

2m11.3222.5

Université de Montréal

Effets du TGF- β_1 sur l'interaction des fibroblastes cardiaques et des cellules vasculaires lisses avec une matrice extracellulaire à trois dimensions : implication des intégrines

par
Julie Pepin

Département de Sciences Biomédicales
Faculté de Médecine

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

Avril, 2004

© Julie Pepin, 2004



W

4

U58

2004

v. 133

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Effets du TGF- β_1 sur l'interaction des fibroblastes cardiaques et des cellules vasculaires
lisses avec une matrice extracellulaire à trois dimensions : implication des intégrines

présenté par
Julie Pepin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Angelo Calderone
président-rapporteur

Dr. Gaétan Thibault
directeur de recherche

Dr. Madhu B. Anand-Srivastava
membre de jury

RÉSUMÉ

Pour étudier les effets du TGF- β_1 sur l'interaction des fibroblastes cardiaques et des VSMC, nous avons utilisé des matrices de collagène à trois dimensions comme support cellulaire.

L'étude de la contractilité de la matrice nous a permis d'observer que le TGF- β_1 contractait la matrice chez les deux types cellulaires.

De plus, les études immunocytochimiques nous ont démontrées que le TGF- β_1 semblait favoriser, chez les deux types cellulaires, l'expression de la fibronectine, de l' α_8 et les interactions suivantes : filaments d'actine-fibronectine, fibronectine-collagène bovin, α_8 -fibronectine et α_8 -vinculine. Toutefois, le TGF- β_1 ne semblait pas affecter, chez les deux types cellulaires, l'expression de la F-actine, la vinculine, le collagène synthétisé par les cellules, l' α_1 et les interactions suivantes : fibronectine-collagène (synthétisé par les cellules), α_1 -fibronectine et α_1 -vinculine.

Également, nous avons observé par immunobuvardage une augmentation significative de l'expression de l' α_8 après 24 h de stimulation au TGF- β_1 chez les fibroblastes cardiaques et après 24 h et 48 h de stimulation au TGF- β_1 chez les VSMC. Nous avons aussi noté, par cette même étude, que la stimulation au TGF- β_1 n'avait pas d'effet significatif sur l'expression de l' α_1 chez les deux types cellulaires.

De plus, nous avons observé par un test de radio-liaison une augmentation significative de l'expression de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ après 48 h de stimulation au TGF- β_1 autant chez les fibroblastes cardiaques que chez les VSMC.

Enfin, nous avons noté, par zymographie, que l'activité enzymatique de la MMP-2 n'était pas affectée par la stimulation au TGF- β_1 chez les deux types cellulaire.

Bref, nous croyons que l'utilisation d'une matrice de collagène à trois dimensions pour notre étude nous a permis d'obtenir des résultats plus représentatifs des conditions de la matrice des tissus.

Mots clés :

- Collagène
- Fibronectine
- Intégrine
- F-actine
- Vinculine
- MMP

SUMMARY

For the study of TGF- β_1 effects on cardiac fibroblasts and VSMC interactions, we used three-dimensional collagen matrix as a cell support.

The matrix contractility study showed that TGF- β_1 contract the matrix of both cell types.

Furthermore, the immunocytochemical studies seemed to show that TGF- β_1 upregulate, for both cell types, fibronectin, α_8 and increase actin filaments-fibronectin, fibronectin-bovine collagen, α_8 -fibronectin and α_8 -vinculin interactions. However, TGF- β_1 didn't seem to affect, for both cell types, F-actin, vinculin, collagen synthesized by cells, α_1 expressions and fibronectin-collagen (synthesized by cells), α_1 -fibronectin and α_1 -vinculin interactions.

Also, we observed by immunoblotting a significant increase of α_8 expression after 24 h TGF- β_1 stimulation for cardiac fibroblasts and after 24 h and 48 h of TGF- β_1 stimulation for VSMC. We also noted, by this study, that TGF- β_1 stimulation had no significant effect on α_1 expression of both cell types.

Furthermore, we observed, by radio-binding test, a significant increase of integrin $\alpha_8\beta_1$ expression after 48 h of TGF- β_1 stimulation for cardiac fibroblasts and VSMC.

Finally, we noted, by zymography, that enzymatic activity of MMP-2 don't affected by TGF- β_1 stimulation for both cell types.

We think that three-dimensional collagen matrix we permitted to obtain much representative results.

