiographie pour détecter l' $\alpha_8$  (a), le  $\beta_1$  (b), l' $\alpha_v$  (c), l' $\alpha_5$  (d) et le  $\beta_3$  (e). Les protéines des fibroblastes cardiaques de rats (ligne 1) servent de témoin positif. Les protéines des VSMC aortiques (lignes 2 et 3) sont les échantillons à tester. La vinculine sert de marqueur interne protéique.

(figure 14d) et P3G8 (non montré) se confond avec la dernière bande (f3 ; 180 kDa).

Dans chaque cas étudié, l'intensité du signal luminescent variait en fonction de la radioactivité ajoutée, confirmant la spécificité des Ac. L'identification démontre que la première bande est l' $\alpha_8\beta_1$ , la deuxième peut être l' $\alpha_5\beta_1$  et l' $\alpha_v\beta_1$  exprimées indépendamment et ne pouvant être discriminées avec les outils utilisés ou un complexe composé de ces deux intégrines. Finalement, la dernière bande est l' $\alpha_v\beta_3$ . Il est à noter que l' $\alpha_v\beta_3$  est l'intégrine la moins abondante à l'état basal.

### **3.3.2 Buvarpage de type Western avec les protéines des VSMC mésentériques**

Les anticorps utilisés et montrés pour l'identification des intégrines de type RGD exprimées par les VSMC mésentériques sont les mêmes que ceux utilisés dans la section 3.3.1. Les anti- $\alpha_8$  (figure 15a) reconnaissent la première bande radioactive (f1; 220 kDa). Les anti- $\beta_1$  (figure 15b) reconnaissent la première et la deuxième bande (f2; 210 kDa). Les anti- $\alpha_v$  (figure 15c) lient les épitopes se trouvant dans la deuxième et la troisième bande (f3; 180 kDa). Les anti- $\alpha_5$  (figure 15d) reconnaissent la deuxième bande radioactive alors que l'anti- $\beta_3$  (figure 15e) reconnaît la dernière bande. Dans tous les cas, l'intensité du signal luminescent varie aux deux concentrations d'échistatine iodée ajoutées c'est à dire 75 000 (ligne 2) et 150 000 cpm (ligne et 3), ce qui confirme la spécificité des Ac. Il apparaît ici que la première bande est l' $\alpha_8\beta_1$ , la deuxième peut être un mélange de l' $\alpha_5\beta_1$  et de l' $\alpha_v\beta_1$  ou un complexe formé de ces deux intégrines. Il semble que la dernière bande soit de l' $\alpha_v\beta_3$  et qu'elle soit exprimée en quantité égale à l' $\alpha_8\beta_1$ , contrairement aux VSMC aortiques.

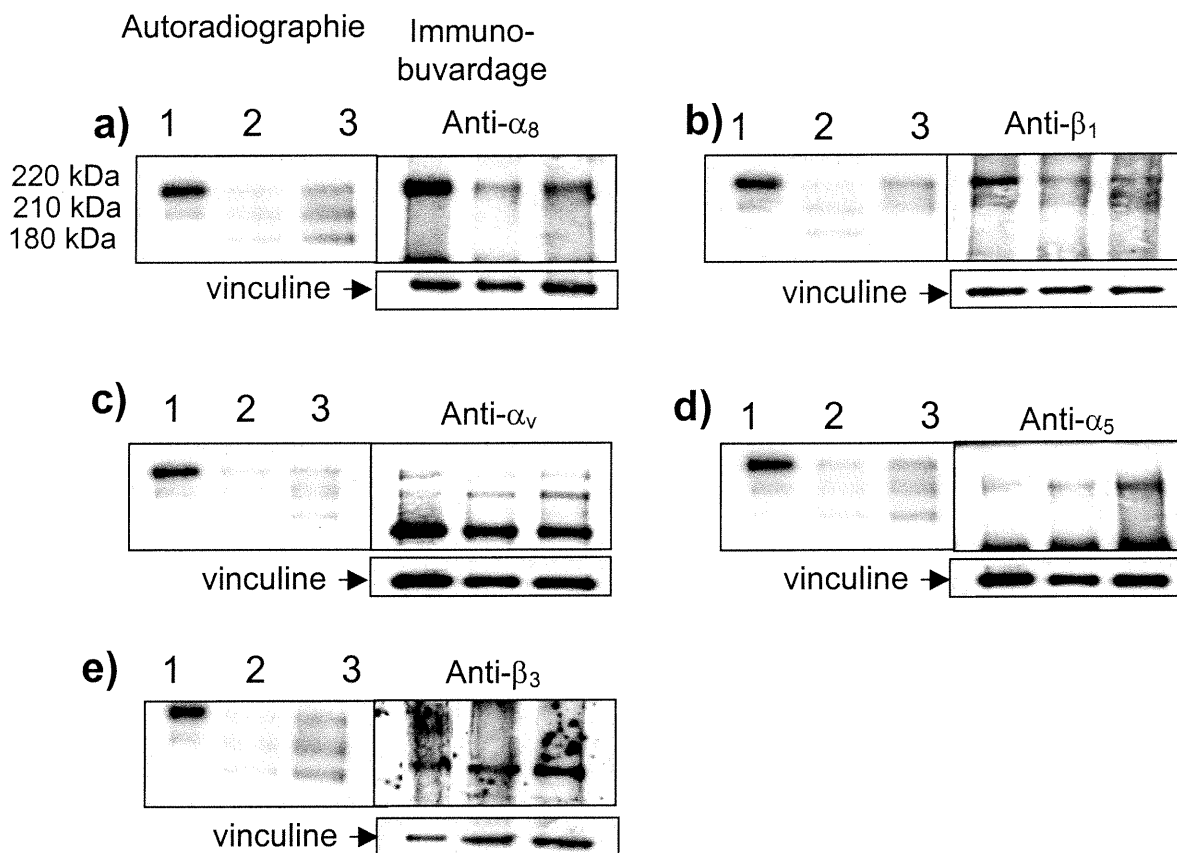


Figure 15. **Identification des intégrines de type RGD exprimées par les VSMC mésentériques.** Les autoradiographies ont été obtenues par le test de radiolisation avec 75 000 cpm (ligne 2) et 150 000 cpm (lignes 1 et 3). Les immunobuvardages sont effectués avec la membrane de nitrocellulose ayant servi à l'autoradiographie pour détecter l' $\alpha_8$  (a), le  $\beta_1$  (b), l' $\alpha_v$  (c), l' $\alpha_5$  (d) et le  $\beta_3$  (e). Les protéines des fibroblastes cardiaques de rats (ligne 1) servent de contrôle positif. Les protéines des VSMC mésentériques (lignes 2 et 3) sont les échantillons à tester. La vinculine sert de marqueur interne protéique.

### **3.4 Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD**

L'identification des intégrines de type RGD pour les deux types cellulaires réalisée, nous voulons maintenant évaluer les modifications de leur expression en fonction des facteurs de croissance.

En bref, la stimulation de l'expression des intégrines de type RGD est vérifiée par le test de radioliation et de l'indice hyperplasique et hypertrophique cellulaire. Le but de cette approche est de savoir si l'augmentation de l'expression est causée par une augmentation de la population cellulaire ou par une augmentation de l'expression des intégrines de type RGD. L'expression étant mesurée dans un extrait protéique, il est important de ramener les données à une unité commune pour toutes les stimulations c'est à dire la quantité de protéines totales de la suspension. Les cellules quiescentes pendant 48 h pour les VSMC aortiques et 24 h pour les VSMC mésentériques sont stimulées durant 48 h avec l'All ( $10^{-7}$ M), le PDGF-BB (10 ng/mL), la thrombine (2 U/mL) et le FBS (10 %) servant de témoin positif. Par la suite, les tests d'incorporation de leucine tritiée, de thymidine tritiée et le marquage des intégrines sont effectuées.

#### **3.4.1 Étude des intégrines de type RGD des VSMC aortiques**

##### **3.4.1.1 Stimulation de la synthèse d'ADN**

Pour évaluer l'effet des facteurs de croissance sur la synthèse d'ADN *de novo*, l'incorporation de thymidine tritiée, qui donne un indice de la prolifération, a été mesurée (figure 16a). Le PDGF-BB augmente la synthèse d'ADN par un facteur de 3.5 alors que la thrombine a un effet moins prononcé puisque l'augmentation est de 2 fois supérieur à la synthèse basale (témoin). Il est à noter que l'effet du PDGF-BB est égale à celui du témoin positif (FBS). L'All ( $10^{-7}$ M) ne semble pas avoir d'effet sur la synthèse d'ADN *de novo*, ce qui corrèle avec les observations de Geisterfer *et al.* (1987) et Holycross *et al.* (1993). La stimulation

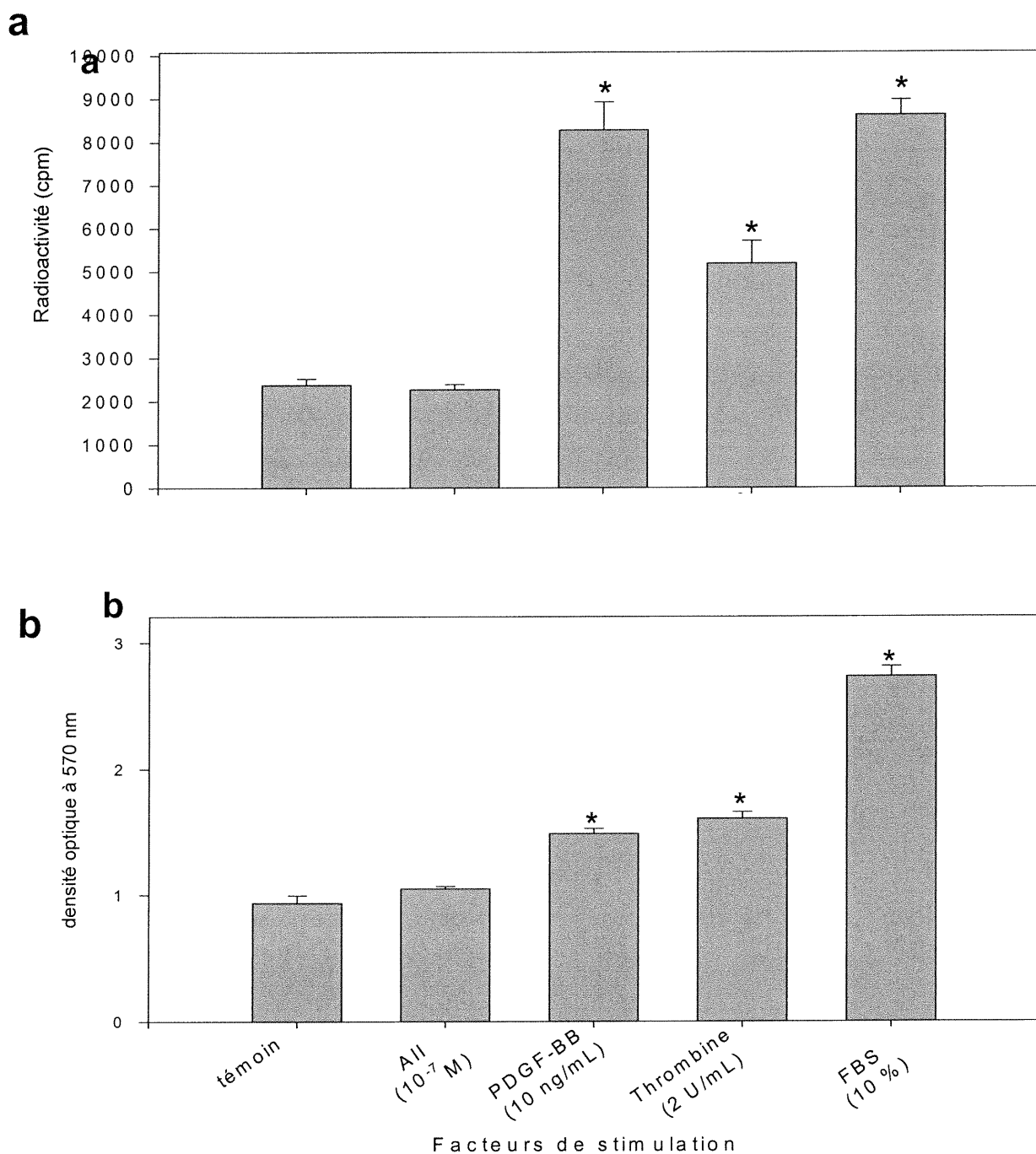


Figure 16. **Stimulation de la synthèse d'ADN chez les VSMC aortiques.** Les stimulations ont été effectuées dans les plaques de 24 puits durant 48 h. (a) La prolifération cellulaire a été vérifiée par l'incorporation de thymidine tritiée 1  $\mu\text{Ci}/\text{mL}$  et (b) la coloration au crystal violet. (N =12 puits/stimulation; \*P<0.05 versus témoin)

de la division cellulaire totale (figure 16b) observée par la coloration au crystal violet a le même profil que la synthèse d'ADN *de novo*. Cependant, les effets du PDGF-BB et de la thrombine sont moins marqués. L'augmentation significative est de l'ordre de 1.5 fois pour le PDGF-BB et 1.3 fois pour la thrombine par rapport au contrôle. L'All n'a pas d'effet sur la prolifération et le FBS montre l'effet le plus puissant. Ceci démontre que la technique du crystal violet est beaucoup moins sensible que l'incorporation de thymidine tritiée.

### 3.3.2.1 Stimulation de la synthèse protéique

La synthèse protéique *de novo* a été observée par l'incorporation de leucine tritiée alors que la quantité totale de protéines a été déterminée à l'aide du dosage par Bradford. Tous les facteurs augmentent de façon significative la synthèse protéique *de novo* (figure 17a). L'effet entre l'All ( $10^{-7}$ M), le PDGF-BB (10 ng/mL) et la thrombine (2 U/mL) est pratiquement le même et augmente d'un facteur d'environ 1.5 comparé au contrôle. La quantité totale de protéine (figure 17b) augmente de façon significative.

### 3.4.1.3 Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD

Les données observées dans la section 3.4.1 (stimulation de la prolifération cellulaire et de la synthèse protéique) permettent de spéculer une modification au niveau de l'expression des intégrines de type RGD puisque certaines de ces intégrines sont impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Wary *et al.*, 1998). Afin de vérifier une telle modification, le test de radioliation est effectué avec les protéines solubilisées provenant de cultures stimulées par l'All ( $10^{-7}$ M), le PDGF- BB (10 ng/mL), la thrombine (2 U/mL) et le FBS (10%). Les complexes formés sont visualisés et quantifiés un système PhosphorImager en unité relative (figure 18a). La figure 18b montre la quantification normalisée par mg de

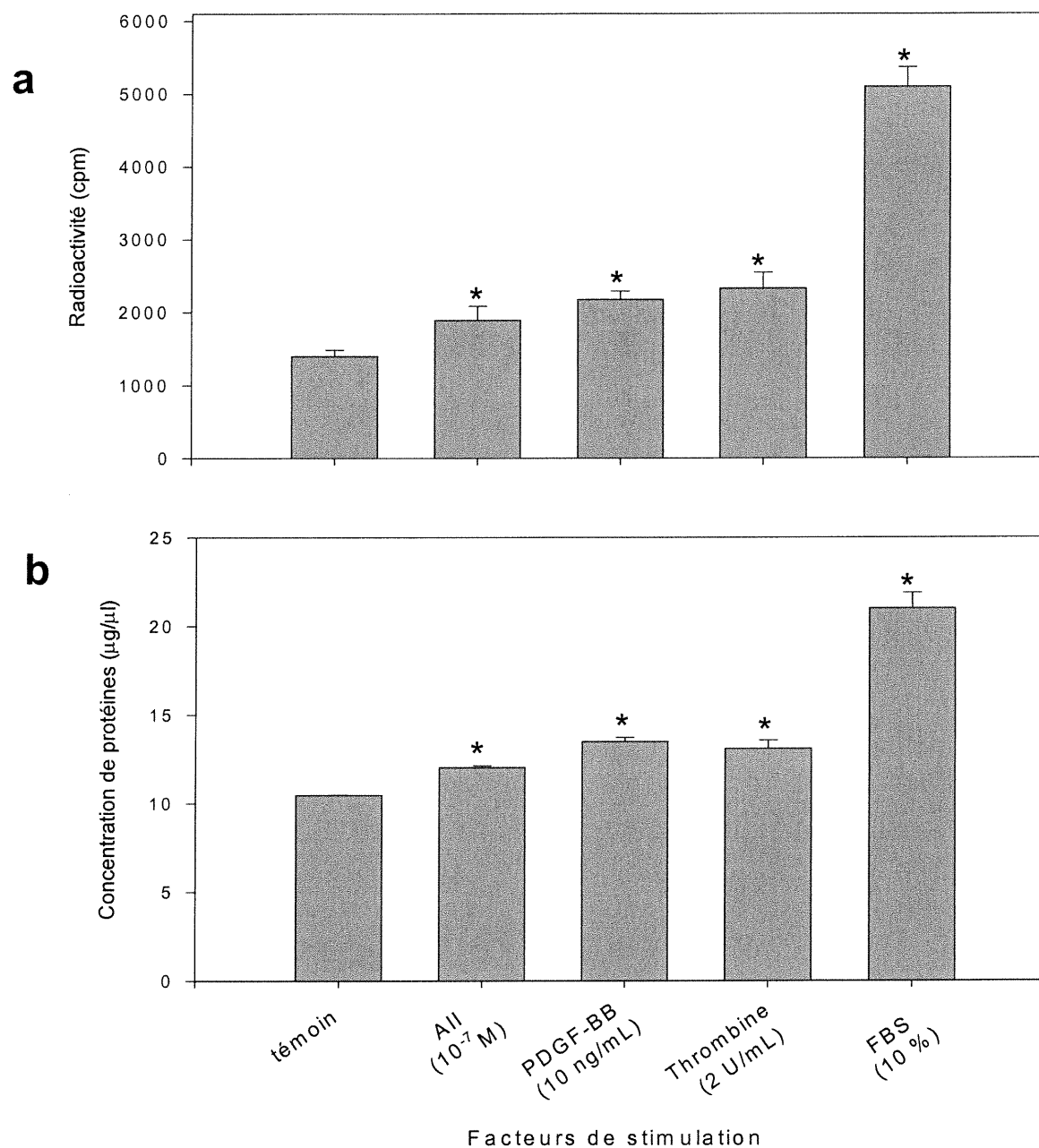


Figure 17. **Stimulation de la synthèse protéique chez les VSMC aortiques.** Les stimulations ont été effectuées dans les plaques de 24 puits. (a) La prolifération cellulaire a été vérifiée par l'incorporation de leucine tritiée  $2 \mu\text{Ci}/\text{mL}$  et (b) le dosage de Bradford. ( $n = 12$  puits/stimulation;  $*P < 0.05$  versus témoin)