Key words :

- Collagen	- F-Actin
- Fibronectin	- Vinculin
- Integrin	- MMP

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
SUMMARY	iii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
DÉDICACE	xiv
REMERCIEMENTS	xv
CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION	1
1. Système cardiovasculaire	2
1.1. Cœur	2
1.1.1. Composantes cellulaires du myocarde	2
1.2. L'aorte	3
2. Intégrines	4
2.1. Structure des intégrines	5
2.1.1. La sous-unité α	5
2.1.2. La sous-unité β	6
2.2. Fonction des intégrines	8
2.3. Interaction intégrine-ligand	9
2.3.1. Ligands extracellulaires	9
2.3.2. Sites de liaison des intégrines	10
2.4. Signalisation des intégrines	13
2.4.1. Signalisation bidirectionnelle	14
2.4.2. Protéines intracellulaires associées aux intégrines	14
2.4.3. Foyer d'adhésion	16
2.4.4. Voie de signalisation intracellulaire	17
2.5. Intégrines retrouvées dans les fibroblastes cardiaques	18
2.6. Intégrines retrouvées dans les VSMC	20

2.7. Régulation des intégrines dans le remodelage cardiaque et les maladies vasculaires	20
3. Matrice extracellulaire (MEC)	20
3.1. Composantes de la MEC	22
3.1.1. Collagène	22
3.1.2. Fibronectine	23
3.2. La dégradation de la MEC	25
3.2.1. Les métalloprotéases matricielles (MMP)	25
3.3. La MEC à deux dimensions versus la MEC à trois dimensions	27
4. Facteurs qui altèrent l'expression des intégrines, des composantes du milieu intracellulaire et des composantes de la MEC	28
4.1. Facteur de croissance transformant (TGF- β)	29
4.1.1. Effets du TGF- β_1 sur les intégrines, les composantes du milieu intracellulaire et les composantes de la MEC	30
5. Objectif	32
6. Hypothèses	32
CHAPITRE DEUX : MATÉRIEL ET MÉTHODES	33
CHAPITRE TROIS : RÉSULTATS	55
CHAPITRE QUATRE : DISCUSSION	90
CONCLUSION	101
RÉFÉRENCES	102

LISTE DES FIGURES

Chapitre Premier

FIGURE 1	Structure d'une intégrine	7
FIGURE 2	Schéma représentant les différentes intégrines	7
FIGURE 3	Structure tridimensionnelle de la fibronectine	12
FIGURE 4	Représentation de l'interaction du motif RGD avec une intégrine	12
FIGURE 5	Les différents patrons par lesquels les intégrines peuvent se lier au cytosquelette d'actine	15
FIGURE 6	Représentation d'un modèle de foyer d'adhésion	17
FIGURE 7	Représentation des composantes de FAK	19
FIGURE 8	Différentes voies de signalisation impliquant la protéine FAK	19
FIGURE 9	Représentation de la triple hélice de collagène	24
FIGURE 10	Structure de la fibronectine	24
FIGURE 11	Les différentes MMP et leurs domaines	27

Chapitre Deux

FIGURE 12	Les différentes tensions subies par les matrices extracellulaires à trois dimensions	47
FIGURE 13	Représentation de matrices isométriques	51
FIGURE 14	Immunobuvardage avec l'anti-fibronectine	51

Chapitre Trois

FIGURE 15	Étude de la contraction des matrices isotoniques contenant des fibroblastes cardiaques	57
FIGURE 16	Étude de la contraction des matrices isotoniques contenant des VSMC	58
FIGURE 17	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la F-actine et la fibronectine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	60
FIGURE 18	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la F-actine et la fibronectine des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	61
FIGURE 19	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la fibronectine et le collagène bovin des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	63
FIGURE 20	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la fibronectine et le collagène bovin des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	64
FIGURE 21	Immunocytochimie étudiant l'interaction entre la fibronectine et le collagène synthétisé par les fibroblastes cardiaques en fonction du temps et de la stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	65
FIGURE 22	Immunocytochimie étudiant l'interaction entre la fibronectine et le collagène synthétisé par les VSMC en fonction du temps et de la stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	66
FIGURE 23	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la fibronectine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	68
FIGURE 24	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la fibronectine des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	69

FIGURE 25	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la vinculine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	70
FIGURE 26	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la vinculine des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	71
FIGURE 27	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la fibronectine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	73
FIGURE 28	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la fibronectine des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	74
FIGURE 29	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la vinculine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	75
FIGURE 30	Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la vinculine des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)	76
FIGURE 31	Étude, par immunobuvardage, de l'expression de la sous-unité α_8 de l'intégrine des fibroblastes cardiaques, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	80
FIGURE 32	Étude, par immunobuvardage, de l'expression de la sous-unité α_8 de l'intégrine des VSMC, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	81
FIGURE 33	Étude, par immunobuvardage, de l'expression de la sous-unité α_1 de l'intégrine des fibroblastes cardiaques, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	83

FIGURE 34	Étude, par immunobuvardage, de l'expression de la sous-unité α_1 de l'intégrine des VSMC, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	84
FIGURE 35	Étude, par test de radio-liaison, de l'expression de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ des fibroblastes cardiaques, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	85
FIGURE 36	Étude, par test de radio-liaison, de l'expression de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ des VSMC, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	86
FIGURE 37	Étude, par zymographie, de l'activité enzymatique de la MMP-2 du DMEM des fibroblastes cardiaques, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	88
FIGURE 38	Étude, par zymographie, de l'activité enzymatique de la MMP-2 du DMEM des VSMC, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)	89

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre Premier

TABLEAU I	Les ligands des intégrines et leurs séquences de reconnaissance	11
-----------	---	----

Chapitre Deux

TABLEAU II	Représentation de toutes les expériences immunocytochimiques qui ont été effectuées, ainsi que la concentration des anticorps utilisés	50
------------	--	----

TABLEAU III	Résumé des anticorps utilisé pour l'immunobuvardage, ainsi que de leur concentration	53
-------------	--	----

Chapitre Trois

TABLEAU IV (A)	Résumé des résultats obtenus en immunocytochimie sur les effets du TGF- β_1 (Première partie)	77
----------------	---	----

TABLEAU IV (B)	Résumé des résultats obtenus en immunocytochimie sur les effets du TGF- β_1 (Deuxième partie)	78
----------------	---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ang II	Angiotensine II
ANOVA	Analyse de variance
Arg	Arginine
Arp	Complexe de protéines relié à l'actine
Asp	Aspartate
BCA	Bicinchoninic Acid
BSA	Albumine de sérum bovin
CAS	<i>Crk-associated-substrate</i>
DGEA	aspartate-glycine-glutamine-alanine
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
F.C.	Fibroblaste cardiaque
F-actine	Filament d'actine
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FAT	<i>Focal adhesion targeting</i>
FBS	Sérum bovin fœtal
FN	Fibronectine
FYFDLR	Phénylalanine-tyrosine-phénylalanine-aspartate-leucine
Gly	Glycine
GRAF	<i>GTPase regulator associated with focal adhesion kinase</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein-2</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
ICAM	Molécule d'adhésion intracellulaire
IGF-1	Facteur de croissance insulino-mimétique 1
ILK	Kinase associée à l'intégrine
KQAGDV	Lysine-glutamine-alanine-glycine-aspartate-valine
KRLDGS	Lysine-arginine-leucine-aspartate-glycine-sérine
L/IET	Leucine/isoleucine-glutamate-thréonine
LAP	Peptide associé latent

LDV	Leucine-aspartate-valine
LTBP-1	Protéine de liaison pour le TGF- β_1 latent
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MIDAS	<i>Metal ion-dependent adhesion site</i>
MMP	Métalloprotéase matricielle
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propane sulfonate</i>
MP	Membrane plasmique
MT-MMP	Métalloprotéase matricielle transmembranaire
NGS	Sérum de chèvre
OCT	Température pour la coupe optimale
P	Phosphorylation
PBS	Tampon phosphate salin
PFI	Protéine de filament contractile intermédiaire
PI-5K	Kinase phosphatidyl-5-inositide
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate
PIPKI γ	Phosphatidylinositol phosphate kinase de type I γ
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PR	Proline
RE	Réticulum endoplasmique
RGD	Arginine-glycine-aspartate
ROCK	<i>Rho-associated kinase</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SH	<i>SRC homology</i>
SM	Muscle lisse
SRC	<i>Sarcoma gene</i>
TBS	Tampon Tris-NaCl
TGF- β	Facteur de croissance transformant β
TIMP	Inhibiteur tissulaire des métalloprotéases
TRITC	Tétraméthylrhodamine B isothiocyanate
Tyr	Tyrosine
VCAM	Molécule d'adhésion des cellules vasculaire

VN	Vinculine
VSMC	Cellules musculaires lisses vasculaires
YYGDLR	Tyrosine-tyrosine-glycine-aspartate-leucine-arginine

Dédicace

À mes parents, Juliette Couture et Marcel Pepin

À mon amour, Patrick Marcouiller

À mes deux frères, Denis et Daniel Pepin

À ma belle-sœur, Annie Boucher

À ma marraine, Colette Couture

À ma tante, Gisèle Couture

*À ma belle-famille : Jean-Paul, Micheline, Alain et
Marie-Claude*

À mes amis, Aline Carrier et Déitan Morin

*Je vous remercie de m'avoir encouragé tout au long
de mes études*

Julie Pepin

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr. Gaétan Thibault pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Votre expertise et votre gentillesse ont fait en sorte que mes dernières années d'études ont été les plus enrichissantes et... amusantes !!!

Merci à la Société québécoise d'hypertension artérielle pour le support financier au cours de l'année 2003-2004.

Merci Geneviève pour ton amitié et, bien sûr, pour ton aide technique. Sans toi, j'ai l'impression que je ferais encore des WESTERNS!

Merci Fatiha pour ton aide et tous les bons conseils. Je garderai de très bons souvenirs des congrès auxquels nous sommes allées et de ta complicité pour taquiner Dr. Thibault. Surtout n'oublie pas qu'avec Groleau...

Thank you Ramin for your kindness and your good advices. I wish you two things: first, a Nobel Price and, secondly, that Patrick's pictures of your Christmas card never appear in newspaper.

Merci à Christian Charbonneau, pour l'aide précieuse à la microscopie, et à Annie Vallée pour les coupes au cryostat.

Merci à Pascal Brassard pour l'aide fournie lors de l'étude zymographique.