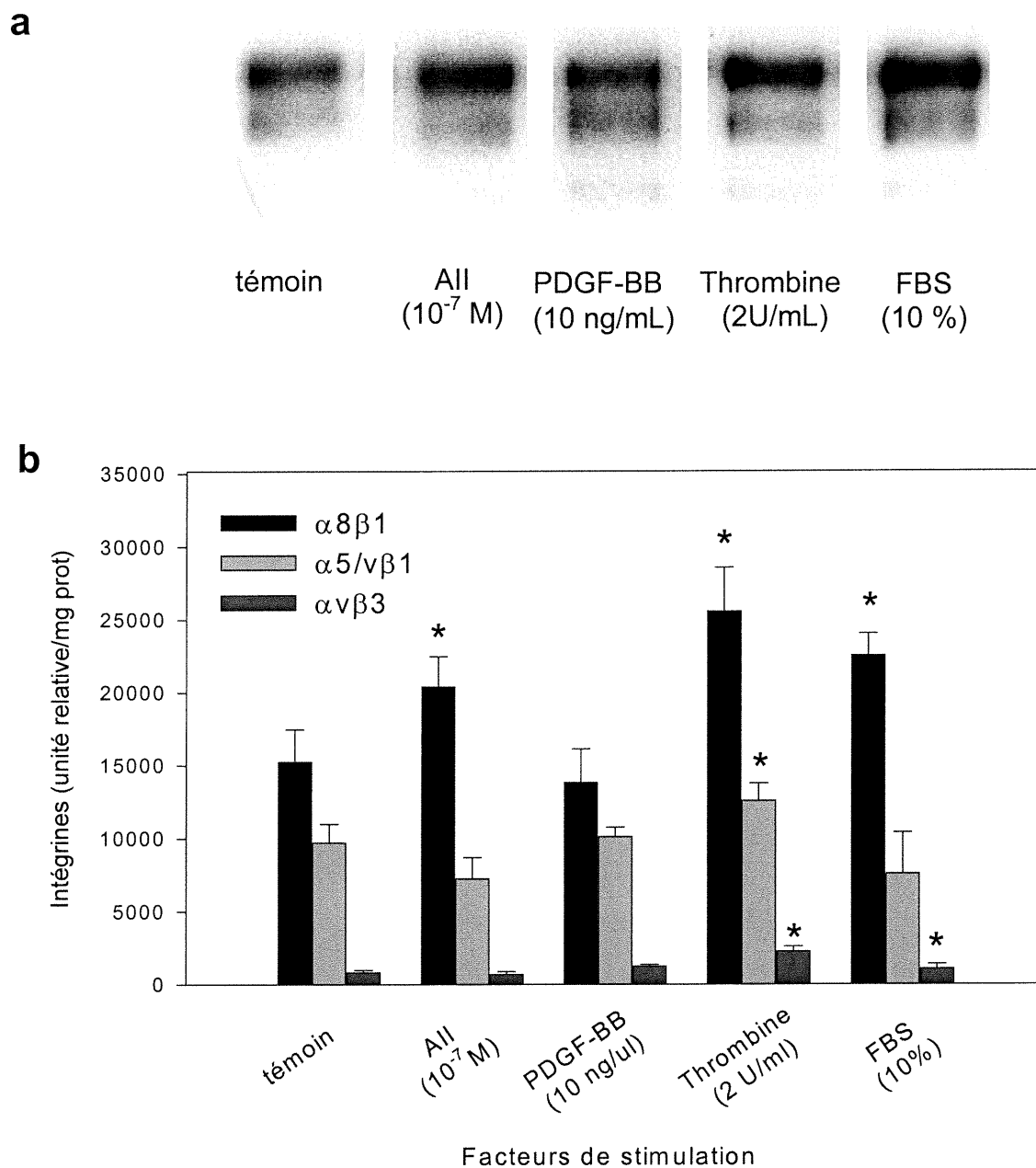


Figure 18. **Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD des VSMC aortiques.** Les cellules ont été stimulées dans les plaques de 24 puits. (a) Les intégrines ont été visualisées par autoradiographie après le test de radiolisation avec 150 000 cpm d' $^{125}$ I-échistatine. (b) La quantification par PhosphorImager a été normalisée en unité/mg de protéines. (N=9 puits/stimulation, \*P<0.05 versus témoin)

protéines (section 2.8) permettant d'examiner l'expression des intégrines. La liaison de l'échistatine iodée à l' $\alpha_8\beta_1$  après une stimulation par l'All ( $10^{-7}$ M) augmente significativement. La thrombine augmente de façon significative la quantité de liaison entre l'échistatine et les intégrines  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  (figure 18b). Il apparaît que le PDGF-BB n'a aucun effet sur les intégrines de type RGD.

#### 3.4.1.4 Quantité de récepteurs exprimés

Dans le but de déterminer la quantité de récepteurs exprimés lors des stimulations, les courbes de saturation et de Scatchard ont été tracées (section 2.9). Elles permettent de déterminer les pKd (constante de dissociation) montrés dans le tableau II et les Bmax (quantité maximale de récepteurs) retrouvés dans le tableau III de chaque intégrine étudiée en fonction des stimulations effectuées.

Dans le cas d'une stimulation par l'All ( $10^{-7}$ M), aucune différence de pKd ou d'augmentation significative du Bmax pour les intégrines  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  n'est observée. Une légère augmentation du Bmax de l' $\alpha_8\beta_1$  est visible mais non significative. En présence de PDGF-BB (10 ng/mL), les pKd et les Bmax ne varient pas de façon significative. La thrombine, par contre, entraîne une augmentation significative du Bmax des intégrines  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  sans toutefois modifier leur pKd en comparaison à leur contrôle respectif. Il est à noter que les Bmax de l' $\alpha_v\beta_3$  sont très bas soit environ 60 fmol/mg de protéines en comparaison au Bmax des autres intégrines étudiées (environ 600 fmol/mg de protéines).

Tableau II. **pKd des intégrines exprimées par les VSMC aortiques après différentes stimulations.** Le test de radioliation avec les concentrations croissantes d'I<sup>125</sup>-echistatine a permis de tracer les courbes de saturations en fonction des stimulations. A partir de ces courbes, les pKd ont été calculés. (N=4 tests/stimulation)

<b>pKd</b>	<b>Témoin</b>	<b>Angiotensine II (10<sup>-7</sup>M)</b>	<b>PDGF-BB (10 ng/mL)</b>	<b>Thrombine (2 U/mL)</b>
$\alpha_8\beta_1$	8.77 ± 0.18	8.64 ± 0.14	8.53 ± 0.31	8.31 ± 0.02
$\alpha_v/\alpha_5\beta_1$	8.30 ± 0.09	8.30 ± 0.07	8.31 ± 0.01	7.95 ± 0.08
$\alpha_v\beta_3$	8.46 ± 0.03	8.41 ± 0.05	8.52 ± 0.07	8.10 ± 0.09

Tableau III. **Bmax des intégrines exprimées par les VSMC aortiques après différentes stimulations.** Le test de radioliation avec les concentrations croissantes d'I<sup>125</sup>-echistatine a permis de tracer les courbes de saturations en fonction des stimulations. A partir de ces courbes, les Bmax ont été calculés. (N=4 tests/stimulation; \*P<0.05 versus témoin)

<b>Bmax fmol/mg de protéine</b>	<b>Témoin</b>	<b>Angiotensine II (10<sup>-7</sup>M)</b>	<b>PDGF-BB (10 ng/mL)</b>	<b>Thrombine (2 U/mL)</b>
$\alpha_8\beta_1$	600 ± 120	800 ± 100	715 ± 40	2080 ± 520*
$\alpha_v/\alpha_5\beta_1$	510 ± 100	500 ± 90	480 ± 50	815 ± 175*
$\alpha_v\beta_3$	55 ± 10	45 ± 10	40 ± 10	85 ± 12*

### 3.4.1.5 Expression des intégrines de type RGD en fonction d'une réaction concentration-réponse

Étant donné qu'une augmentation de l'expression des intégrines est observée lors d'une stimulation avec l'All et la thrombine, une courbe concentration-réponse de l'expression en parallèle à la prolifération est effectuée avec ces deux facteurs de croissance. La concentration croissante d'All (figure 19a) ne montre aucune augmentation significative de l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$  en dessous de  $10^{-7}$ M. L'expression des autres intégrines n'est pas modifiée en fonction des concentrations croissantes d'All. La synthèse d'ADN ne subit aucune variation significative même à la concentration la plus forte (figure 19b). Pour la concentration croissante de thrombine, une augmentation significative et drastique de l'expression est observée pour toutes les intégrines étudiées (figure 20a). L'expression des intégrines atteint un plateau dès la concentration la plus faible. Cependant, le profil de la synthèse d'ADN montre une augmentation graduelle de la division cellulaire en fonction la concentration croissante de thrombine sans atteindre un plateau (figure 20b).

### 3.4.1.6 Inhibition de la prolifération cellulaire et modification de l'expression des intégrines de type RGD

L'acide rétinoïque (AR) est connu pour ses effets antiprolifératifs sur les VSMC autant *in vivo* (DeRose *et al.*, 1999) qu'*in vitro* (Miano *et al.*, 1996). Afin de vérifier l'implication de l'AR au niveau de l'expression des intégrines, les cellules ont été prétraitées pendant 24 h avec le 9-*cis*-acide rétinoïque ( $2 \times 10^{-6}$ M) puis stimulées par l'All ( $10^{-7}$ M) ou la thrombine (2 U/mL) en présence ou non d'AR. L'isomère 9-*cis* a été utilisé parce qu'il a une demi-vie plus longue et est moins toxique en comparaison à l'isomère all-*trans*. Le test de prolifération cellulaire est effectué en parallèle au test de radioliation. La figure 21b montre une augmentation significative de la prolifération des VSMC aortiques lorsque les

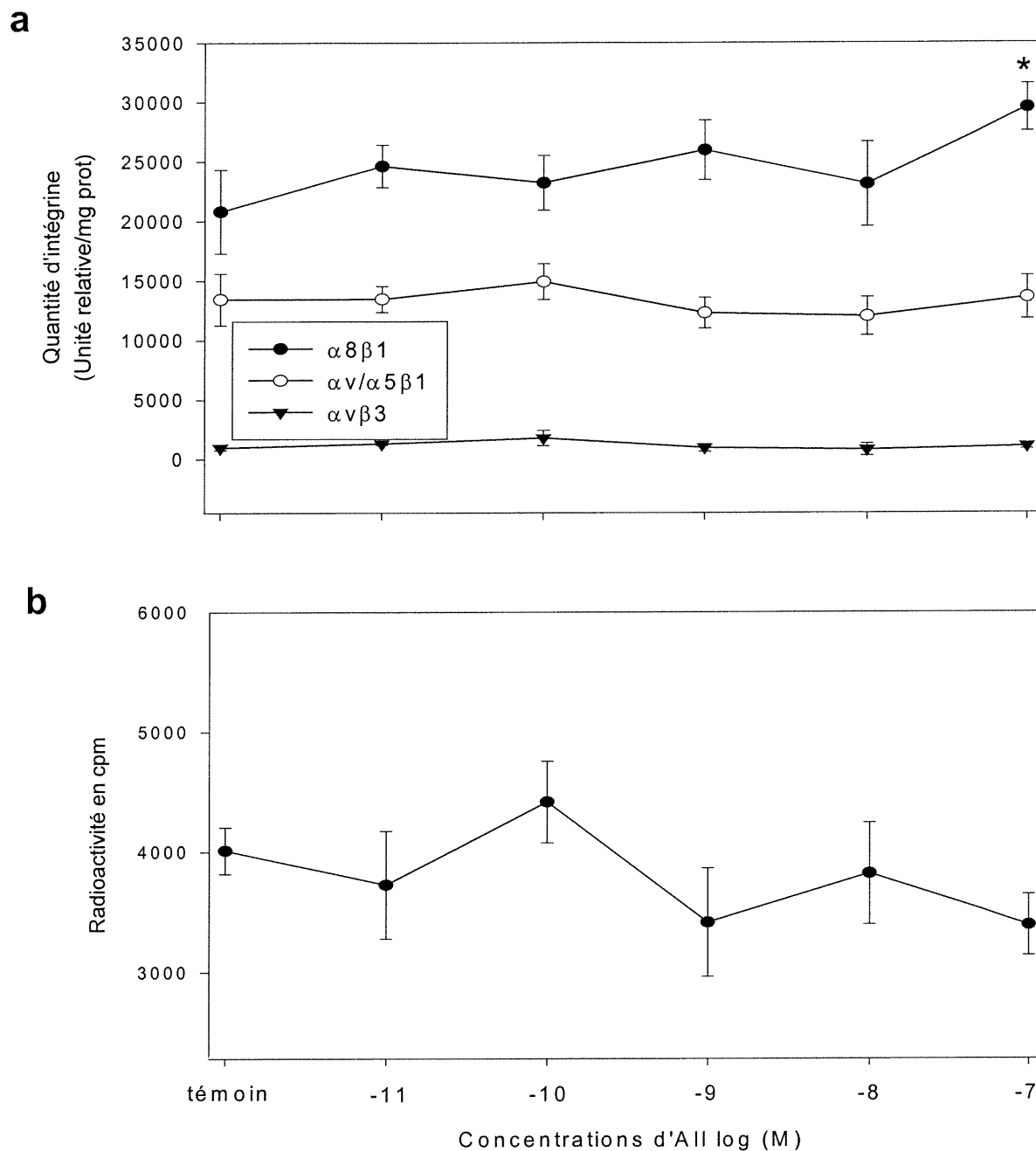


Figure 19. **Expression des intégrines de type RGD et stimulation des VSMC aortiques en fonction de concentrations croissantes d'All.** (a) L'expression des intégrines de type RGD a été vérifiée à l'aide du test de radioliation utilisant 150 000 cpm et 25  $\mu$ g de protéines solubilisées. (b) L'hyperplasie a été observée par l'incorporation de thymidine tritiée 1  $\mu$ Ci/mL. (n =9; \*P<0.05 versus témoin)

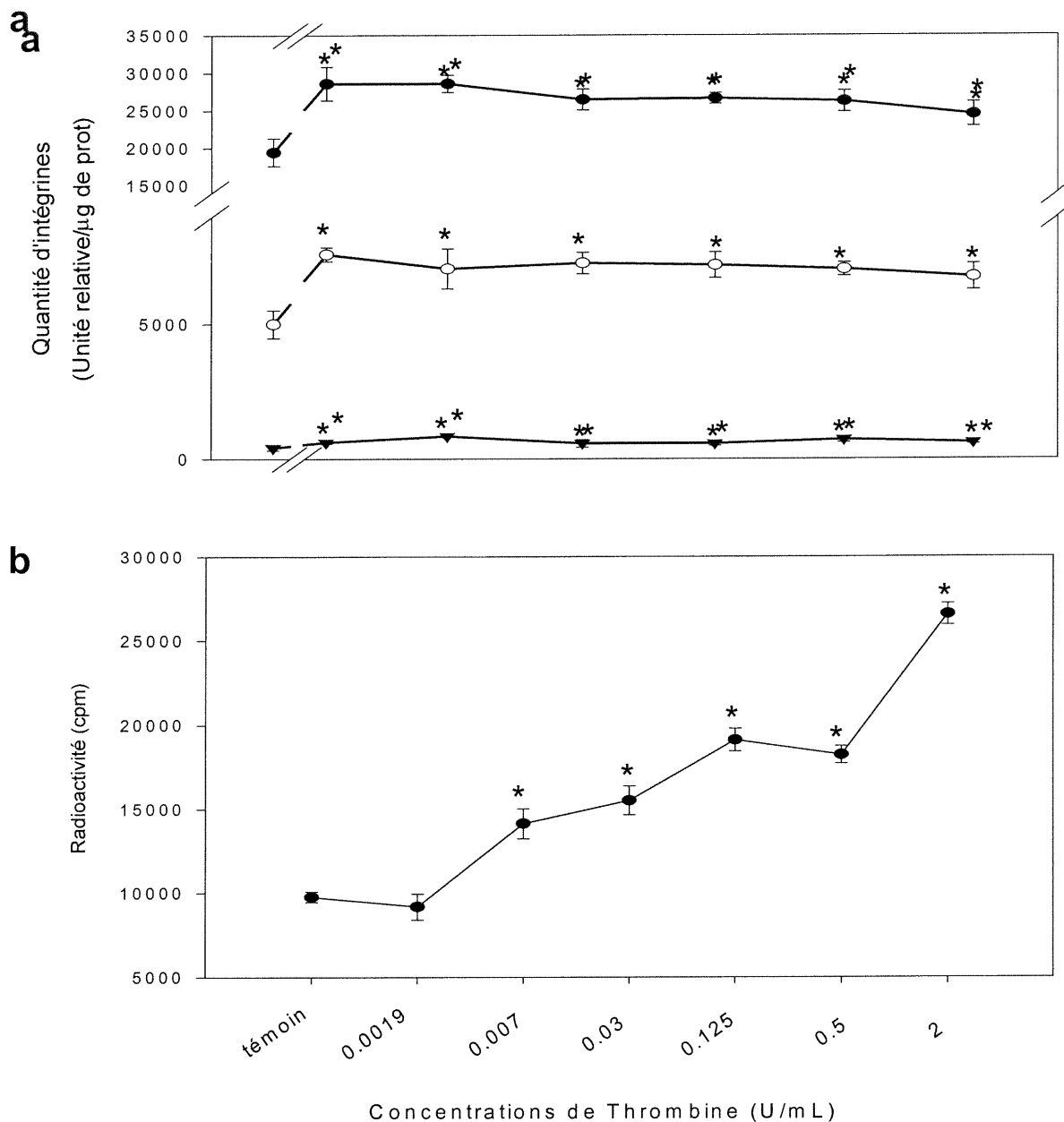


Figure 20. **Expression des intégrines de type RGD et stimulation des VSMC aortiques en fonction de concentrations croissantes de Thrombine.** (a) L'expression des intégrines de type RGD a été vérifiée à l'aide du test de radioliation utilisant 150 000 cpm et 25 µg de protéines solubilisées. (b) L'hyperplasie a été observée par l'incorporation de thymidine tritiée 1 µCi/mL. (N=9; \*P<0.05 versus témoin)