Merci à Angela Anton et Jennifer Michel pour leur amitié et les beaux moments que nous avons passés à étudier comme des débiles!!!

Finalement, un gros merci à tous ceux et celles qui ont su me taquiner tout au long de mon séjour à la maîtrise. Je garde de vous de beaux souvenirs.

CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER : INTRODUCTION

1. Système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est composé du cœur, des vaisseaux sanguins et du sang. Ce système assure la circulation interne des nutriments, de l'O₂, des hormones et des électrolytes aux cellules et au liquide interstitiel. De plus, le système cardiovasculaire a pour rôle de recueillir le CO₂ et les déchets produits par l'organisme (Campbell, 1995; Sherwood, 1997; Tortora et Grabowski, 1999). Pour ce travail, nous allons nous concentrer sur le cœur et l'aorte, un des importants vaisseaux du système cardiovasculaire.

1.1. Cœur

Le cœur est une pompe, constituée de deux oreillettes et de deux ventricules, qui propulse le sang dans tout le corps via les vaisseaux sanguins (Tortora et Grabowski, 1999; Downey et Heuch, 2001). La paroi du cœur est composée des couches suivantes : l'**épicarde**, le **myocarde** et l'**endocarde**. L'**épicarde** est la couche externe, mince et transparente de la paroi. Elle est composée de mésothélium et de tissu conjonctif. L'**endocarde**, un feuillet endothélial, tapisse la surface interne du myocarde. Le **myocarde**, la couche à laquelle nous accordons plus d'importance, forme la majeure partie de la paroi cardiaque et est responsable de l'action de pompage. En effet, les cellules qui composent le myocarde sont unies aux cellules voisines par des disques intercalaires. Ces derniers renferment des synapses électriques permettant aux potentiels d'action de se propager d'une cellule à l'autre (Tortora et Grabowski, 1999).

1.1.1. Composantes cellulaires du myocarde

Le myocarde, un tissu hautement organisé, est divisé en deux compartiments : les cardiomyocytes et l'interstice (Pelouch et *al.*, 1993; Walker et Spinale, 1999).

Les cardiomyocytes constituent 75 % de l'espace total du myocarde, mais seulement le tiers des cellules totales. Ces cellules sont les plus énergiques du corps (Haisong et Dixon, 1996;

Severs, 2000). Les cardiomyocytes assurent la contraction et la viabilité du cœur (Weber, 1989; Pelouch et *al.*, 1993).

En ce qui concerne l'interstice, l'espace se retrouvant entre les cardiomyocytes, il compte pour les deux tiers de la population cellulaire. Cet espace joue un rôle important dans l'organisation et le support des cardiomyocytes. De plus, l'interstice assure un mécanisme de défense contre les corps étrangers, favorise l'échange des substrats entre les cardiomyocytes et leurs capillaires et facilite la contraction des cardiomyocytes (Weber, 1989). L'interstice contient du collagène (en grande majorité de type I et III), de l'élastine, des cellules plasmatiques, de la fibronectine, des glycosaminoglycanes, des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques, des terminaisons nerveuses adrénérgiques, des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), des cellules endothéliales et des fibroblastes cardiaques. Ces derniers sont les composants les plus importants de l'interstice (Robinson et *al.*, 1983; Weber, 1989; Pelouch et *al.*, 1993; Haisong et Dixon, 1996; Weber, 1997; Walker et Spinale, 1999).

Les fibroblastes cardiaques sont des cellules allongées et bipolaires, constituant 95 % des cellules non-cardiomyocytaires (Tomasek et Hay, 1984; Eghbali et *al.*, 1988; Eghbali et *al.*, 1989). Ces cellules sont impliquées dans la synthèse et la dégradation des composantes de la matrice extracellulaire (MEC). Ainsi, elles produisent le collagène de type I et III, la fibronectine, la laminine, les facteurs de croissance, les cytokines et les métalloprotéases matricielles (MMP). Ces composantes sont impliquées dans le maintien de la structure du myocarde et dans le remodelage cardiaque (Eghbali et *al.*, 1991; Zeydel et *al.*, 1991; Manabe et *al.*, 2002).

Au cours de ce travail, nous allons concentrer notre étude sur les fibroblastes cardiaques, étant donné leur importance dans le myocarde.

1.2. L'aorte

L'aorte constitue la principale artère de la circulation systémique. Son élasticité lui permet de s'élargir, afin d'absorber la pression systolique, et de revenir à son diamètre initial, pour maintenir une pression diastolique positive (Morse, 1979). L'aorte possède les trois

tuniques suivantes : l'**intima**, la **média** et l'**adventitia**. L'**intima** est la tunique interne de l'aorte. Elle est composée de myofibroblastes, de fibres élastiques, d'une couche de cellules endothéliales et de VSMC (Morse, 1979; Hirst et Gore, 1983). Ces dernières ont un phénotype synthétique assurant la synthèse des composantes de la MEC (Bundy et *al.*, 2000). En ce qui a trait l'**adventitia**, la couche externe de l'aorte, elle est constituée de collagène, de fibroblastes, de VSMC et de fibres élastiques. Cette couche sert à ancrer les vaisseaux aux structures voisines. Finalement, la **média**, la couche centrale, contient des VSMC. (Morse, 1979; Hirst et Gore, 1983). Celles-ci, contrairement aux VSMC de l'intima, ont un phénotype contractile. Ces VSMC, riches en protéines de filaments contractiles intermédiaires (PFI), maintiennent le tonus du vaisseau. Toutefois, il est démontré que les VSMC migrant ou proliférant deviennent synthétiques. Elles se caractérisent par une réduction de protéines contractiles. De plus, tout comme les VSMC de l'intima, elles synthétisent les composantes de la MEC (Bundy et *al.*, 2000; Johnson et *al.*, 2001).

Comme pour les fibroblastes cardiaques, nous allons accorder une importance particulière aux VSMC de la média.

2. Intégrines

Les intégrines, une grande famille de récepteurs transmembranaires, attachent la cellule à la MEC ou à une cellule voisine (Hynes, 2002). Ces récepteurs permettent à la cellule de percevoir l'environnement (Hsueh et *al.*, 1998). De plus, les intégrines se lient aux composantes intracellulaires (taline, α -actinine), ce qui fournit une interaction dynamique entre la MEC et l'intérieur de la cellule (Ross et Borg, 2001). Les intégrines peuvent être exprimées dans plusieurs types cellulaires, dont les composantes cellulaires du système cardiovasculaire. De plus, les cellules peuvent exprimer plusieurs types d'intégrines (Hynes, 1992; Ross et Borg, 2001). Les intégrines sont essentielles à la survie des cellules et, par le fait même, de l'organisme.

Au cours de ce travail, nous allons étudier davantage les intégrines se liant aux composantes de la MEC.

2.1. Structure des intégrines

Les intégrines sont des hétérodimères composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Ces dernières sont unies par un lien non-covalent. (Buck et Horwitz, 1987; Ruoslahti et Pierschbacher, 1987; Hynes, 1992; Liu et *al.*, 2000; Pham et *al.*, 2000). Les deux sous-unités ont un long domaine extracellulaire (700 à 1100 acides aminés), permettant de se lier à la MEC, un domaine hydrophobique transmembranaire et un court domaine cytoplasmique (20 à 60 acides aminés) qui se lie au cytosquelette (Albelda et Buck, 1990; Hynes, 1992; Schwartz et *al.*, 1995; Meredith et *al.*, 1996; Humphries, 2000; Liu et *al.*, 2000). Toutefois, contrairement aux autres sous-unités, β_4 a un domaine cytoplasmique de 1000 acides aminés (Figure 1, p.7).

À ce jour, il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β celles-ci s'associant pour former 24 intégrines différentes (Ross et Borg, 2001) (Figure 2, p.7). Il est aussi à noter qu'une sous-unité α peut se lier à différentes sous-unités β et que l'inverse est aussi vrai (Ruoslahti, 1991).

2.1.1. La sous-unité α

La sous-unité α , une glycoprotéine ayant un poids moléculaire variant de 120 kDa à 180 kDa (Hynes, 1992; Giancotti et Ruoslahti, 1999), a une série de sept séquences homologues (d'environ 60 acides aminés chacune) dans la région N-terminale (Hynes, 1992; Giancotti et Ruoslahti, 1999; Humphries, 2000). À partir de la troisième ou la quatrième séquence, il y a la série d'acides aminés Asp-x-Asp-x-Asp-Gly-x-x-Asp qui contribue à la liaison de l'intégrine aux cations divalents (magnésium ou manganèse). Ceux-ci affectent l'affinité et la spécificité de l'intégrine pour le ligand, étant donné que la liaison intégrine-ligand dépend de la présence de cation, et sont essentiels pour l'association des sous-unités α et β de quelques intégrines (Gailit et Ruoslahti, 1988; Kirchhofer et *al.*, 1990, 1991; Humphries et *al.*, 2003). Toutefois, il est à noter que le cation calcique a l'effet opposé sur les intégrines (Humphries et *al.*, 2003).

Les sous-unités alpha peuvent être divisées en deux catégories, la première comprenant les sous-unités α qui ont un domaine I dans leur région N-terminale. Ce domaine d'environ 200 acides aminés de long est retrouvé entre la deuxième et la troisième séquence répétitive des sous-unités suivantes : $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_{10}, \alpha_{11}, \alpha_D, \alpha_E, \alpha_L, \alpha_M, \alpha_X$. Le domaine I contenant un motif metal ion-dependent adhesion site (MIDAS), qui est un site de liaison pour un cation, joue un rôle central dans la liaison de l'intégrine avec le ligand (Mould, 1996; Fernandez et *al.*, 1998; Curley et *al.*, 1999; Emsley et *al.*, 2000). La deuxième englobe les sous-unités α qui ont un site de clivage protéolytique. Ce dernier étant retrouvé près du domaine transmembranaire des sous-unités $\alpha_3, \alpha_5, \alpha_6, \alpha_7, \alpha_8, \alpha_{11b}$ et α_v et est relié par un pont disulfure (Fernandez et *al.*, 1998).