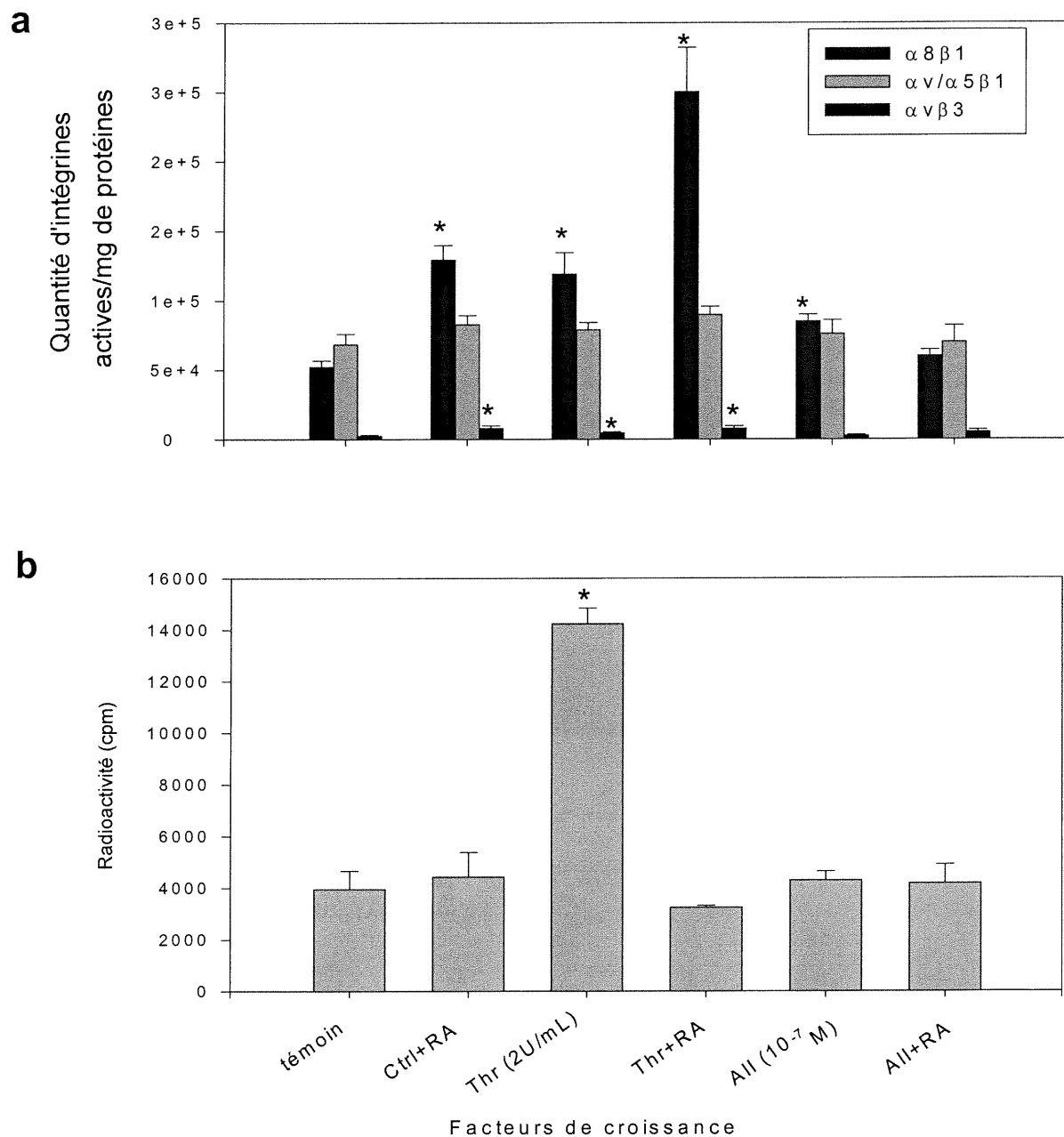


Figure 21. **Expression des intégrines de type RGD et stimulation des VSMC aortiques en présence d'acide rétinoïque (AR).** L'AR ( $2 \times 10^{-6}$  M) a été dilué dans le DMSO 14 mM. (a) L'expression des intégrines de type RGD a été vérifiée à l'aide du test de radiolisation. (b) L'hyperplasie a été observée par l'incorporation de thymidine tritiée 1  $\mu$ Ci/mL. (N=12 puits/stimulation; \*P<0.05 versus témoin)

cellules sont stimulées par la thrombine et aucune différence avec le contrôle lors de la stimulation par l'All. En présence d'acide rétinoïque, ces augmentations reviennent à une prolifération cellulaire basale lorsqu'elles sont comparées aux deux contrôles (sans ou avec l'acide rétinoïque). L'expression des intégrines  $\alpha_8\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  (figure 21a) augmente lorsque les cellules non stimulées (témoin) sont traitées avec l'acide rétinoïque. Lors de la stimulation par la thrombine seule et par la thrombine combinée à l'acide rétinoïque, l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$  et l' $\alpha_v\beta_3$  augmente, cependant l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$  est plus grande lorsque l'acide rétinoïque est présent. Ceci n'a pas été observé pour l' $\alpha_v\beta_3$ . Finalement, l'effet de l'acide rétinoïque sur l' $\alpha_8\beta_1$  est bloqué par un traitement cellulaire à l'All. Il est à noter que l'inhibition drastique de la prolifération cellulaire par le traitement à la thrombine combinée à l'acide rétinoïque ne diminue pas la quantité d' $\alpha_8\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  exprimées dans la culture cellulaire.

### **3.4.2 Étude des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques**

Les études effectuées dans cette partie sont les mêmes que celles de la section 3.4.1 concernant l'étude des intégrines de type RGD des VSMC de l'aorte. Cependant, l'étude avec l'acide rétinoïque n'a pas été effectuée puisque les VSMC mésentériques modifient très peu l'expression de leurs intégrines et répondent faiblement aux stimulations. Après un jeûne de 24 h, les VSMC mésentériques ont été stimulées durant 48 h avec l'All ( $10^{-7}$ M), le PDGF-BB (10 ng/mL), la thrombine (2 U/mL) et le FBS (10 %). Les tests d'indice de prolifération et d'hypertrophie ont été effectués en parallèle à l'expression des intégrines de type RGD identifiées dans le but de vérifier la nature des modifications d'expression des intégrines.



### 3.4.2.1 Stimulation de la synthèse d'ADN

L'augmentation significative de la synthèse d'ADN *de novo* en présence de PDGF-BB est supérieure à celle du FBS (témoin positif) (figure 22a). La thrombine a un effet beaucoup moins prononcé soit une augmentation de 30 % par rapport au contrôle. L'All n'a aucun effet significatif sur la synthèse d'ADN. En ce qui concerne la synthèse d'ADN totale (figure 22b), le profil est différent puisque le FBS a l'effet le plus prononcé alors que le niveau de la synthèse d'ADN en présence de PDGF-BB est relativement le même qu'en présence de thrombine (figure 22b). L'All n'a aucun effet sur cette synthèse.

### 3.4.2.2 Stimulation de la synthèse protéique

Une augmentation significative de la synthèse protéique *de novo* est observée lors de stimulation avec le PDGF-BB et la thrombine (figure 23a). Le PDGF-BB semble avoir un effet plus fort que celui de la thrombine. Au niveau de la quantité de protéine totale (Figure 23b), aucune augmentation significative n'est visible. La stimulation au FBS témoigne du bon fonctionnement du test.

### 3.4.2.3 Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD

À la vue des résultats précédents, c'est à dire que les cellules sont capables d'entrer en phase de synthèse d'ADN ou protéique en présence de facteurs de croissance, les modifications possibles de l'expression des intégrines étudiées sont vérifiées. Suivi du test de radioliation, les complexes radioactifs formés en fonction des stimulations ont été visualisés par autoradiographie (figure 24a). Après la correction des quantifications brutes (Figure 24b), une augmentation significative de l'expression des intégrines  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  lors d'une stimulation par la thrombine (2 U/mL) est observée alors que les autres

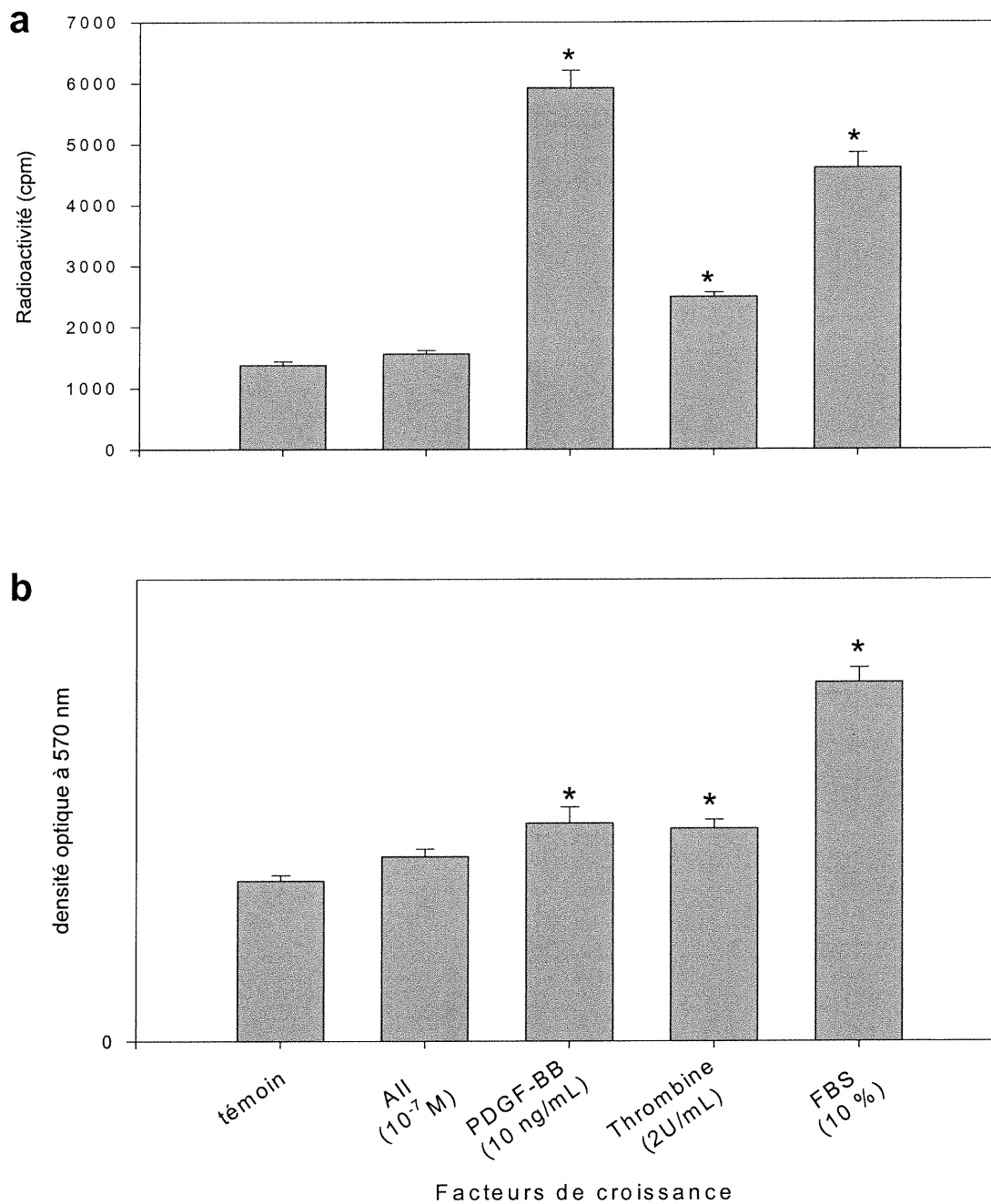


Figure 22. **Stimulation de la synthèse d'ADN chez les VSMC mésentériques.** (a) La prolifération cellulaire a été vérifiée par l'incorporation de thymidine tritiée 1  $\mu$ Ci/mL. (b) l'ADN totale a été mesuré par la coloration au crystal violet. (N =12 puits/stimulation; \*P<0.05 versus témoin)

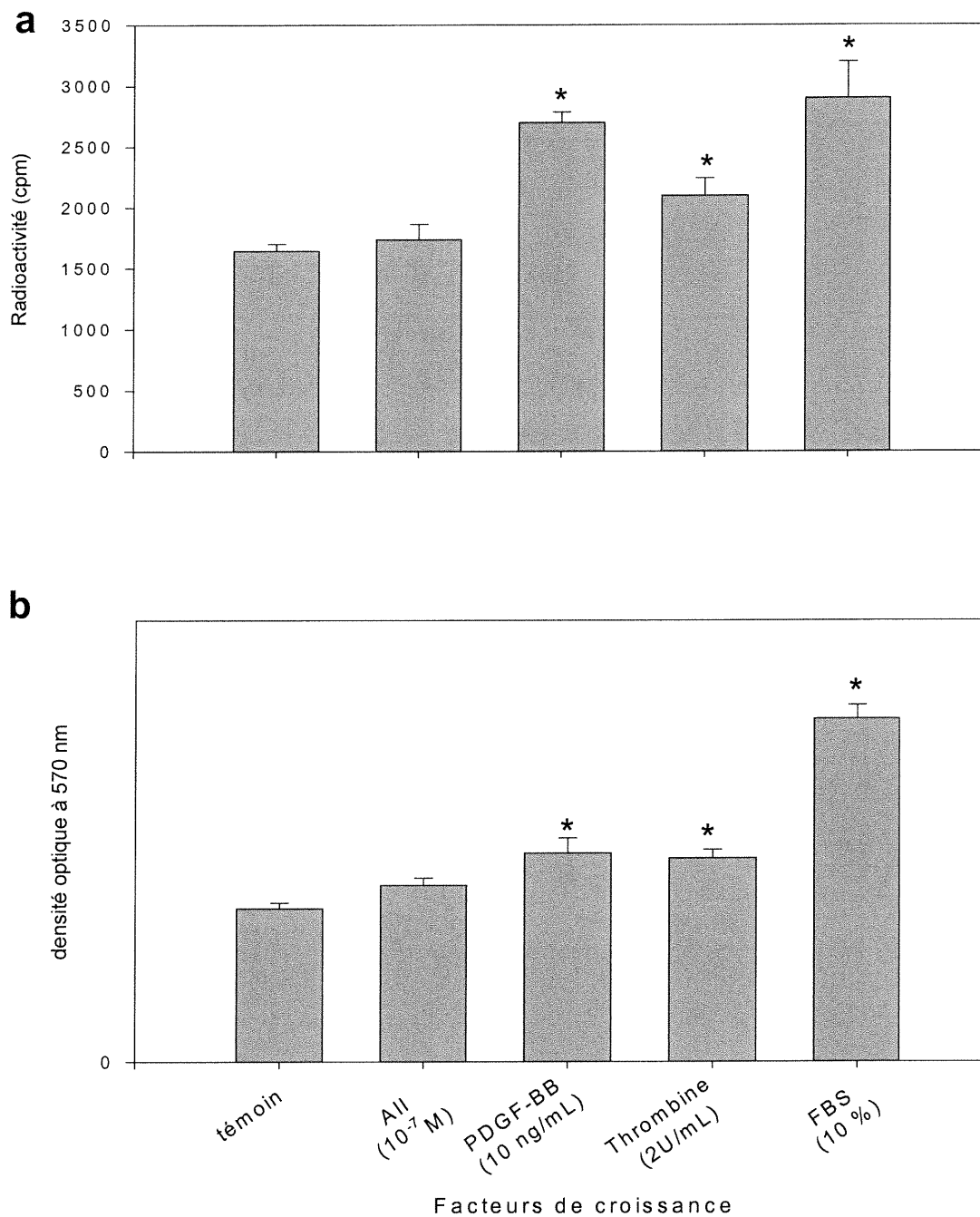


Figure 23. **Stimulation de la synthèse protéique chez les VSMC mésentériques.** (a) L'hypertrophie cellulaire a été vérifiée par l'incorporation de leucine tritiée 2  $\mu$ Ci/mL. (b) La quantité de protéine totale a été mesurée par le dosage de Bradford. (N=12 puits/stimulation; \*P<0.05 versus témoin)

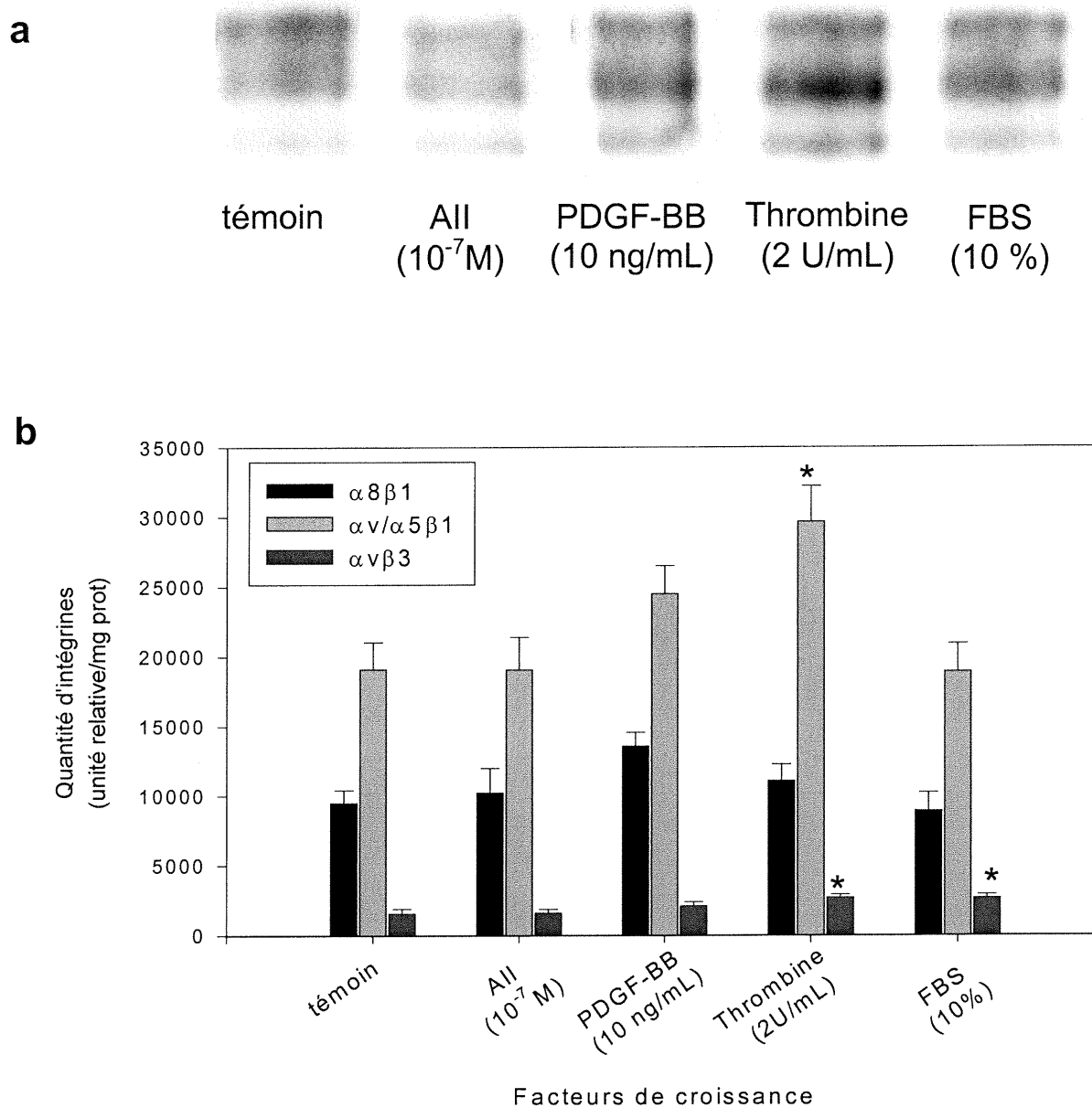


Figure 24. **Stimulation de l'expression des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques.** (a) Les intégrines ont été visualisées par autoradiographie après le test de radioliation avec 150 000 cpm d' $^{125}$ I-échistatine. (b) La quantification par PhosphorImager a été normalisée en unité/mg de protéines. (N=9 puits/stimulation, \*P<0.05 versus témoin)

facteurs ne semblent pas avoir d'effet significatif sur cette expression. L'expression de l' $\alpha_8\beta_1$  n'est modifiée par aucun des facteurs étudiés.