2.1.2. La sous-unité β

Les sous-unités β , des glycoprotéines de poids moléculaire variant entre 90 kDa et 110 kDa (Hynes, 1992), sont similaires entre-elles. En effet, leurs séquences en acides aminés ont 40 à 48 % d'homologie (Hemler, 1990). Leur domaine extracellulaire inclut quatre répétitions de 40 acides aminés riches en motif cystéine. Ces séquences riches en cystéine, reliées par un pont disulfure, sont importantes pour la voie de signalisation et pour l'intégrité du récepteur (Hynes, 1990; Calvete et *al.*, 1991; Hynes, 1992; O'Neill et *al.*, 2000; Beglova et *al.*, 2002). De plus, la sous-unité β a une région de 200 acides aminés, hautement conservée, similaire au domaine I de la sous-unité α . Tout comme pour la sous-unité α , le domaine I putatif de la sous-unité β lie un cation et est impliqué dans la liaison intégrine-ligand (Mould, 1996; Fernandez et *al.*, 1998; Curley et *al.*, 1999; Emsley et *al.*, 2000). Pour ce qui est du domaine cytoplasmique de cette sous-unité, il est essentiel pour la liaison de l'intégrine aux patrons de signalisation. En effet, même en l'absence du domaine transmembranaire et du domaine extracellulaire, la sous-unité β peut participer à la transduction du signal via le domaine cytoplasmique. Cette fonction, étant régulée par l'épissage alternatif du domaine intracellulaire de la sous-unité β , est impliquée dans plusieurs processus cellulaires. (Akiyama et *al.*, 1994).

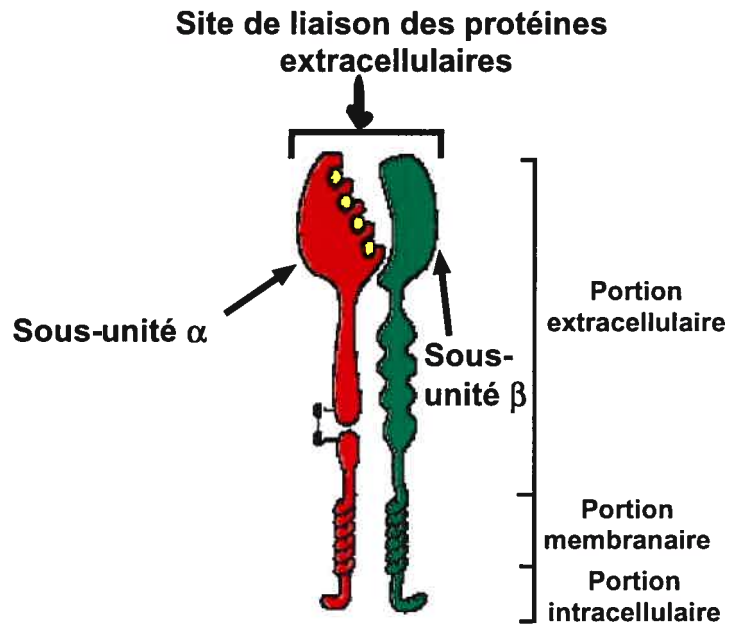


Figure 1: Structure d'une intégrine

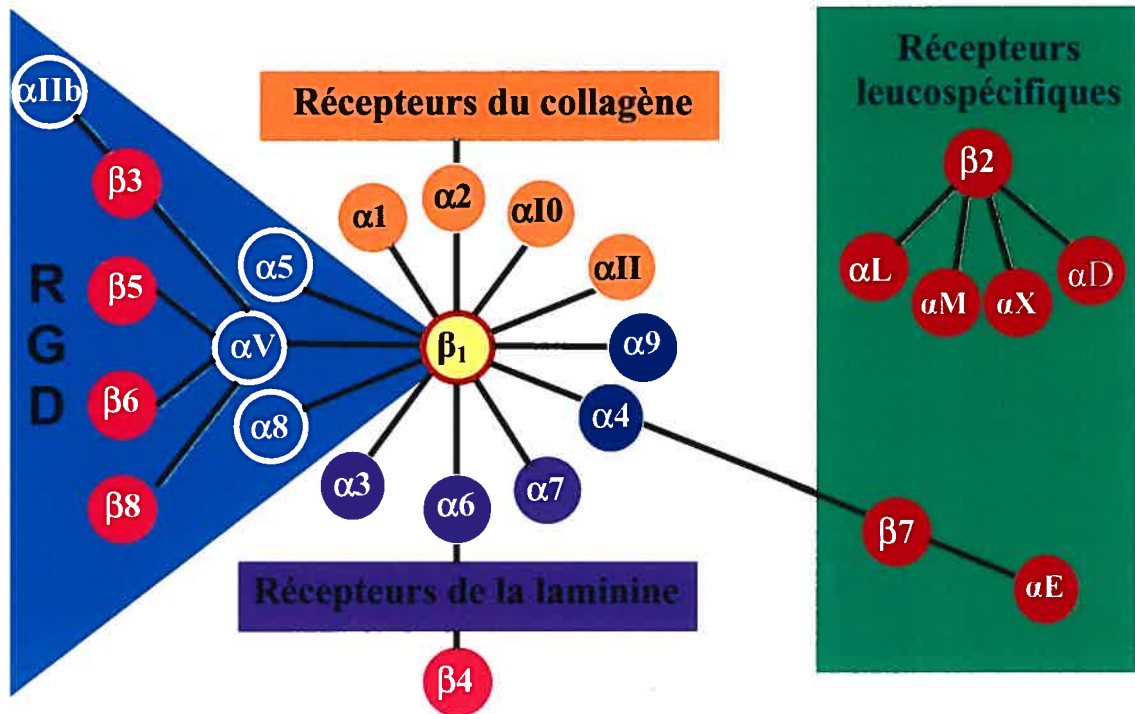


Figure 2 : Schéma représentant les différentes intégrines

2.2. Fonction des intégrines

Les intégrines, liant la MEC au cytosquelette, ont un rôle important à jouer à différents niveaux. Elles sont impliquées dans les fonctions suivantes : l'adhésion, la croissance, la migration, la prolifération et la différenciation. Par ces fonctions, les intégrines sont impliquées dans plusieurs processus, tels que : le développement, la croissance, l'homéostasie, la création et l'organisation de la MEC, le maintien de l'intégrité des tissus, la réorganisation du cytosquelette, la régulation des fonctions cellulaires, l'expression des gènes, la survie et la mort cellulaire (Hynes, 1990; Hynes, 1992; Clark et Brugge, 1995; Miyamoto et *al.*, 1995; Schwartz et *al.*, 1995; Meredith et *al.*, 1996; Mould, 1996; Giancotti, 1997; Humphries, 2000; Kawano et *al.*, 2000; Ross et Borg, 2001; Ross 2002).

En plus, ces récepteurs jouent un rôle important dans la défense de l'organisme. En effet, les intégrines participent à l'agrégation des plaquettes, aux fonctions immunitaires, à la guérison des infections et à la réparation des tissus (Ruoslahti, 1991).

Par conséquent, les intégrines, ayant une grande importance dans le maintien de l'organisme, sont aussi impliquées dans plusieurs maladies. C'est le cas de l'arthrite, l'inflammation chronique, le cancer, la thrombose, l'hypertrophie, la fibrose pour ne nommer que ceux-ci (Hynes, 1990).

Comme nous pouvons le constater, les intégrines ont plusieurs rôles. Cependant, quelle est son utilité au niveau du système cardiovasculaire ?

L'expression et la fonction des intégrines, retrouvées dans toutes les composantes cellulaires du système cardiovasculaire (Ross, 2002), sont essentielles pour la fonction cardiovasculaire normale et la formation d'un cœur normal (Markwald, 1979; Payne et *al.*, 1995; Hornberger et *al.*, 2000; Farrel et Kirby, 2001). En effet, les intégrines régulent l'action entre les cardiomyocytes, les protéines de la MEC et le cytosquelette du cœur (Borg et Burgess, 1993). De plus, il semble que ces récepteurs d'adhésion jouent un rôle dans l'information positionnelle qui est essentielle pour la myofibrillogenèse, la

migration, la différenciation cellulaire, l'organogenèse et l'homéostasie des fonctions cardiaques. (Borg et Terracio, 1990; Ross et Borg, 2001).

2.3. Interaction intégrine-ligand

Le domaine extracellulaire des intégrines se lie aux protéines formant la MEC (Hsueh et *al.*, 1998), lors de l'interaction cellule-MEC, et à des immunoglobulines, lors de la liaison cellule-cellule. Une intégrine peut se lier à différents ligands et ces ligands peuvent être reconnus par plusieurs intégrines (Ruoslahti, 1991; Hynes, 1992; Ross et Borg, 2001).

2.3.1. Ligands extracellulaires

Les intégrines peuvent se lier à plusieurs composantes de la MEC. C'est le cas de la fibronectine, du collagène, de la laminine, de l'entactine, de la tenascine, de la vitronectine, de la thrombospondine, du facteur de von Willebrand, de la sialoprotéine, de l'ostéopontine et bien d'autres (Ruoslahti et Pierschbacher, 1987; Hemler, 1990; Broberg et Heino, 1996; Hsueh et *al.*, 1998). La force de liaison des intégrines avec ces protéines détermine l'étendue à laquelle les cellules adhèrent, migrent, différencient et prolifèrent (Meredith et *al.*, 1996; Giancotti, 1997) (Tableau I, p.11).

Afin qu'il y ait une interaction, les intégrines doivent se lier à un site de reconnaissance du ligand (Tableau I, p.11). Pour ce travail, nous allons accorder une attention particulière au site RGD, étant donné que c'est le motif qui est reconnu par le plus grand nombre d'intégrines (Ruoslahti, 1996).