#### **3.4.2.4 Quantité de récepteurs exprimés**

Pour déterminer la quantité d'intégrine de type RGD exprimée, les pKd et les Bmax ont été calculés à partir des courbes de saturation des récepteurs. Lors d'une stimulation des VSMC mésentériques par l'All ( $10^{-7}$ M), les pKd (tableau IV) et les Bmax (tableau V) des intégrines étudiées ne varient pas significativement. La même observation est faite lors de la stimulation par le PDGF-BB (10 ng/mL) où aucune modification de pKd et Bmax n'est observée pour les quatre intégrines. À l'inverse des deux précédents, en présence de thrombine (2 U/mL), le Bmax des intégrines  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  est passé de 60 à 85 fmol/mg de protéine et celui de l' $\alpha_v\beta_3$  de 200 à 315 fmol/mg de protéine alors que les pKd ne varient.

#### **3.4.2.5 Expression des intégrines de type RGD en fonction d'une réaction concentration-réponse**

Étant donné que la thrombine augmente l'expression de l' $\alpha_v\beta_3$  chez les VSMC mésentériques, une courbe concentration-réponse à la thrombine a été tracée en parallèle à la prolifération. Ceci permet de déterminer la concentration minimale à laquelle ce phénomène puisse être observé. L'intégrine  $\alpha_8\beta_1$  ne subit aucune modification de son expression en fonction de la concentration croissante de thrombine (figure 25a). La quantité des intégrines  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  augmente significativement à 0.0019 U/mL de thrombine pour ensuite atteindre un plateau (phénomène observé chez les VSMC aortiques). L'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  augmente graduellement et de façon significative à partir de 0.007 U/mL de thrombine pour atteindre son niveau le plus fort à 2 U/mL de thrombine

Tableau IV. **pKd des intégrines exprimées par les VSMC mésentériques après différentes stimulations.** Les cellules ont été stimulées durant 48 h dans des Pétri de 15 cm et les protéines ont été recueillies. Le test de radiolisation avec les concentrations croissantes d'I<sup>125</sup>-échistatine a permis de tracer les courbes de saturations. A partir de ces courbes, les pKd ont été calculés. n=4 tests/stimulation.

<b>pKd</b>	<b>Témoin</b>	<b>Angiotensine II (10<sup>-7</sup>mol/L)</b>	<b>PDGF-BB (10 ng/mL)</b>	<b>Thrombine (2 U/mL)</b>
$\alpha_8\beta_1$	8.97 ± 0.02	9.04 ± 0.03	8.91 ± 0.04	8.94 ± 0.01
$\alpha_v/\alpha_5\beta_1$	8.46 ± 0.05	8.40 ± 0.02	8.46 ± 0.03	8.40 ± 0.01
$\alpha_v\beta_3$	8.43 ± 0.05	8.46 ± 0.03	8.37 ± 0.05	8.41 ± 0.01

Tableau V. **Bmax des intégrines exprimées par les VSMC mésentériques après différentes stimulations.** Les cellules ont été stimulées durant 48 h dans des Pétri de 15 cm et les protéines ont été recueillies. Le test de radiolisation avec les concentrations croissantes d'I<sup>125</sup>-échistatine a permis de tracer les courbes de saturations. A partir de ces courbes, les Bmax ont été calculés. n=4 tests/stimulation. \*P<0.0001 versus témoin.

<b>Bmax fmol/mg de protéine</b>	<b>Témoin</b>	<b>Angiotensine II (10<sup>-7</sup>M)</b>	<b>PDGF-BB (10 ng/mL)</b>	<b>Thrombine (2 U/mL)</b>
$\alpha_8\beta_1$	150 ± 10.0	155 ± 1.2	160 ± 10	170 ± 10
$\alpha_v\beta_1$ $\alpha_5\beta_1$	60 ± 1.0	60 ± 1.0	55 ± 10	85 ± 10
$\alpha_v\beta_3$	200 ± 5.0	180 ± 15	230 ± 50	315 ± 10*

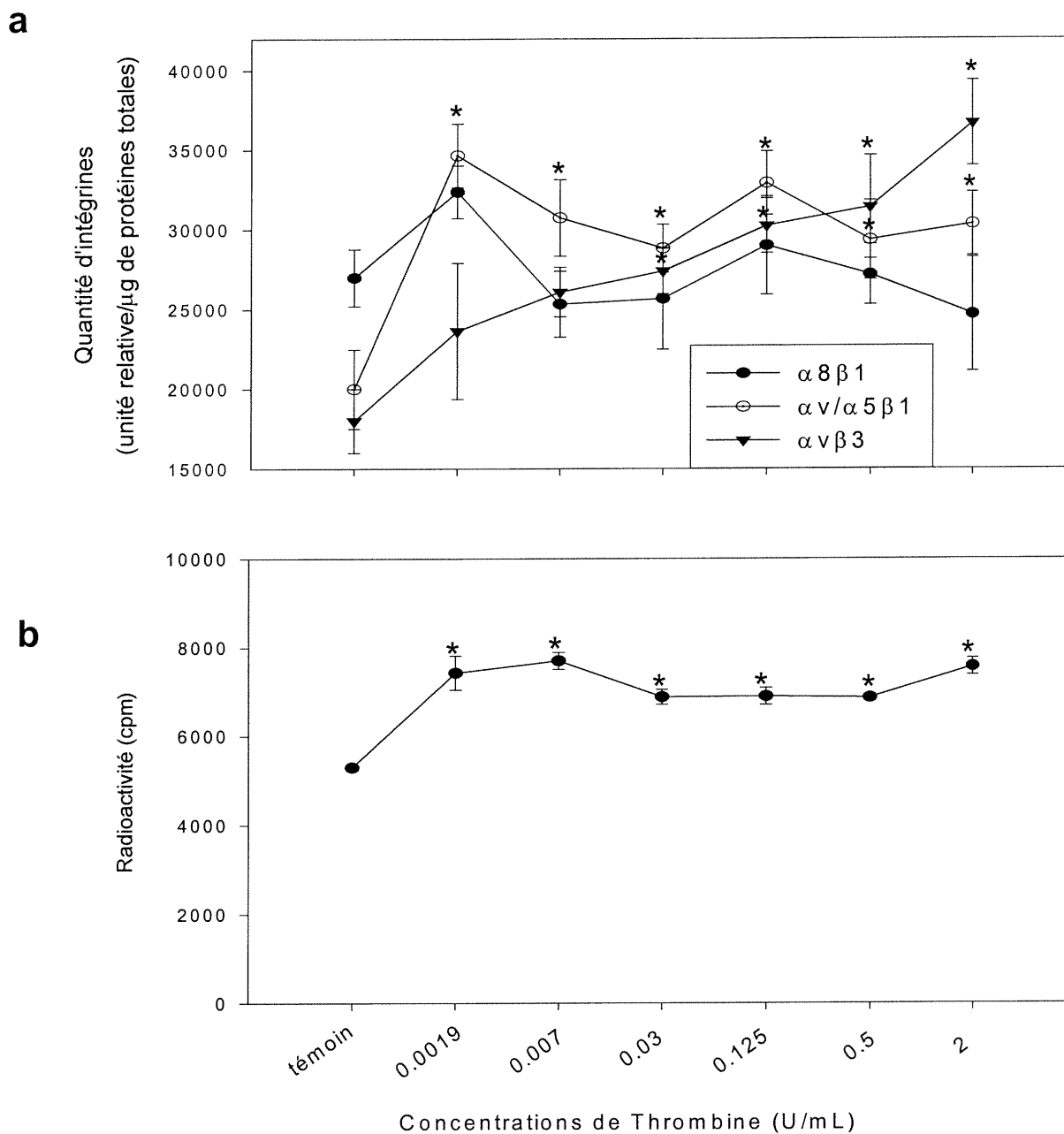


Figure 25. **Expression des intégrines de type RGD et stimulation des VSMC mésentériques en fonction de concentrations croissantes de Thrombine.** (a) L'expression des intégrines de type RGD a été vérifiée à l'aide du test de radioliation. (b) L'hyperplasie a été observée par l'incorporation de thymidine tritiée 1  $\mu$ Ci/mL. (N=9; \*P<0.05 versus témoin)

(concentration maximale étudiée dans ce rapport) (figure 25a). La prolifération augmente de façon significative dès la concentration la plus faible pour avoir très peu de variation par la suite (figure 25b).

### **3.5 Localisation des intégrines de type RGD aux foyers d'adhésion**

Plusieurs auteurs ont démontré que les intégrines de type RGD pouvaient intervenir dans le cycle cellulaire lorsqu'elles étaient retrouvées aux foyers d'adhésion de certains types cellulaires (Meredith *et al*, 1996; Yamada *et al*, 1995). Afin de déterminer la présence des intégrines des VSMC étudiées aux foyers d'adhésion, la colocalisation des intégrines avec la vinculine (marqueur de foyers d'adhésion) a été effectuée.

#### **3.5.1 Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC aortiques aux foyers d'adhésion**

La vinculine apparaît en agrégats à l'extrémité de la membrane plasmique particulièrement au contact de la cellule avec le support. Au contraire, la localisation des intégrines par immunocytochimie révèle une présence abondante sur toute la membrane plasmique mais également en agrégats aux extrémités de la membrane. Les flèches blanches sont localisées au même endroit que ce soit pour les intégrines ou la vinculine. Par conséquent, la colocalisation des intégrines des VSMC aortiques avec la vinculine indique que les sous-unités d'intégrines  $\alpha_8$ ,  $\alpha_v$ ,  $\alpha_5$ ,  $\beta_1$  et  $\beta_3$  (figures 26 et 27) sont dispersées de manière diffuse au niveau de la membrane cellulaire mais sont aussi retrouvées aux foyers d'adhésion (flèches) représentés par la vinculine. Ceci suggère qu'elles puissent être impliquées dans la formation de foyers d'adhésion lorsqu'elles sont en dimères.



### **3.5.2 Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques aux foyers d'adhésion**

L'analyse effectuée par l'immunolocalisation des intégrines des VSMC mésentériques aux foyers d'adhésion est interprétée de la même façon que celle des VSMC aortiques. L'immunocytochimie effectuée sur les VSMC mésentériques montre que les intégrines  $\alpha_8$ ,  $\alpha_v$ ,  $\alpha_5$  et  $\beta_1$  sont localisées aux foyers d'adhésion (figures 28 et 29). Aucune colocalisation avec la vinculine ne peut être observée pour la sous-unité  $\beta_3$ . Ceci pourrait provenir du faible niveau d'expression de cette intégrine. A l'exception de  $\beta_3$ , les sous-unités étudiées des VSMC mésentériques peuvent être impliquées dans la formation de foyers d'adhésion.

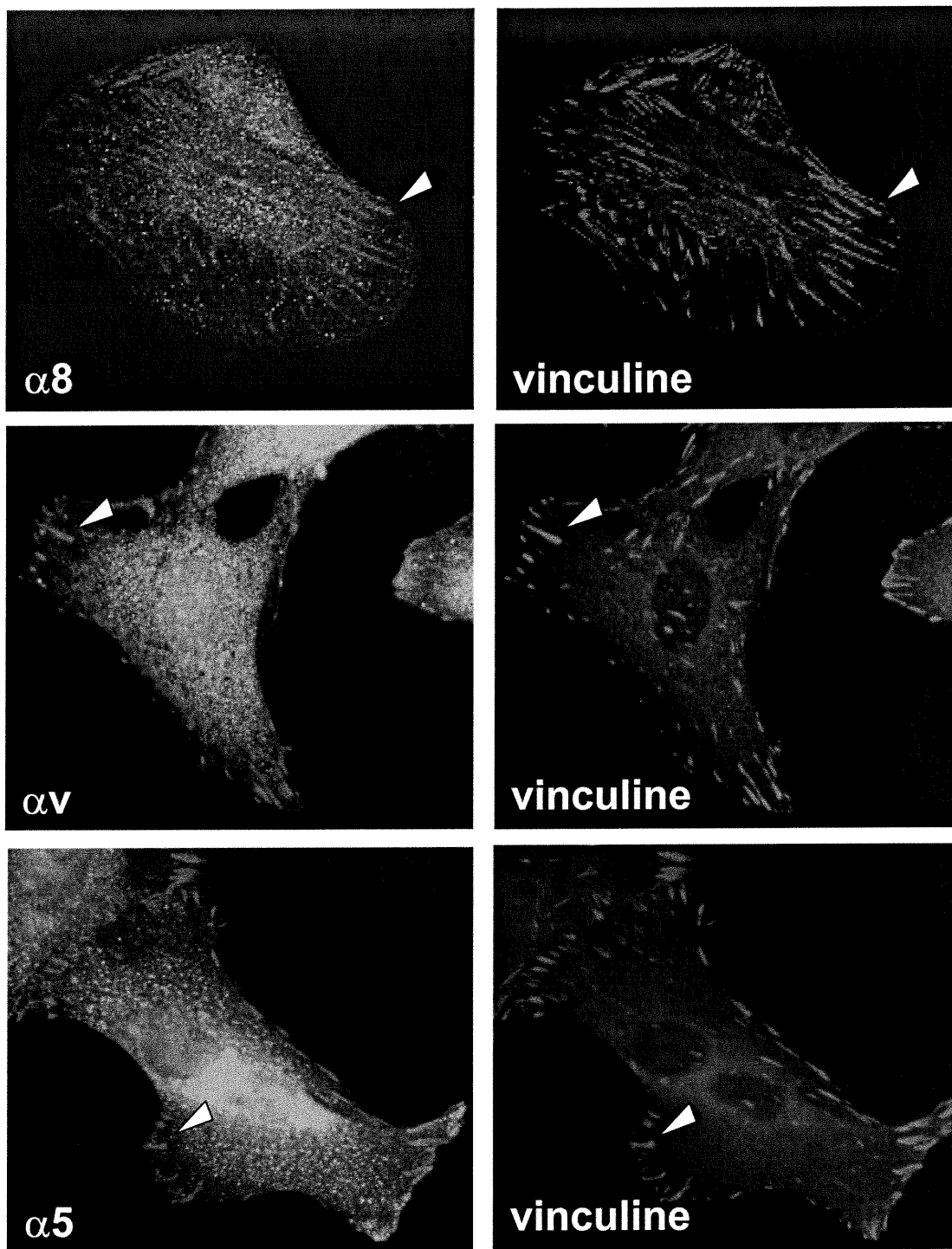


Figure 26. Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC aortiques aux foyers d'adhésion. L'immunolocalisation des intégrines aux foyers d'adhésion a été effectuée par un double marquage des intégrines avec la vinculine (marqueur des foyers d'adhésion). Grossissement 1100X, les flèches représentent les foyers d'adhésion.

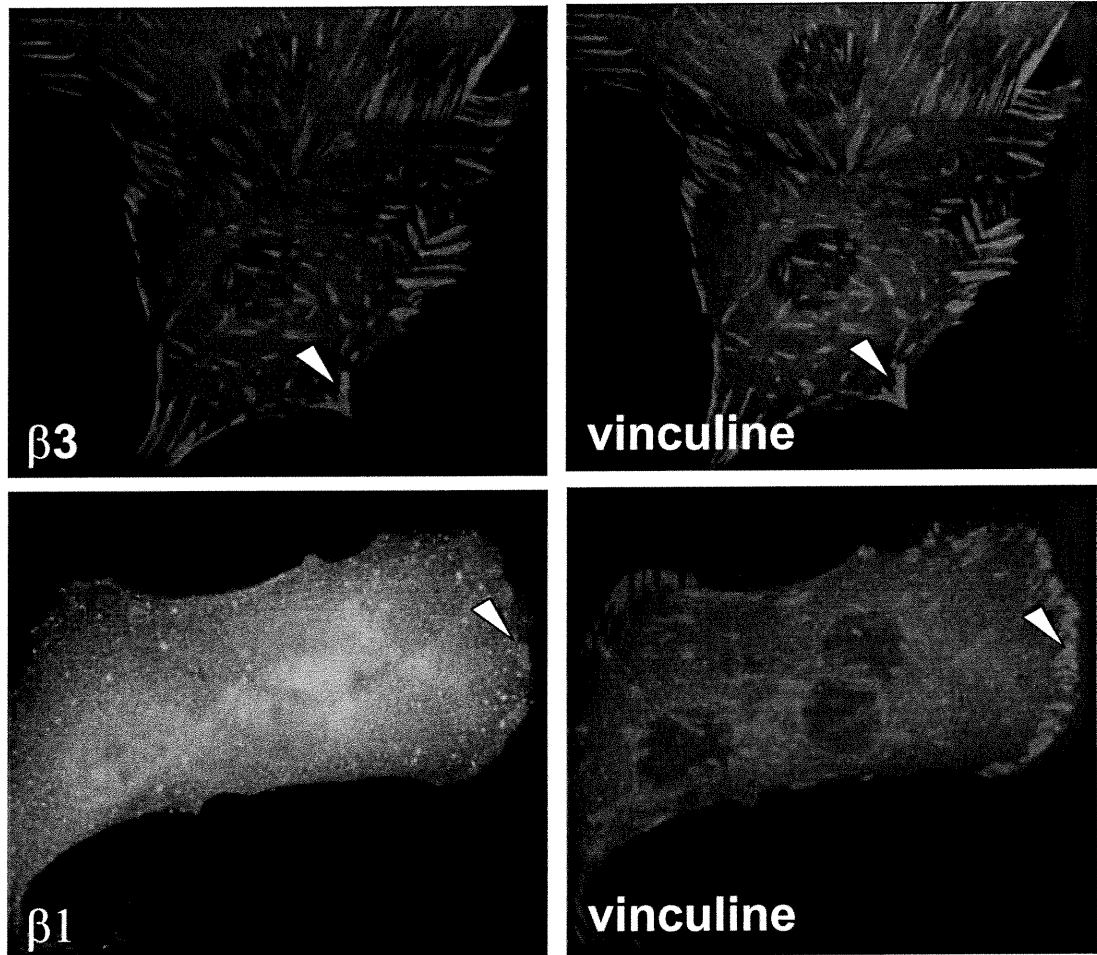


Figure 27. Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC aortiques aux foyers d'adhésion (suite). L'immunolocalisation des intégrines aux foyers d'adhésion a été effectuée par un double marquage des intégrines avec la vinculine (marqueur des foyers d'adhésion). Grossissement 1100X, les flèches représentent les foyers d'adhésion.

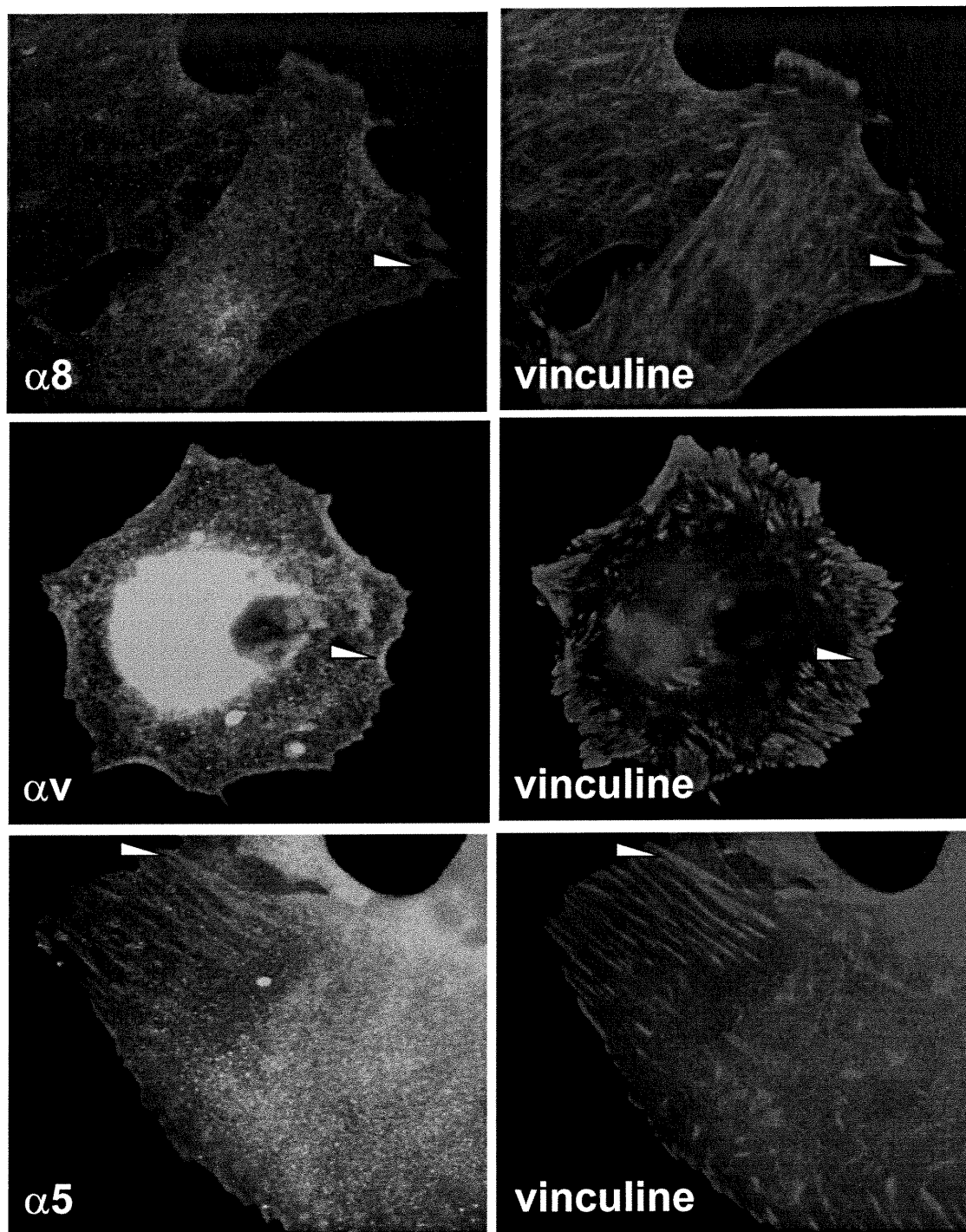


Figure 28. Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques aux foyers d'adhésion. L'immunolocalisation des intégrines aux foyers d'adhésion a été effectuée par un double marquage des intégrines avec la vinculine (marqueur des foyers d'adhésion). Grossissement 1100X les flèches représentent les foyers d'adhésion.

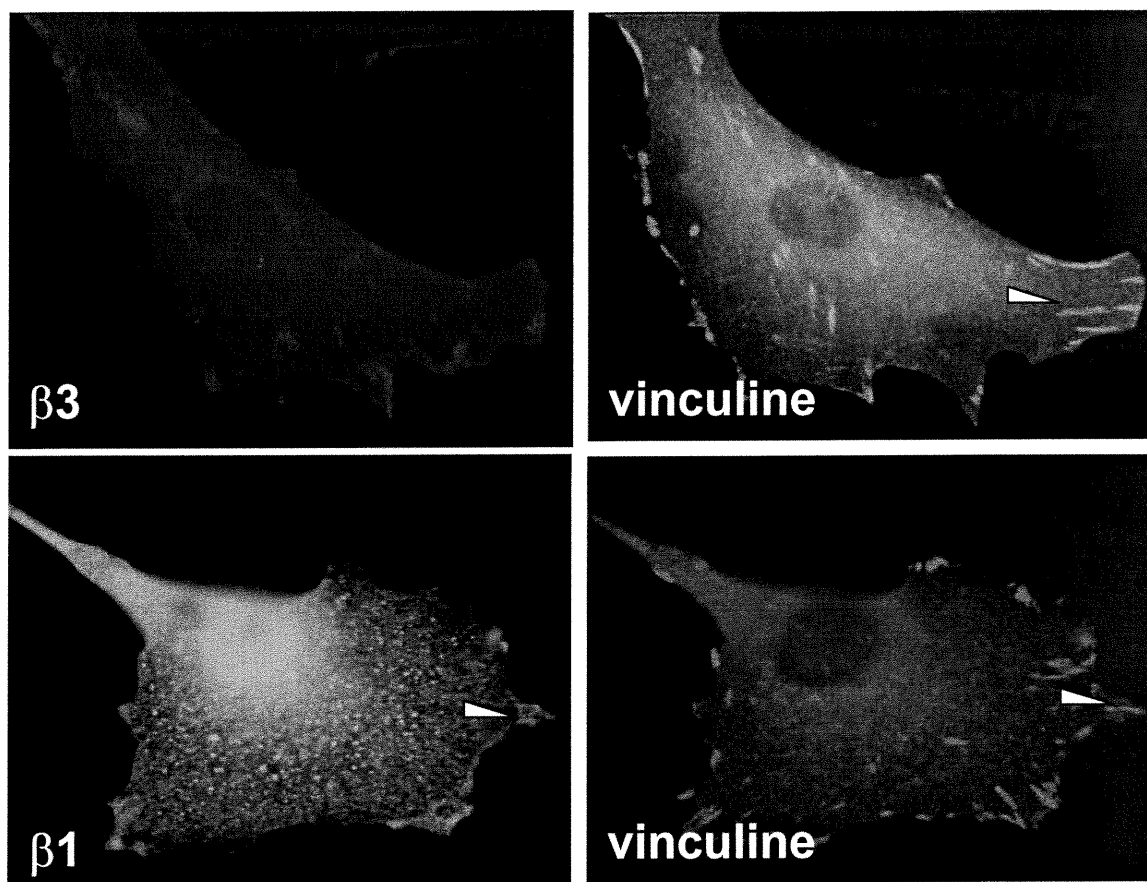


Figure 29. Immunolocalisation des intégrines de type RGD des VSMC mésentériques aux foyers d'adhésion (suite). L'immunolocalisation des intégrines aux foyers d'adhésion a été effectuée par un double marquage des intégrines avec la vinculine (marqueur des foyers d'adhésion). Grossissement 1100X, les flèches représentent les foyers d'adhésion.

## CHAPITRE 4. DISCUSSION

### 4.1 Expression des intégrines de type RGD

Les contacts entre les cellules et les composants de la matrice extracellulaire jouent un rôle crucial dans le développement, la croissance tissulaire anormale et la progression tumorale. Ces interactions sont permises grâce aux intégrines, récepteurs d'adhésion exprimés par toutes les cellules de mammifères (Hynes, 1992). Les intégrines de type RGD sont associées à certaines pathologies vasculaires de par leurs interactions avec la fibronectine, ligand naturel contenant le motif RGD et impliqué dans le remodelage vasculaire (Koyama *et al.*, 2000; Bottger *et al.*, 1989). Ces récepteurs sont d'un grand intérêt en ce qui a trait à la compréhension du mécanisme de remodelage vasculaire impliquant les VSMC. Cependant leur étude *in vitro* ne peut donner qu'un indice de ce qui se déroule *in vivo*.

Comme il a été démontré par Thibault (2000), l'échistatine utilisée comme sonde radioactive lie fortement les intégrines de type RGD sans les distinguer entre elles. En effectuant une analyse de type Western simultanément au test de radioliation, il est possible de discriminer les hétérodimères exprimés. Ce double test effectué, il devient facile d'observer les modifications de l'expression des intégrines lorsque les cellules sont stimulées. De plus, l'affinité de l'intégrine pour le ligand naturel est plus grande lorsque le récepteur est sous sa forme active (Pelletier *et al.*, 1996). Si tel est le cas pour l'échistatine, le test est d'autant plus précis, permettant de séparer les récepteurs liant des récepteurs inactifs. Dans le cas de certains types cellulaires, l' $\alpha_5\beta_1$  et l' $\alpha_v\beta_3$  sont exprimés constitutivement de façon active (Ruoslahti, 1991; Legler *et al.*, 2001) et l'avidité de l'échistatine est similaire pour ces deux intégrines (Pfaff *et al.*, 1994). Onze des 22 intégrines sont exprimées par les VSMC:  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_3\beta_1$ ,  $\alpha_4\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_7\beta_1$ ,  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_9\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_6\beta_4$  (Davis *et al.*, 2001). Pour la première fois, nous avons identifié à l'aide de cette technique trois formes d'expression d'intégrines de type RGD exprimées par

les VSMC:  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ . et la f2 composée de deux types d'intégrines  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  ne pouvant être discriminées par la technique utilisée. L'expression de ces intégrines a déjà été démontré par plusieurs auteurs ayant étudiés les sous-unités séparément mais aucun n'a utilisé de sonde radioactive pour détecter l'hétérodimère (Liaw *et al.*, 1994; Schnapp *et al.*, 1995; Hynes, 1992).

Nos résultats montrent que la f1 identifiée comme l'intégrine  $\alpha_8\beta_1$  des VSMC aortiques et la f3 correspondant à l' $\alpha_v\beta_3$  des VSMC mésentériques sont perdues avec le vieillissement de la culture cellulaire. En général, le phénotype prédominant d'une culture cellulaire primaire peut changer. Les cellules avec une haute capacité de prolifération prennent le dessus sur les cellules se divisant plus lentement, c'est la croissance sélective (Freshney, 1994). Le changement de phénotype témoigne de l'importance de certaines intégrines durant la croissance cellulaire. L' $\alpha_8\beta_1$  a pour fonction l'adhésion et l'étalement cellulaire alors que l' $\alpha_v\beta_3$  est importante pour la migration de la VSMC (Müller *et al.*, 1995; Nip *et al.*, 1995). Il ressort de nos résultats qu'à partir du passage cellulaire 5 les VSMC aortiques peuvent montrer une atténuation de la capacité de s'étaler alors que les VSMC mésentériques du même passage pourraient être caractérisées par une altération de la migration. Cela démontre que ces deux types cellulaires répondent différemment aux conditions environnementales.

À ce stade de l'étude, la raison de cette perte de signal radioactif en fonction des passages peut être causée soit par une diminution de l'activité des intégrines soit par l'inhibition de l'expression des gènes. Nous ne voulions pas d'une étude portant sur des cellules dont le phénotype était différent de celui de la cellule mère. Pour cette raison, le passage 3 des VSMC en culture exprimant les quatre intégrines a servi de modèle dans l'étude *in vitro* des intégrines de type RGD.

#### **4.2 Modulation de l'expression des intégrines de type RGD**

Dans cette étude, nous démontrons une modification de l'expression des intégrines de type RGD lors de stimulations à l'angiotensine II et la thrombine sur

des VSMC aortiques ainsi que par la thrombine seulement sur des VSMC mésentériques. Le PDGF-BB ne semble avoir des effets que sur la croissance cellulaire et non sur l'expression des intégrines. Selon nos connaissances, la modulation des hétérodimères  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  par ces facteurs n'a jamais été mise en valeur auparavant. Plusieurs auteurs ont étudié les sous-unités de certaines intégrines en fonction de ces facteurs de croissance et non pas le récepteur intégral. De plus, l'expression des intégrines par les VSMC mésentériques n'a jamais été approfondie.

Dans notre recherche nous avons d'abord vérifié la production de fibronectine par les VSMC. Nos résultats montrent que l'All, le PDGF-BB et la thrombine stimulent la sécrétion de fibronectine par les VSMC aortiques. Contrairement au PDGF-BB et à la thrombine, l'All n'a pas d'effets sur la sécrétion de fibronectine par les VSMC mésentériques. Les VSMC en culture produisent une variété de composants de l'ECM dont la fibronectine et expriment les intégrines servant à leur liaison (Carey, 1991; Owens, 1995). La modification de la composition de l'ECM est souvent associée au remodelage vasculaire. L'altération de la sécrétion de fibronectine par les VSMC stimulées *in vitro* donne un indice de l'implication de ces facteurs de croissance dans la restructuration des vaisseaux et dans la migration et l'adhésion cellulaire. Ces observations suggèrent une implication des trois agents dans le remodelage vasculaire. Ils stimulent la croissance des VSMC par différentes voies métaboliques via leur récepteur respectif.

L'angiotensine II, effecteur dominant du système rénine-angiotensine, joue un rôle important dans plusieurs maladies cardio-vasculaires associées à la croissance des VSMC et à l'inflammation de la paroi vasculaire (Bradford *et al.*, 1997). L'angiotensine II provient du clivage de l'angiotensine I par l'enzyme convertase de l'angiotensine (ACE) et lie les récepteurs AT<sub>1</sub> et AT<sub>2</sub> avec une forte affinité (Murphy *et al.*, 1991; Sasaki *et al.*, 1991). La plupart des effets de l'angiotensine II proviennent du récepteur AT<sub>1</sub> (Kappert *et al.*, 1999). Ce dernier contient 7 domaines transmembranaires, aucune activité tyrosine kinase et lie les protéines G (Berk *et al.*, 1997). La phosphorylation des sérines du récepteur AT<sub>1</sub> par les kinases couplées aux protéines G (GRK) est primordiale à l'activation des



voies de signalisation. L'AT<sub>1</sub> exprimé par les VSMC active plusieurs tyrosine kinases impliquées dans l'activation de la phospholipase C (PLC), de la protéine kinase C (PKC), des MAPK 42 et 44 kDa, de la phospholipase A<sub>2</sub>, de l'oxydase NAD(P)H, stimule la voie JAK/STAT, la mobilisation de calcium et active les oncogènes *c-fos*, *c-myc* et *c-jun* (Schlondorff *et al.*, 1987; Griendling *et al.*, 1994; Marrero *et al.*, 1995; Taubman *et al.*, 1989). *In vitro*, l'angiotensine II induit l'expression de différents gènes précoces ayant des effets sur les fonctions cellulaires (Berk *et al.*, 1997). De plus, l'angiotensine II stimule la synthèse protéique et entraîne l'expression de transcrits de plusieurs protéines de l'ECM sans toutefois entraîner l'hyperplasie comme en témoignent notre recherche sur les VSMC ainsi que plusieurs autres études (Holycross *et al.*, 1993; Geisterfer *et al.*, 1988; Hahn *et al.*, 1993). L'angiotensine II ne semble pas avoir d'effet sur la synthèse protéique des VSMC mésentériques mais stimule la prolifération cellulaire, ce qui concorde avec la littérature (Su *et al.*, 1998).

Le PDGF est un facteur de croissance impliqué à la fois dans le développement normal de tissu et dans certaines maladies caractérisées par une prolifération cellulaire excessive telle que l'athérosclérose (Heldin *et al.*, 1992). Il est produit par plusieurs types cellulaires et peut stimuler la cellule de manière autocrine ou paracrine (Heldin *et al.*, 1990). Il existe trois isoformes du PDGF: AA, BB et AB, chacune ayant des affinités différentes pour les deux récepteurs tyrosine kinases PDGFalpha (PDGFR- $\alpha$ ) et PDGFb $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) (Heldin *et al.*, 1988; Hart *et al.*, 1988). La liaison du ligand induit la dimérisation du récepteur ainsi que l'activation de son domaine tyrosine kinase. Plusieurs événements sont observés suite à cette activation: le transport d'acides aminés, l'activation de la PLC, la production de glucose, la phosphorylation du proto-oncogène *c-raf*, l'induction de *c-fos*, *c-jun*, *c-myc*, *c-myb* et la formation d'inositol triphosphate (PI-3) et de diacylglycérol (Ullrich *et al.*, 1990; Casscells, 1991). Par la suite, la synthèse d'ADN et la mitose sont observées ainsi que la stimulation de la migration et la sécrétion des composants de l'ECM (Ferns *et al.*, 1990; Thyberg *et al.*, 1991). L'hyperplasie et la sécrétion de fibronectine concordent avec nos résultats observés chez les VSMC aortiques et mésentériques stimulés par le

PDGF-BB. L'hypertrophie est également observée dans les deux types cellulaires. Les VSMC en culture expriment abondamment les PDGFR- $\beta$  à l'inverse des PDGFR- $\alpha$  (Thyberg, 1992), ce qui explique l'utilisation du PDGF-BB dans notre recherche plutôt que des deux autres isoformes.

La thrombine, puissant stimulateur des plaquettes sanguines, des VSMC et de l'endothélium vasculaire, joue un rôle majeur dans les lésions vasculaires et la formation hyperplasique de l'intima (Furie *et al.*, 1988; Cucina *et al.*, 1999). La thrombine, sous sa forme enzymatique active ( $\alpha$ -thrombine), est formée par le clivage hydrolytique de son précurseur circulant, la prothrombine (Hemker *et al.*, 1991). L' $\alpha$ -thrombine est une sérine protéase clivant ses protéines cibles du côté C-terminal des résidus arginine (Stubbs *et al.*, 1993). Elle stimule la prolifération des VSMC via le récepteur de la famille des protéines G activé par les protéases (PAR-1) possédant 7 domaines transmembranaires. La thrombine active PAR-1 en clivant l'exodomaine N-terminal du récepteur pour libérer une nouvelle séquence: SNFLLRN (Vu *et al.*, 1991). Cette séquence sert de ligand et lie le corps intramoléculaire de PAR-1 pour effectuer la signalisation transmembranaire (Vu *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1994). L' $\alpha$ -thrombine induit, chez les VSMC aortiques en culture, une acidification, l'activation de PLC, une élévation de calcium intracellulaire, une diminution de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), la formation de PI-3, l'activation des MAPK et de la voie JAK/STAT (Berk *et al.*, 1991; Bydlowski *et al.*, 1998; Madamanchi *et al.*, 2001). Suite à l'activation de la signalisation par l' $\alpha$ -thrombine, la transcription des gènes *c-fos* et *c-myc* est induite et les synthèses d'ADN et de protéines de la matrice sont observées (Kanthou *et al.*, 1992; Goldsack *et al.*, 1998). Nos résultats concordent avec ces observations.

Nos données indiquent que l'expression de l'intégrine  $\alpha_8\beta_1$  est augmentée lorsque les VSMC aortiques sont stimulées par l'angiotensine II et la thrombine. C'est également l'intégrine la plus abondante dans les cellules à l'étude. L' $\alpha_8\beta_1$  caractérisée pour la première fois dans l'embryon de poulet (Bossy *et al.*, 1991) a été également identifiée sur les VSMC humaines et sur les cellules mésangiales glomérulaires de rats (Müller *et al.*, 1995; Hartner *et al.*, 1999). La fibronectine, la

vitronectine, la ténascine C, l'ostéopontine et la néphronectine sont les ligands de cette intégrine, dont l'adhésion, l'étalement cellulaire et la croissance neuronales sont ses principales fonctions (Müller *et al.*, 1995; Brandenberger *et al.*, 2001). L' $\alpha_8$  est impliquée dans la régulation de la croissance axonale et dendritique des neurones en développement (Einheber *et al.*, 1996).

Nos résultats montrent que la constante de dissociation (pKd) de l' $\alpha_8\beta_1$  ne varie pas en présence des facteurs à l'étude. Ceci suggère que l'affinité de l'intégrine pour son ligand n'est pas modifiée. Le Bmax, correspondant à la quantité maximale de récepteurs exprimés, augmente significativement avec la thrombine et l'angiotensine II alors que le pKd n'est pas modifié. Ces observations confirment que la thrombine et l'angiotensine II augmentent l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$  sans toutefois modifier l'affinité de l'intégrine pour son ligand. Ainsi, ces deux facteurs de croissance interviennent au niveau de l'expression des gènes  $\alpha_8$  et  $\beta_1$ . La région régulatrice de la sous-unité  $\alpha_8$  n'a pas été caractérisée, cependant les sites régulateurs communs de liaison des facteurs de transcription des gènes de la sous-unité  $\alpha$  lient ets et Sp1 (Kim *et al.*, 1997). Les régions promotrices de la sous-unité  $\beta_1$  ont des sites de liaison pour les facteurs de transcription Sp1, NF-1, AP-1 et oct (Cervella *et al.*, 1993). Par conséquent, l'angiotensine II et la thrombine activent ces facteurs de transcription, stimulent la transcription des gènes des deux sous-unités, l'ARNm est traduit et les deux sous-unités subissent la voie de maturation des glycoprotéines de la membrane plasmique. Il est à noter que l'angiotensine II stimule la production d'endothéline-I et la thrombine entraîne la sécrétion de bFGF et de PDGF-AA par les VSMC (Hahn *et al.*, 1990; Weiss *et al.*, 1993; Nakano *et al.*, 1993). Ces facteurs secondaires peuvent agir sur les VSMC par la voie autocrine ou paracrine et activent la mitose (Casscells, 1991). Il est possible que l'angiotensine II module indirectement l'expression des intégrines en utilisant l'endothéline-I comme intermédiaire. L' $\alpha$ -thrombine 0.7 U/mL clive tous les récepteurs disponibles (Ishii *et al.*, 1993) puis le bFGF induit l'expression des récepteurs de thrombine, ce qui amplifie le signal initial (Zhong *et al.*, 1992). Nos données montrent une augmentation graduelle de la synthèse d'ADN en fonction d'une concentration croissante de thrombine dépassant la concentration de

saturation des récepteurs de l' $\alpha$ -thrombine. Ceci suggère que le bFGF est impliqué dans la prolifération cellulaire. Cependant, l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$  atteint rapidement un plateau à la concentration la plus basse de thrombine suggérant l'implication directe de l' $\alpha$ -thrombine dans la régulation de l'intégrine.

Nos résultats montrent également l'inhibition de l'effet mitogène de l' $\alpha$ -thrombine et l'augmentation de l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$  lors d'un traitement à l'acide rétinoïque. Ce même traitement inhibe l'effet de l'angiotensine II sur l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$ . Les rétinoïdes suppriment la prolifération cellulaire via l'inhibition de l'activation d'AP-1 par la sous-régulation de *c-fos* et l'interruption de la dimérisation de *c-fos/c-jun* (Simonson *et al.*, 1994; Schule *et al.*, 1991). Le mécanisme d'action des rétinoïdes sur les intégrines n'est pas connu. La présence ou non de sites de liaison des rétinoïdes couplés aux récepteurs nucléaires dans les promoteurs ne semble pas être un facteur prédominant (Kim *et al.*, 1997). Les rétinoïdes entraînent l'apparition d'un phénotype plus différencié soit un phénotype contractile (Drab *et al.*, 1997). Nous observons une augmentation de l' $\alpha_8\beta_1$  en présence d'acide rétinoïque seul, ce qui suggère que l'expression de cette intégrine est favorisée chez une VSMC tendant vers le phénotype contractile. Selon les observations faites en présence de thrombine et d'acide rétinoïque, il semble que l' $\alpha_8\beta_1$  soit exprimée abondamment par une VSMC différenciée et faiblement par une VSMC indifférenciée. Par ailleurs, Schnapp *et al.* (1995) ont suggéré que l' $\alpha_8$  était impliquée dans les interactions des cellules contractiles avec leur environnement pour réguler la fonction de contraction. Ceci confirme que l' $\alpha_8\beta_1$  peut agir comme un marqueur du phénotype contractile des VSMC de l'aorte.

Cette étude montre également une stimulation de la sécrétion de fibronectine par la thrombine et l'angiotensine II. La fibronectine active la formation de foyers d'adhésion. Ce sont par ces regroupements d'intégrines que FAK est activée, entraînant une signalisation intracellulaire. Schaller *et al.* (1994) ont démontré que le domaine cytoplasmique de la sous-unité  $\beta_1$  est généralement lié à FAK. De plus, il n'a jamais été démontré que l' $\alpha_8\beta_1$  exprimée par les VSMC pouvait être localisée aux foyers d'adhésion. Par conséquent, si l' $\alpha_8\beta_1$  est impliquée dans l'activation de

FAK, il est possible que la thrombine et l'angiotensine II utilisent cette intégrine pour amplifier leur signal mitogène.

L'augmentation de l'expression de l' $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  a été observée lors de stimulations par la thrombine sur les VSMC aortiques et mésentériques. Il est difficile d'analyser ces résultats puisque le test de radiolisation ne permet pas de discriminer ces deux intégrines entre elles. La fibronectine et la vitronectine sont les ligands de l' $\alpha_v\beta_1$  alors que l' $\alpha_5\beta_1$  préfère les fibrilles de fibronectine (Hynes, 1992). En plus de permettre l'adhésion, ces intégrines stimulent la production de protéases en fonction du type cellulaire, l'assemblage des fibres de fibronectine et dans le cas de l' $\alpha_5\beta_1$  inhibe l'apoptose par la surexpression de Bcl-2 (Ruoslahti, 1997). L'augmentation du signal radioactif de ces intégrines chez les VSMC aortiques et mésentériques proviendrait uniquement de l'augmentation de la quantité de récepteurs exprimés (Bmax) et non pas d'une modification de l'affinité du récepteur (pKd) pour l'échistatine. Les régions régulatrices de la sous-unité  $\alpha_5$  contiennent les sites pour les facteurs Sp1, ets, AP-1 et AP-2 (Birkenmeier *et al.*, 1991). Celles de l' $\alpha_v$  contiennent les sites pour Sp1, ets et GATA (Donahue *et al.*, 1994). Il semble que l'effet de la thrombine sur l'expression des intégrines soit directe et n'utilise pas le bFGF comme intermédiaire. En effet, l'expression de l' $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  atteint un plateau à partir de la concentration la plus faible de thrombine. Le mécanisme de régulation semble être le même pour les intégrines  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_8\beta_1$ .

L'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  chez les VSMC aortiques et mésentériques est augmentée lors d'une stimulation par la thrombine. Cette intégrine est impliquée dans l'adhésion, la migration et la prolifération des VSMC (Byzova *et al.*, 1998; Byzova *et al.*, 2000). Elle a été le modèle du mécanisme "outside-in" permettant aux intégrines de réguler les voies de signalisation intracellulaire (Byzova *et al.*, 1998). Ses ligands sont le fibrinogène, la fibronectine, la laminine et plusieurs autres protéines contenant le motif RGD (Cheresh, 1987; Pfaff *et al.*, 1993). La régulation à la hausse de son expression semble être attribuée directement à l'effet de la thrombine. Comme il a été observé pour les trois intégrines précédentes, la courbe concentration-réponse de la thrombine suggère que

l'expression de l' $\alpha_v\beta_3$  ne provienne pas d'agents secondaires sécrétés par les VSMC stimulées. De plus, l'affinité pour le ligand ne varie pas alors que la quantité d'intégrines exprimées augmente lorsque les VSMC aortiques sont stimulées par la thrombine. Ceci démontre que la thrombine ne régule pas la modulation de l'affinité mais, comme observé dans les cellules endothéliales stimulées par la thrombine (Murphy *et al.*, 1994), augmente l'expression des gènes  $\alpha_v$  et  $\beta_3$ . Dans le cas des VSMC mésentériques, seule la quantité d' $\alpha_v\beta_3$  est augmentée suggérant que la thrombine n'agisse qu'au niveau de l'expression du gène des VSMC mésentériques. La région régulatrice de la sous-unité  $\beta_3$  contient les sites pour les facteurs Sp1 GATA, Myb, ets et E2F (Villa-Garcia *et al.*, 1994). L'expression de la sous-unité  $\beta_3$  est régulée principalement par la voie de signalisation Raf-MEK-ERK (Woods *et al.*, 2001) qui est elle-même activée par l' $\alpha$ -thrombine. De plus, la voie Raf-MEK-ERK peut influencer l'activation des intégrines par des mécanismes post-traductionnels (Hughes *et al.*, 1997). Ces observations suggèrent l'implication de cette voie dans la modulation de l'affinité de l' $\alpha_v\beta_3$  par l' $\alpha$ -thrombine. Finalement, le traitement par l'acide rétinoïque augmente l'expression de l' $\alpha_v\beta_3$  mais la thrombine ne semble pas agir en synergie avec les rétinoïdes. La complexité du mécanisme d'action des rétinoïdes sur la régulation de l'expression des intégrines n'a encore été définie. L' $\alpha_v\beta_3$  est l'intégrine la moins abondante dans les VSMC et est surexprimée lors d'une stimulation cellulaire par la thrombine. Selon nos observations, il apparaît que la thrombine puisse entraîner la migration cellulaire puisque cette intégrine est avant tout impliquée dans ce processus. De plus, l' $\alpha_v\beta_3$  active plusieurs voies de signalisation par le mécanisme outside-in. La thrombine ayant un effet prolifératif sur les VSMC, l'augmentation de l'expression de l' $\alpha_v\beta_3$  observée en présence de cet agent suggère l'amplification du signal provenant de la thrombine par la signalisation provenant de l'intégrine.

Les différentes réponses observées entre les VSMC aortiques et mésentériques sont pour la plupart attribuées à l'origine artérielle (Varela *et al.*, 1998; Shanahan *et al.*, 1998). L' $\alpha_8\beta_1$  exprimée par les VSMC mésentériques ne semble pas être une intégrine modulable à l'inverse de son expression chez les

VSMC aortiques. Cette observation pourrait démontrer que les VSMC mésentériques sont génétiquement moins aptes à exprimer un phénotype contractile. La régulation des intégrines étudiées ne semble pas être affectée par le PDGF-BB. Plusieurs études ont démontré que la sous-unité  $\beta_1$  était sur-régulée par cet agent (Janat *et al.*, 1992; Seki *et al.*, 1996). Il existe plusieurs autres hétérodimères d'intégrines comportant cette sous-unité. Il est alors possible que le PDGF-BB régule l'expression d'intégrines autre que celles du type RGD.

Il est à retenir de cette recherche que les voies de signalisation activées par les intégrines sont en partie les mêmes que celles utilisées par l'angiotensine II et la thrombine. Par conséquent, l'augmentation de l'expression des intégrines de type RGD pourrait permettre aux facteurs de croissance d'amplifier leur signal initial par les mêmes voies de signalisation.

Afin de confirmer les résultats obtenus sur la régulation de l'expression des intégrines, l'utilisation de northern blot pour quantifier les transcrits des gènes en fonction des facteurs de croissance serait un atout. Cependant cette technique ne permet pas d'étudier la transcription de l'hétérodimère mais plutôt celle des différentes sous-unités. Quant à l'immunoprécipitation, il est possible que l'anticorps ait de l'affinité pour le site de liaison de l'échistatine. Dans ce cas, l'épitope, étant bloqué par la sonde radioactive, ne peut être détecté par l'anticorps. Des anticorps détectant certains domaines cytoplasmiques de l'hétérodimère existent mais ils ne permettent d'identifier que certaines intégrines. Finalement, le test de radioliasion fait tel que nous le décrivons ne distingue pas l' $\alpha_v\beta_1$  de l' $\alpha_5\beta_1$ . Ceci peut être résolu en utilisant un gel d'électrophorèse beaucoup plus grand ce qui permettrait de délimiter facilement les deux intégrines entre elles. L'inconvénient de cette pratique est qu'elle nécessite une très grande quantité de matériel qui parfois n'est pas disponible.

### 4.3 Localisation des intégrines aux foyers d'adhésion

La colocalisation des sous-unités des intégrines avec la vinculine nous a permis de démontrer indirectement que  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_1$  exprimées par les VSMC aortiques et mésentériques peuvent être impliquées dans la formation de foyers d'adhésion. La présence de la sous-unité  $\beta_3$  aux foyers d'adhésion n'a pu être établit pour des raisons de faible niveau d'expression de cette intégrine. Comme il a été remarqué auparavant,  $\alpha_v\beta_3$  est l'intégrine la moins exprimée par les VSMC ce qui ne permet pas d'observer le signal immunofluorescent. Cependant plusieurs études ont démontré la présence de cette intégrine aux foyers d'adhésion (Lewis *et al.*, 1996; Dejana *et al.*, 1988).

Lorsque les VSMC sont mises en culture, elles sécrètent la fibronectine qui est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette, la formation de foyers d'adhésion et l'activation de FAK, Rho et Rac (Hotchin, 1999). La signalisation outside-in par les intégrines est la transmission de l'information du compartiment extracellulaire vers l'intérieur de la cellule (Hynes, 1992) et est retrouvée, entre autres, aux foyers d'adhésion. Les foyers d'adhésion permettent l'activation de plusieurs tyrosine kinases impliquées dans la croissance ou la survie cellulaire et la phosphorylation des protéines du cytosquelette (Berman *et al.*, 2000). Par conséquent, les intégrines identifiées dans cette étude pourraient être impliquées dans la transmission de signaux intracellulaires par leur présence aux foyers d'adhésion. Leur régulation à la hausse par les facteurs de croissance pourrait être un indice de l'utilisation des intégrines par ces agents pour amplifier le signal mitogène.

Des expériences d'immunoprécipitation avec la vinculine permettraient de confirmer la présence des intégrines aux foyers d'adhésion. Par la suite, la quantification de la FAK phosphorylée à l'aide d'un immunobuvardage pourrait déterminer l'effet de la thrombine ou de l'angiotensine II sur la formation de foyers d'adhésion et l'activation de la kinase. Ceci donnerait un indice de l'implication des



intégrines dans la signalisation intracellulaire des VSMC en présence de ces facteurs de croissance.

A la lumière de cette recherche, quelques conclusions peuvent être tirées de nos résultats. L'expression de certaines intégrines augmente en présence de thrombine ou d'angiotensine II. Ces intégrines sont également retrouvées aux foyers d'adhésion. Par conséquent, la modulation de l'expression des intégrines de type RGD peut être une stratégie développée par la cellule pour augmenter la croissance cellulaire en présence d'angiotensine II et de thrombine. Selon nos résultats, il semble que ces deux facteurs de croissance soit moins puissants que le PDGF-BB au niveau de la prolifération cellulaire. Cela pourrait être la raison de cette différence de réaction en fonction des agonistes de la croissance cellulaire. Leur mécanisme pourrait être résumé par la figure 36. L'angiotensine II ou la thrombine augmenterait la sécrétion de fibronectine en parallèle à la stimulation de l'expression des intégrines. Il y aurait une augmentation de la formation de foyers d'adhésion et l'activation de pp125<sup>FAK</sup>, ce qui amplifierait la signalisation intracellulaire initiale du facteur et la croissance cellulaire.

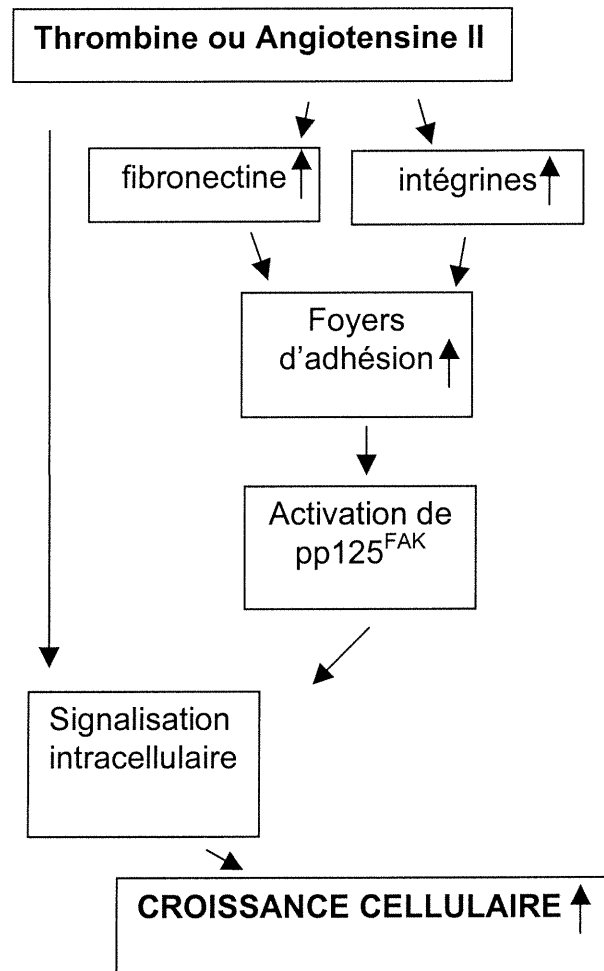


Figure 30. **Modèle de l'implication des intégrines de type RGD dans la croissance des VSMC en présence de thrombine ou d'angiotensine II.** Les deux facteurs de croissance stimulent la sécrétion de fibronectine et l'expression des intégrines. Il y a une augmentation de la formation de foyers d'adhésion entraînant l'activation de pp125<sup>FAK</sup> qui, par la suite, stimule plusieurs autres tyrosine kinases impliquées dans le signal mitogène. Ceci stimule la croissance cellulaire des VSMC déjà initiée par la signalisation intracellulaire de l'agent.

## CONCLUSION

La régulation des intégrines de type RGD en tant qu'hétérodimères n'a jamais fait l'objet d'analyses approfondies. Dans cette étude, nous avons été en mesure d'observer les modifications de l'expression de certaines intégrines sous leur forme hétérodimérique à l'aide de l'échistatine radioactive. Les résultats présentés ici démontrent clairement que la thrombine et l'angiotensine II régulent les intégrines de type RGD exprimées par les VSMC aortiques et mésentériques. La thrombine semble avoir des effets sur l'expression des intégrines  $\alpha_8\beta_1$ ,  $\alpha_v/\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$  et non pas sur la modulation de l'affinité du récepteur pour son ligand. L'angiotensine II n'agirait que sur la quantité de récepteurs  $\alpha_8\beta_1$  produits. Les voies de signalisation impliquées dans cette régulation seront à déterminer. Nous avons également observé la présence des intégrines de type RGD aux foyers d'adhésion. Une question concernant la problématique des intégrines n'est pas résolue: Quel est le but biologique d'augmenter l'expression des intégrines de type RGD que nous avons étudiées ou de modifier leur affinité? La réponse est peut-être dans leur localisation aux foyers d'adhésion. Les deux facteurs de croissance stimulent la sécrétion de fibronectine, protéine favorisant la formation de foyers d'adhésion. Ce sont par ces regroupements que les intégrines activent les voies de signalisation et entraînent, entre autre, la croissance cellulaire. Il est alors possible que les intégrines soient utilisées afin d'augmenter le pouvoir mitogène basale de la thrombine et de l'angiotensine II. Si tel est le cas, cela pourrait ouvrir des voies thérapeutiques dans le domaine pharmacologique. L'inhibition de la prolifération des VSMC via l'interruption de l'expression des intégrines serait une nouvelle approche dans le ralentissement du processus de remodelage vasculaire.

## RÉFÉRENCES

Aikawa M, Sivam PM, Kuro-o M, Kimura K, Nakahara K, Takewaki S, Ueda M, Yamaguchi H, Yazaki Y, Periasamy M, Nagai R. 1993. Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ. Res.* 73: 1000-12.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. 1998. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50(2):197-223.

Bellis SL, Perrotta JA, Curtis MS, Turner CE. 1997. Adhesion of fibroblasts to fibronectin stimulates both serine and tyrosine phosphorylation of paxillin. *Biochem. J.* 325:375-81.

Berk BC, Taubman MB, Griendling KK, Cragoe EJ, Fenton JW, Brock TA. 1991. Thrombin-stimulated events in cultured vascular smooth-muscle cells. *biochem. J.* 274:799-805.

Berman AE, Kozlova NI. 2000. Integrins: structure and functions. *Membr. Cell Biol.* 13(2):207-44.

Bhattacharya S, Ying X, Fu C, Patel R, Kuebler W, Greenberg S, Bhattacharaya J. 2000.  $\alpha v \beta 3$  integrin induces tyrosine phosphorylation-dependent  $Ca^{2+}$  influx in pulmonary endothelial cells. *Circ. Res.* 86:456-462.

Birkenmeier TM, McQuillan JJ, Boedeker ED, Argraves WS, Ruoslahti E, Dean DC. 1991. The alpha 5 beta1 fibronectin receptor. Characterization of the alpha 5 gene promoter. *J. Biol. Chem.* 266:20544-49.

Blenis J. 1993. Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90(13):5889-92.

Berman AE, Kozlova NI. 2000. Integrins: structure and functions. *Membr. Cell Biol.* 13(2):207-44.

Berridge MJ. 1993. Inositol triphosphate and calcium signaling. *Nature* 361:315-25.

Bobik A, Grimpukel S, Little PJ, Grooms A, Jackman G. 1990. Angiotensin II and noradrenaline increase PDGF-BB receptors and potentiate PDGF-BB stimulated DNA synthesis in vascular smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 166(2):580-88.

Bondjers G, Glukhova M, Hansson GK, Postnov YV, Reidy MA, Schwartz SM 1991. Hypertension and atherosclerosis: cause and effect, or two effects with one unknown cause? *Circulation* 84 (supplIV):V12-V16.

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

Bossy B, Bossy-Wetzel E, Reichardt LF. 1991. Characterization of the integrin  $\alpha 8$  subunit: a new integrin  $\beta 1$ -associated subunit, which is prominently expressed on axons and on cells in contact with basal laminae in chick embryos. *EMBO J.* 10(9):2375-85.

Bottger BA, Hedin U, Johansson S, Thyberg J. 1989. Integrin-like fibronectin receptors in rat arterial smooth muscle cells: isolation, partial characterization and role in cytoskeletal organization and control of differentiated properties. *Differentiation* 41:158-67.

Berk BC, Corson MA. 1997. Angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle: role of tyrosine kinases. *Circ. Res.* 80:607-16.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-250.

Brandenberger R, Schmidt A, Linton J, Wang D, Backus C, Denda S, Müller U, Reichardt LF. 2001. Identification and characterization of a novel extracellular matrix protein nephronectin that is associated with integrin  $\alpha 8 \beta 1$  in the embryonic kidney. *J. Cell Biol.* 154(2):447-58.

Brandley BK, Schnaar RL. 1989. Tumor cell haptotaxis on covalently immobilized linear and exponential gradients of a cell adhesion peptide. *Dev. Biol.* 135:74-86.

Breuer D, Wagener C. 1989. Activation of phosphatidylinositol lipid cycle in spreading cells. *Exp. Cell Res.* 182:659-663.

Burke RD. 1999. Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 191:257-84.

Burridge K, Fath K, Kelly T, Nuckolls G, Turner C. 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4:487-525.

Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M. 1996. Focal adhesions, contractility and signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12:463-519.

Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M, Zhong C. 1997. Focal adhesion assembly. *Trends Cell Biol.* 7:342-47.

Bydlowski SP, Pares M, Soares RPS, Lopez AAB. 1998. Stimulation of human smooth muscle cell proliferation by thrombin involves increased synthesis of platelet-derived growth factor. *Chest* 114:236-40.

Byzova TV, Rabbani R, D'Souza SE, Plow EF. 1998. Role of integrin  $\alpha_v\beta_3$  in vascular biology. *Thromb. Haemost.* 80:726-34.

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.

Calvete JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriguez J. 1991. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulfide pattern for the beta-subunits of integrin family. *J. Biochem.* 274:63-71.

Campbell JH, Campbell GR. 1986. Endothelial cell influences on vascular smooth muscle cell phenotype. *Annu. Rev. Physiol.* 48:295-306.

Cardone MH, Salvesen GS, Widmann C, Johnson G, Frisch SM. 1997. The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90:315-323.

Carey DJ. 1991. Control of growth and differentiation of vascular cells by extracellular matrix proteins. *Annu. Rev. Physiol.* 53:161-77.

Casscells W. 1991. Smooth muscle cell growth factors. *Prog. Growth Factor Res.* 3:177-206.

Cervella P, Silengo L, Pastore C, Altruda F. 1993. Human beta 1-integrin gene expression is regulated by two promoter regions. *J. Biol. Chem.* 268:5148-55.

Chambley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. 1979. The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev.* 59:1-61.

Chan BM, Matsuma N, Tabada Y, Zetter BR, Hemier M. 1991. In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science* 251:1600-1602.

Charo IF, Nannizzi L, Phillips DR, Hsu MA, Scarborough RM. 1991. Inhibition of fibrinogen binding to GPIIb-IIIa by a GPIIIa peptide. *J. Biol. Chem.* 266:1421-25.

Chen H-C, Guan J-L. 1994. Association of focal adhesion kinase with its potential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10148-52.

Chen HC, Appeddu PA, Isoda H, Guan JL. 1996. Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 271(42):26329.

Chen J, Ishii M, Wang L, Ishii K, Coughlin SR. 1994. Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. *J. Biol. Chem.* 269:16041-45.

Chen LL, Whitty A, Scott D, Lee W-C, Cornebise M, Adams SP, Petters RC, Lobb RR, Pepinsky RB. 2001. Evidence that ligand and metal ion binding to integrin  $\alpha 4\beta 1$  are regulated through a coupled equilibrium. *J. Biol. Chem.* 276:36520-36529.

Cheresh DA. 1987. Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6471-5.

Chong LD, Traynor-Kaplan A, Bokoch GM, Schwartz MA. 1994. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell* 79:507-13.

Coppolino MG, Woodside MJ, Demaurex N, Grinsten S, St-Arnaud R, Dedhar S. 1997. Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion. *Nature* 386:843-847.

Crowe D, Chiu H, Fong S, Weissman I. 1994. Regulation of the avidity of integrin  $\alpha 4\beta 7$  by the  $\beta 7$  cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 269:14411-18.

Cucina A, Borrelli V, Di Carlo A, Pagliei S, Corvino V, Santoro-D'Angelo L, Cavallaro A, Sterpetti AV. 1999. Thrombin induces production of growth factors from aortic smooth muscle cells. *J. Surg. Res.* 82:61-66.

Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, Kawasaki J, Davis GE, Hill MA, Meininger GA. 2001. Integrins and mechanotransduction of the vascular myogenic response. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:H1427-H1433.

Dejana E, Colella S, Conforti G, Abbadini M, Gaboli M, Marchisio PC. 1988. Fibronectin and vitronectin regulate the organization of their respective Arg-Gly-Asp adhesion receptors in cultured human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 107(3):1215-23.

DeRose JJ, Madigan J, Umana JP, Prystowoky JN, Nowygrod R, Oz MC, Todd GJ. 1999. Retinoic acid suppresses intimal hyperplasia and prevents vessel remodeling following arterial injury. *Cardiovasc. Surg.* 7:633-39.

Donahue JP, Sugg N, Hawiger J. 1994. The integrin alpha v gene: identification and characterization of the promoter region. *Biochim. Biophys. Acta* 1219:228-32.

Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft FC, Wobus AM. 1997. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J.* 11:905-15.

D'Souza SE, Haas TA, Piotrowics RS, Byers-Ward V, McGrath DE, Soule HR, Cierniewski CS, 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.

Duband JL, Rocher S, Chen WT, Yamada KM, Thiery JP. 1986. Cell adhesion and migration in the early vertebrate embryo: location and possible role of the putative fibronectin receptor complex. *J. Cell Biol.* 102:2-66.

Eguchi S, Hirata Y, Imai T, Kanno K, Marumo F. 1994. Phenotypic change of endothelin receptor subtype in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 134:222-28.

Elices MJ, Urry LA, Hemler ME. 1991. Receptor functions for the integrin V $\alpha$ -3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by Arg-Gly-Asp peptide and divalent cations. *J. Cell Biol.* 112:169-181.

Fang F, Orend G, Watanabe N, Hunter T, Ruoslahti E. 1996. Dependence of cyclin E-cdk2 kinase activity on cell anchorage. *Science* 271:499-502.

Folkman J, Moscona A. 1978. Role of cell shape in growth control. *Nature* 273:345-49.

Folkow B. 1990. The "structural factor" in hypertension. *Dans Hypertension : Pathophysiology, diagnosis, and management.* éditeurs : J. H. Laragh and B. M. Brenner, Raven Press, Ltd., New York. 565-581.

Freshney RI. 1994. Culture of animal cells, a manual of basic techniques. Troisième édition. John Wiley and Sons, inc., Toronto. 253-255.

Frisch SM, Francis H. 1994. Disruption of endothelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell. Biol.* 124:619-26.

Furie B, Furie BC. 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53:505.

Gabbiani G, Kocher O, Bloom WS, Vandekerckhove J, Weber K. 1984. Actin expression in smooth muscle cells of rat aortic intimal thickening, human atheromatous plaque, and culture rat aortic media. *J. Clin. Invest.* 73: 148-52.



Gajdusek CM, Schwartz SM. 1982. Ability of endothelial cells to condition culture medium. *J. Cell. Physiol.* 110:35-42.

Gallis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. 1994. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.* 94:2493-2503.

Gallagher PJ, Jin Y, Lindner V. 1998. Expression of myosin and myosin light chain kinase in response to vascular injury [abstract]. Symposium on angiogenesis and vascular remodeling at Keystone. Steamboat Spring, Co No. 312.

Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. 1989. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* 62(4):749-56.

Giancotti FG, Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028-32.

Goldsack NR, Chambers RC, Dabbagh K, Laurent GJ. 1998. Molecules in focus thrombin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30:641-46.

Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA, Huang T-F, Holt JC, Cook JJ, Niewiarowski S. 1990. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.* 195:168-71.

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activation in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 74:1141-48.

Grzesiak JJ, Pierschbacher MD. 1995. Shifts in the concentrations of magnesium and calcium in early porcine and rat wound fluids activate the cell migratory response. *J. Clin. Invest.* 95:227-33.

Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohl Y, Bühler FR. 1990. Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Reg.* 1:649-659.

Hahn AFW, Resink TJ, Kern F, Bühler FR. 1993. Peptide vasoconstrictors, vessel structure, and vascular smooth-muscle proliferation. *J. Cardiovasc. Pharm.* 22: S37-S43.

Hanna RL, Kouembanas S, Flanders KC, Rogelj SJ, Roberts AB, Faller DV, Klagsbrun M. 1988. Endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Growth Factor* 1:7-17.

Hart CE, Forstrom JW, Kelly JD, Seifert RA, Smith RA, Ross R, Murray MJ, Bowen-Pope DF. 1988. Two classes of PDGF receptors recognize different isoforms of PDGF. *Science* 240:1529-31.

Hartner A, Schöcklmann H, Pröls F, Müller U, Sterzel RB. 1999.  $\alpha$ 8 integrin in glomerular mesangial cells and in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* 56:1468-80.

Hedin U, Bottger BA, Forsberg E, Johansson S, Thyberg J. 1988. Diverse effects of fibronectin and laminin on phenotypic properties of cultured arterial smooth muscle cells. *J. Cell. Biol.* 107:307-19.

Hedin U, Thyberg J, Roy J, Dumitrescu A, Tran PK. 1997. Role of tyrosine kinases in extracellular matrix-mediated modulation of arterial smooth muscle cell phenotype. *Arterioscl. Thromb. Vas. Biol.* 17:1977-84.

Einheber S, Schnapp LM, Salzer JL, Capiello ZB, Milner TA. 1996. Regional and ultrastructural distribution of the  $\alpha$ 8 integrin subunit in developing and adult rat brain suggests a role in synaptic function. *J. Comp. Neurol.* 370:105-34.

Heldin CH, Bäckström G, östman A, Hammacher A, Rönstrand L, Rubin K, Nistér M, Westermark B. 1988. Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. *EMBO J.* 7:1387-94.

Heldin CH, Westermark B. 1990. Platelet-derived growth factor: mechanism of action and possible in vivo function. *Cell Regul.* 1:555-66.

Heldin CH, östman A, Eriksson A, Siegbahn A, Claesson-Welsh L, Westermark B. 1992. Platelet-derived growth factor: isoform-specific signalling via heterodimeric or homodimeric receptor complexes. *Kidney Int.* 41:571-74.

Hemker HC, Kessels H. feedback mechanisms in coagulation. *Haemostasis* 21:189-96.

Hendey B, Klee CB, Maxfield FR. 1992. Inhibition of neutrophil chemokinesis on vitronectin by inhibitors of calcineurin. *Science* 258:296-99.

Hillis GS, McLeod AM. 1996. Integrins and disease. *Clin. Science.* 91:639-50.

Holycross BJ, Peach MJ, Owens GK. 1993. Angiotensin II stimulates increased protein synthesis, not increased DNA synthesis, in intact rat aortic segments, in vitro. *J. Vasc. Res.* 30:80-6.

- Horwitz A, Duggan E, Buck C, Beckerle MC, Burridge K. 1986. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a membrane linkage. *Nature* 320:531-33.
- Hotchin NA, Kidd AG, Alstroff H, Mardon HJ. 1999. Differential activation of focal adhesion kinase, Rho and Rac by the ninth and tenth FIII domains of fibronectin. *J. Cell Sci.* 112:2937-46.
- Hu DD, White CA, Panzer-Knodle S, Page JD, Nicholson N, Smith JW. 1999. A new model of dual interacting ligand binding sites on integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *J. Biol. Chem.* 274:4633-39.
- Humphries MJ. 1990. The molecular basis and specificity of integrin ligand interactions. *J. Cell. Sci.* 97:585-592.
- Humphries MJ. 1996. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8 :632-40.
- 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.* 270:12411-17.
- Hughes PE, Renshaw MW, Pfaff M, Forsyth J, Keivens VM, Schawtrz MA, Ginsberg MH. 1997. Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell* 88:521-30.
- Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF. 1995. Adhesion in cell migration. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7:697-706.
- Hynes RO. 1990. Fibronectins. *Springer-Verlag*, New York
- Hynes RO. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-29.
- Ingebar DE. 1992. Extracellular matrix as a solid state regulator in angiogenesis: identifications of new targets for anti-cancer therapy. *Sem. Cancer Biol.* 3:57-63.
- Ishii K, Hein L, Kobilka B, Coughlin SR. 1993. Kinetics of thrombin receptor cleavage on intact cells. Relation to signaling. *J. Biol. Chem.* 268(13):9780-6.
- Janat MF, Argreaves WS, Liao G. 1992. Regulation of vascular smooth muscle cell integrin expression by transforming growth factor  $\beta_1$  and by platelet derived growth factor-BB. *J. Cell. Physiol.* 151:588-95.
- Jeong J, Han I, Lim Y, Park I, Woods A, Couchman JR, Oh ES. 2001. Rat embryo fibroblasts require both the cell-binding and the heparin-binding domains of fibronectin for survival. *J. Biochem.* 356:531-37.

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

Kanda K, Matsuda T, Oka T. 1994. Mechanical stress induced cellular orientation and phenotypic modulation of 3-D cultured smooth muscle cells. *ASAIO J.* 39: M686-M690.

Kanthou C, Parry G, Wijelath E, Kakkar VV, Demoliou-Mason C. 1992. Thrombin-induced proliferation and expression of platelet-derived growth factor-A chain gene in human vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 314:143-48.

Kappert K, Schmidt G, Doerr G, Wollert-Wulf B, Fleck E, Graf K. 1999. Angiotensin II and PDGF-BB stimulate  $\beta 1$ -mediated adhesion and spreading in human VSMCs. *Hypertension* 35(part 2):255-261.

Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I. 1992. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscl. Thromb. Vas.* 12:494-502.

Keely PJ, Westwick JK, Whitehead IP, Der CJ, Paris LV. 1997. Cdc42 and Rac1 induce integrin-mediated cell motility and invasiveness through PI(3)K. *Nature* 390:632-36.

Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, Downward J. 1997. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.* 16:2783-93.

Kim S, Prive G, Yeh J, Scott W, Milburn M. 1992. A model for transmembrane signaling in a bacterial chemotaxis receptor. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 57:17-24.

Kim LT, Yamada KM. 1997. The regulation of expression of integrin receptors. *Proceed. Soc. Exp. Biol. Med.* 214:123-31.

Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Gehron Robey P, Tryggvason K, Martin GR. 1982. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochem.* 21:6188-93.

Kocher O, Gabbiani G. 1986. Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells. *Hum. Pathol.* 17:875-80.

Koyama H, Raines EW, Bornfeldt KE, Roberts JM, Ross R. 1996. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors. *Cell* 87: 1069-78.

Ku DD. 1982. Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science* 128:576-77.

Kueng W, Silber E, Eppenberger U. 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.* 182(1):16-9.

Kuro-o M, Nagai R, Nakahara K, Katoh H, Tsai RC, Tsuchimochi H, Yazaki Y, Ohkubo A, Takaku F. 1991. CDNA cloning of a myosin heavy chain isoform in embryonic smooth muscle and its expression during vascular development and in arteriosclerosis. *J. Biol. Chem.* 266:3768-73.

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

Lampugnani MG, Giorgi M, Gaboli M, Dejana E, Marchisio PC. 1990. Endothelial cell motility, integrin receptor clustering, and microfilament organization are inhibited by agents that increase intracellular cAMP. *Lab. Invest.* 63:521-31.

Langille BL. 1993. Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle and matrix. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21(suppl.1):S11-S17.

Legler DF, Wiedle G, Ross FP, Imhof BA. 2001. Superactivation of integrin  $\alpha_v\beta_3$  by low antagonist concentrations. *J. Cell Sci.* 114:1545-53.

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. 1990. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the framingham heart study. *N. Engl. J. Med.* 322(2):1561-6.

Lewis JM, Cheresh DA, Schwartz MA. 1996. Protein kinase C regulates alpha v beta 5-dependent cytoskeletal associations and focal adhesion kinase phosphorylation. *J. Cell Biol.* 134:1323-32.

Li X, Tsai P, Wieder ED, Kribben A, Van Putten V, Schrier W, Nemenoff RA. 1994. Vascular smooth muscle cells grown on matrigel: a model of contractile phenotype with decreased activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269(30):19653-58.

Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM. 1994. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ. Res.* 74:214-24.

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. *J. Clin. Invest.* 95:713-14.

Lin CKE, Ratnikov BI, Tsai PM, Gonzalez ER, McDonald S, Pelletier AJ, Smith JW. 1997. Evidence that the integrin b3 and b5 subunits contain a metal ion dependent adhesion site-like motif but lack an I domain. *J. Biol. Chem.* 272:14236-43.

Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. 1997. *Biologie moléculaire de la cellule*. 3e édition. De Boeck Université, Paris.

Longhurst CM, Jennings LK. 1998. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol. Life Sci.* 54:514-526.

Lunardi-Iskandar Y, Bryant JL, Zeman RA, Lam VH, Samaniego F, Besnier JM, Hermans P, Thierry AR, Gil P, Gallo RC. 1995. Tumorigenesis and metastasis of neoplastic Kaposi's sarcoma cell line in immunodeficient mice blocked by a humane pregnancy hormone. *Nature* 375:64-8.

Lundmark K, Tran PK, Kinsella MG, Clowes AE, Wight TN, Hedin H. 2001. Perlecan inhibits smooth muscle cell adhesion to fibronectin: role of heparan sulfate. *J. Cell. Physiol.* 188:67-74.

Madamanchi NR, Li S, Patterson C, Runge MS. 2001. Thrombin regulates vascular smooth muscle cell growth and heat shock proteins via the JAK-STAT pathway. *J. Biol. Chem.* 276:18915-18924.

Manamara CA, Sarembock IJ, Bachluber BG, Stouffer GA, Ragosta M, Barry W, Gimple LW, Powers ER, Owens GK. 1996. Thrombin and vascular smooth muscle cell proliferation: implications for atherosclerosis and restenosis. *Sem. Thromb. Hemost.* 22:139-44.

Marcinkiewicz C, Rosenthal LA, Mosser DM, Kunicki TJ, Niewiarowski S. 1996. Immunological characterization of ristostatine and echistatin binding sites on alphaIIb beta3 and alpha v beta3 integrins. *Biochem. J.* 317:817-25.

Marguerite GA, Plow EF, Edgington TS. 1979. Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 254:5357-63.

Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE. 1995. Direct stimulation of Jak/STAT pathway by angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 375:247-50.

Martin GR, Timpl R. 1987. Laminin and other basement membrane components. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 3:57-85.

Matsuno H, Stassen JM, Vermeylen J, Deckmyn H. 1994. Inhibition of integrin function by a cyclic RGD-containing peptide prevents neointima formation. *Circulation* 90:2203-06.

- McCarthy JB, Palm SL, Furcht LT. 1983. Migration by haptotaxis of a Schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. *J. Cell. Biol.* 97: 772-77.
- McGullagh KG, Duance VC, Bishop KA. 1980. The distribution of collagen types I, II and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J. Pathol.* 130: 45-55.
- Medhora MM. 2000. Retinoic acid upregulates  $\beta$ 1-integrin in vascular smooth muscle cells and alters adhesion to fibronectin. *Am. J. Physiol.* 279:H382-H387.
- Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA. 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell.* 4:953-61.
- Meredith JE, Winitz S, Lewis JM, Hess S, Ren X-D, Renshaw MW, Schwartz MA. 1996. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endo. Rev.* 17(3):207-20.
- Meredith JE, Winitz S, McArthur Lewis J, Hess S, Ren X-D, Renshaw MW, Schwartz MA. 1996. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr. Rev.* 17:207-18.
- Miano JM, Topouzis S, Majesky MW, Olson EN. 1996. Retinoic receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 93:1886-95.
- Miano JM, Berk BC. 2001. Retinoids: new insight into smooth muscle cell growth inhibition. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:724-26.
- Mizejewski GJ. 1999. Role of integrins in cancer : survey of expression patterns. *PSEBM* 222:124-138.
- Mould AP, Wheldon LA, Komoriya A, Wayner EA, Yamada KM, Humphries MJ. 1990. Affinity chromatographic isolation of the melanoma cell adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as integrin  $\alpha_4\beta_1$ . *J. Biol. Chem.* 265:4020-24.
- Mould AP, Humphries MJ. 1991. Identification of a novel recognition sequence for the integrin  $\alpha_4\beta_1$  in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *EMBO J.* 10:4089-95.
- 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  $\alpha_5\beta_1$ . *Biochem. J.* 331:821-828.

Müller U, Bossy B, Venstrom K, Reichardt LF. 1995. Integrin  $\alpha_8\beta_1$  promotes attachment, cell spreading, and neurite outgrowth on fibronectin. *Mol. Biol. Cell* 6:433-48.

Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. 1991. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351:233-35.

Murphy JF, Bordet J-C, Wyler B, Rissoan M-C, Chomarat P, Defrance T, Miossec P, McGregor JL. 1994. The vitronectin receptor (avb3) is implicated, in cooperation with P-selectin and platelet-activating factor, in adhesion of monocytes to activated endothelial cells. *Biochem. J.* 304:537-42.

Musial J, Niewiarowski S, Rucinski B, Stewart GJ, Cook JJ, Williams JA, Edmunds LH. 1990. Inhibition of platelet adhesion to surfaces of extracorporeal circuits by desintegrins: RGD-containing peptides from viper venoms. *Circulation* 82:261-73.

Nakano T, Raines EW, Abraham JA, Wenzel FG, Higashiyama S, Klagsbrun M, Ross R. 1993. Glucocorticoid inhibits thrombin-induced expression of platelet-derived growth factor A-chain and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in human aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 268:22941-47.

Nermut MV, Green NM, Eason P, Yamada SS, Yamada KM. 1988. Electron microscopy and structural model of human fibronectin receptor. *EMBO J.* 7:4093-99.

Nip J, Brodt P. the role of the integrin vitronectin receptor,  $\alpha_v\beta_3$ , in melanoma metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 14:241-52.

O'Brien V, Frisch SM, Juliano RL . 1996. Expression of the integrin  $\alpha_5$  subunit in HT29 colon carcinoma cells supresses apoptosis trigged by serum deprivation. *Exp. Cell. Res.* 224:208-13.

O'Toole TT, Mandelman D, Forsyth J, Shattil SJ, Plow EF, Ginsberg MH. 1991. Modulation of the affinity of integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of  $\alpha_{IIb}$ . *Science.* 254:845-47.

O'Toole TT, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quartanta V, Lotus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH. 1994. Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J. Cell Biol.* 124:1047-59.

Owens GK. 1995. Regulation of differntiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.* 75(3) : 487-515.



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

Perkins S, Smith K, Williams S, Haris P, Chapman D, Sim R. 1994. The secondary structure of the von Willebrand factor type A domain in factor B of human complement by Fourier transform infrared spectroscopy. Its occurrence in collagen type VI, VII, XII and XIV, the integrins and other proteins by averaged structure prediction. *J. Mol. Biol.* 238:104-19.

Pfaff M, Aumailley M, Specks U, Knolle J, Zerwes H-G, Timpl R. 1993. Integrin and Arg-Gly-Asp dependence of the cell adhesion to the native and unfolded triple helix of collagen type VI. *Exp. Cell Res.* 206:167-76.

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  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha 5 \beta 1$  and in cell adhesion inhibition. *Cell Adhes. Commun.* 2:491-501.

Pierschbacher MD, Ruoslahti E. 1984. Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5985-5988.

Plow EF, Hass TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. 2000. Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* 275(29):21785-88.

Polak JM, Van Noorden S.éditeurs. 1983. Immunocytochemistry :practical applications in pathology and virology. *John Wright PSG, Littleton.*

Pullan S, Wilson J, Metcalfe A, Edwards GM, Goberdhan N, Tilly J, Hickman JA, Dive C, Streuli CH. 1996. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J. Cell Sci.* 109:631-42.

Price LS, Leng J, Schwartz MA, Bokoch GM. 1998. Activation of Rac and Cdc42 by integrins mediates cell spreading. *Mol. Biol. Cell.* 9:1863-1871.

Quillen JE, Sellke FW, Armstrong ML, Harrison DG. 1991. Long-term cholesterol feeding alters the reactivity of primate coronary microvessels to platelet products. *Arterioscl. Thromb.* 11:639-45.

Ferns GA, Sprugel KH, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Kelly JD, Murray M, Raines EW, Ross R. 1990. Relative platelet-derived growth factor receptor subunit expression determines cell migration to different dimeric forms of PDGF. *Growth Factors* 3(4):315-24.

Raines EW, Koyama H, Carragher NO. 2000. The extracellular matrix dynamically regulates smooth muscle cell responsiveness to PDGF<sup>a</sup>. *Ann. NY Acad. Sci.* 902:39-52.

Rana RS, Hokin LE. 1990. Role of phosphoinositides in transmembrane signalling. *Physiol. Rev.* 70:115-164.

Reckless J, Fleetwood G, Tilling L, Huber PA, Marston SB, Pritchard K. 1994. Changes in the caldesmon isoform content and intimal thickening in the rabbit carotid artery induced by a silicone elastomer collar. *Arterioscl. Thromb.* 14:1837-45.

Reilly CF, McFall RC. 1991. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta regulate plasminogen activator inhibitor-1 synthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 266: 9419-9427.

Rennard R, Berg R, Martin GR, Foidart JM, Gehron Robey P. 1980. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. *Anal. Biochem.* 104:205.

Ridley AJ, Hall A. 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesion and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70:389-99.

Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. 1986. The biology of platelet derived growth factor. *Cell* 46:155-69.

Ross R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.

Rudolph R, Cheresh D. 1990. cell adhesion mechanisms and their potential impact on wound healing and tumor control. *Clin. Plast. Surg.* 17:457-462.

Ruoslahti E, Hayman EG, Pierschbacher MD, Engvall E. 1982. Fibronectin: purification, immunochemical properties, and biological activities. *Methods Enzymol.* 82:803-831.

Ruoslahti E, Reed JC. 1994. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 77:477-78.

Ruoslahti E. 1997. Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. *Kidney Int.* 51:1413-17.

Saoncella S, Echtermeyer F, Denhez F, Nowlen JK, Mosher DF, Robinson SD, Hynes RO, Goetinck PF. 1999. Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2805-10.

Sasaki K, Yamamo Y, Bardham S, Iwai N, Murray JJ, Hasegawa M, Matsuda Y, Inagami T. 1991. Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine arenal angiotensin type-1 receptor. *Nature*. 351:230-32.

Schaller MD, Parsons JT. 1994. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6:705-10.

Schlaepfer D, Hanks S, Hunter T, Van Der Geer P. 1994. Integrin-mediated signal transduction linked to ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372:786-91.

Schlaepfer DD, Broome MA, Hunter T. 1997. Fibronectin-stimulated signaling from a focal adhesion kinase-c-Src complex: involvement of the Grb2, p130cas, and Nck adaptor proteins. *Mol. Cell Biol.* 17:1702.

Schlondroff D, DeCandido S, Satriano JA. 1987. Angiotensin II stimulates phospholipases C and A<sub>2</sub> in cultured rat mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 253:C113-C120.

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.

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

Schule R, Rangarajan P, Yang N, Kliwer S, Ransone LJ, Bolado J, Verma IM, Evans RM. 1991. Retinoic acid is a negative regulator of AP-1-responsive genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6092-96.

Schwartz MA, Both G, Lechene C. 1989. The effect of cell spreading on cytoplasmic pH in normal and transformed fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4525-29.

Schwartz MA, Denninghoff K. 1994.  $\alpha v$  integrins mediate the rise intracellular calcium in endothelial cells fibronectin even though they play a minor role in adhesion. *J. Biol. Chem.* 269:11133-37.

Schwartz MA. 1993. Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium. *J. Cell. Biol.* 120:1003-10.

Seki J, Koyama N, Kovach NL, Yednock T, Clowes AW, Harlan JM. 1996. Regulation of  $\beta 1$ -integrin function in cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 78:596-605.

Shanahan CM, Weissberg PL. 1998. Smooth muscle cell heterogeneity: patterns of expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscl. Thromb. Vas. Biol.* 18:333-38.

Shatill SJ, Cunningham M, Wiedmar T, Zhao J, Sims PJ, Brass LF. 1992. Regulation of glycoprotein IIB/IIIa receptor function studied with platelets permeabilized by the pore-forming complement proteins C5b-9. *J. Biol. Chem.* 267:18424-31.

Shatill SJ, Kashiwagi H, Pampori N. 1998. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 91:26-45-57.

Skinner MP, Raines EW, Ross R. 1994. Dynamic expression of  $\alpha_1\beta_1$  and  $\alpha_2\beta_1$  integrin receptors by human vascular smooth muscle cells:  $\alpha_2\beta_1$  integrin is required for chemotaxis across type I collagen-coated membranes. *Am. J. Pathol.* 145: 1070-1081.

Slepian MJ, Massia SP, Dehdashti B, Fritz A, and Whitesell L.  $\beta_3$ -Integrins Rather Than  $\beta_1$ -Integrins Dominate Integrin-Matrix Interactions Involved in Postinjury Smooth Muscle Cell Migration. *Circulation* 97:1818-27.

Song J, Rolfe BE, Hayward IP, Campbell RG, Campbell JH. 2001 reorganization of structural proteins in vascular smooth muscle cells grown in collagen gel and basement membrane matrices (matrigel): a comparison with their in situ counterparts. *J. Struct. Biol.* 133:43-54.

Springer TA. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-34.

Staatz WD, Rajpara SM, Wayner EA, Carter WG, Santora SA. 1989. The membrane glycoprotein Ia-Ia (VLA-2) complex mediates the  $Mg^{++}$ -dependent adhesion of platelets to collagen. *J. Cell Biol.* 108:1917-1924.

Stubbs MT, Bode W. 1993. A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure. *Thromb. Res.* 69:1-58.

Stoker AW, Streuli CH, Martins-Green M, Bissel MJ. 1990. Designer microenvironment for analysis of cell and tissue function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2(5):864-874.

Stossel TP. 1993. On the crawling of animal cells. *Science* 260:1086-94.

Stouffer GA, Runge MS. 1998. The role of secondary growth factor production in thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Sem. Thromb. Hemost.* 24(2):145-50.

Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ. 1991. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J. Cell. Biol.* 115:1383-95.

Stromblad S, Becker JC, Yerba M, Brooks PC, Cheresh DA. 1996. Suppression of p53 activity and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> expression by vascular cell integrin  $\alpha_v\beta_3$  during angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 98:426-33.

Su EJ, Lombardi DM, Siegal J, Schwartz SM. 1998. Angiotensin II induces vascular smooth muscle cell replication independent of blood pressure. *Hypertension* 31(6):1331-7.

Taubman MB, Berk BC, Izumo S, Tsuda T, Alexander RW, Nadal-Ginard B. 1989. Angiotensin II induces c-fos mRNA in aortic smooth muscle: role of  $Ca^{2+}$  mobilization and protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 264:526-530.

Thibault G. 2000. Sodium dodecyl sulfate-stable complexes of echistatin and RGD-dependent integrins: a novel approach to study integrins. *Mol. Pharmacol.* 58(5):1-9.

Thomas G. 1992. MAP Kinase by any other name smells just as sweet. *Cell* 68:3-6.

Thyberg JU, Hedin M, Sjölund L, Palmberg L, Bottger BA. 1990. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 10: 966-90.

Thyberg J, Hansson GK. 1991. Cyclosporine A inhibits induction of DNA synthesis by PDGF and other peptide mitogens in cultured rat aortic smooth muscle cells and dermal fibroblasts. *Growth Factors.* 4(3):209-19.

Thyberg J. 1996. Differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells in culture. *Int. Rev. Cytol.* 169:183-237.

Touyz RM, El Mabrouk M, Schiffrin EL. 1999. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibition attenuates Ang II-mediated signaling and contraction in SHR vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 84:505-515.

Tu Y, Huang Y, Zhang Y, Hua Y, Wu C. 2001. A new focal adhesion protein that interacts with integrin-linked kinase and regulates cell adhesion and spreading. *J. Cell. Biol.* 153(3):585-98.

Turla MB, Thompson MM, Corjay MH, Owens GK. 1991. Mechanisms of angiotensin II- and vasopressin-induced increases in protein synthesis and

content in cultured rat aortic smooth muscle cells. evidence for selective increases in smooth muscle isoactin expression. *Circ. Res.* 68: 288-99.

Ullrich A, Schlessinger J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61:203-12.

Varel O, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. 1998. The response of smooth muscle cells to  $\alpha$ -thrombin depends on its arterial origin: comparison among different species. *Eur. J. Clin. Invest.* 28(4):313-23.

Villa-Garcia M, Li L, Riely G, Bray PF. 1994. Isolation and characterization of a TATA-less promoter for the human beta3 integrin gene. *Blood* 83:668-76.

Voss B, Rauterberg J. 1986. Localization of collagen types I, III, IV and V, fibronectin and laminin in human arteries by the indirect immunofluorescence method. *Pathol. Res. Pract.* 181: 568-75.

Vu T-KH, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. 1991. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 64:1057-68.

Vu T-KH, Wheaton VI, Hung DT, Coughlin SR. 1991. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature* 353:674-77.

Wakino S, Kintsher U, Kim S, Jackson S, Yin F, Nagpal S, Chandraratna RA, Hsueh WA, Law RE. 2001. Retinoids inhibit proliferation of human coronary smooth muscle cells by modulating cell cycle regulator. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 21: 746-51.

Wary KK, Mainiero F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG. 1996 The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 87:733-43.

Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG et al. 1998. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94:625.

Weiss RH, Maduri M. 1993. The mitogenic effect of thrombin in vascular smooth muscle cells is largely due to basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 268(8):5724-27.

Wysocki SJ, Zheng MH, Fan Y, Lamawansa MD, House AK, Norman PE. 1996. Expression of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and urokinase-type plasminogen activator (u-PA) genes during arterial repair in the pig. *Cardiovasc. Res.* 31:28-36.

Yamada KM, Miyamoto S. 1995. Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:681-89.

Yang CH, Huang TF, Liu KR, Chen MS, Hung PT. 1996. Inhibition of retinal pigment epithelial cell-induced tractional retinal detachment by desintegrins, a group of Arg-Gly-Asp-containing peptides from viper venom. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37:843-54.

Yi KP, Marsh DJ. 1997. An Arg-Gly-Asp peptide stimulates constriction in rat afferent arteriole. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 273:F768-F776.

Zheng D-Q, Fornaro M, Bofetiado CJ, Tallini G, Bosari S, Languino LR. 1997. Modulation of cell proliferation by the integrin cytoplasmic domain. *Kidney Int.* 51:1434-40.

Zhong C, Hayzer DJ, Corson MA, Runge MS. 1992. Molecular cloning of the rat vascular smooth muscle thrombin receptor: evidence for in vitro regulation by basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* 267:16975-79.

Zhou MJ, Brown EJ. 1994. CR3 (Mac-1, aMb2, CD11b/CD18) and FcγRIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for FcγRII and tyrosine phosphorylation. *J. Cell. Biol.* 125:1407-16.