Le motif RGD est une séquence d'acides aminés arginine-glycine-aspartate. Il est détecté par les intégrines $\alpha_{11b}\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$, et sous certaines conditions, par les intégrines $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ et $\alpha_7\beta_1$. Ce motif est retrouvé dans la fibronectine, la vitronectine, l'épiligrine, la sialoprotéine, la tenascine, la fibrinogène, l'entactine, la laminine, le facteur de von Willebrand, la thrombospondine, le collagène et l'ostéopontine (Ruoslahti et Pierschbacher, 1987; Hynes, 1992; Ruoslahti, 1996; Ruoslahti, 1997; van der Flier et Sonnenber, 2001).

Afin de favoriser l'interaction intégrine-ligand, le motif RGD doit être accessible. Par exemple, dans le cas de la fibronectine, la séquence RGD se retrouve sur une boucle se dirigeant vers l'extérieur. Cette localisation facilite donc l'interaction intégrine-ligand (Figure 3, p.12) (Leahy et *al.*, 1992; Dickinson et *al.*, 1994; Leahy et *al.*, 1996; Leahy, 1997).

De plus, il est à noter que toutes les composantes du motif RGD ont un rôle important à jouer. En effet, les chaînes arginine et aspartate, qui sont opposées, mettent en contact l'hélice de la sous-unité α et le domaine I de la sous-unité β respectivement. Pour ce qui est de la glycine, elle lie l'interface entre la sous-unité α et β (Xiong et *al.*, 2002) (Figure 4, p.12).

2.3.2. Sites de liaison des intégrines

Avant de passer à la signalisation, il est d'abord essentiel de définir les régions importantes pour la liaison des intégrines aux ligands. Plusieurs études ont été faites, afin de comprendre comment se lie les intégrines (détermination des sites de liaisons du peptide ligand, la localisation de l'épitope d'un anticorps monoclonal inhibiteur, l'analyse des intégrines mutantes et l'expression de fragments d'intégrines recombinantes) (Mould, 1996).

Il a été démontré que le domaine I, qui compose quelques sous-unités α ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_{10}, \alpha_{11}, \alpha_D, \alpha_E, \alpha_L, \alpha_M, \alpha_X$), est impliqué dans la reconnaissance du ligand (Tuckwell et *al.*, 1996). Toutefois, ce ne sont pas toutes les sous-unités α qui ont un domaine I et nous avons très peu d'information en ce qui a trait le site de liaison de ces dernières.

Intégrines		Ligands	Séquences de reconnaissance	
β_1	α_1	collagène, laminine		
	α_2	collagène, laminine	DGEA, (RGD), YYGDLR, FYFDLR	
	α_3	fibronectine, laminine, collagène, épiligrine, thrombospondine	(RGD)	
	α_4	fibronectine, VCAM-1	LDV, (RGD)	
	α_5	fibronectine	RGD, (KQAGDV), (LDV)	
	α_6	laminine		
	α_7	laminine	(RGD)	
	α_8	fibronectine, tenascine, vitronectine et ostéopontine	RGD	
	α_9	tenascine, collagène, laminine		
	α_{10}	collagène		
	α_{11}	collagène I		
	α_V	vitronectine, fibronectine, ostéopontine	RGD	
	β_2	α_D	ICAM, VCAM	
		α_L	ICAM	L/IET
α_M		fibrinogène, facteur X, ICAM-1, ICAM-2	KRLDGS	
α_X		fibrinogène		
β_3	α_{IIb}	fibrinogène, facteur de von Willebrand, fibronectine, vitronectine, thrombospondine, collagène	RGD, KQAGDV	
	α_V	vitronectine, fibrinogène, fibronectine, thrombospondine, facteur de von Willebrand, laminine, ostéopontine, tenascine, sialoprotéine	RGD, KRLDGS	
β_4	α_6	laminine		
β_5	α_V	vitronectine, ostéopontine	RGD	
β_6	α_V	fibronectine, tenascine	RGD	
β_7	α_4	fibronectine, VCAM-1	LDV	
β_7	α_E	E-cadhérine		
β_8	α_V	collagène, laminine, fibronectine	RGD	

Tableau I : Les ligands des intégrines et leurs séquences de reconnaissance

DGEA : aspartate-glycine-glutamine-alanine, FYFDLR : Phénylalanine-tyrosine-phénylalanine-aspartate-leucine, ICAM : Molécule d'adhésion intracellulaire, KQAGDV : Lysine-glutamine-alanine-glycine-aspartate-valine, KRLDGS : Lysine-arginine-leucine-aspartate-glycine-sérine; LDV : Leucine-aspartate-valine; L/IET : Leucine/isoleucine-glutamate-thréonine, RGD: Arginine-glycine-aspartate, YYGDLR: Tyrosine-tyrosine-glycine-aspartate-leucine-arginine, VCAM : Molécule d'adhésion des cellules vasculaires

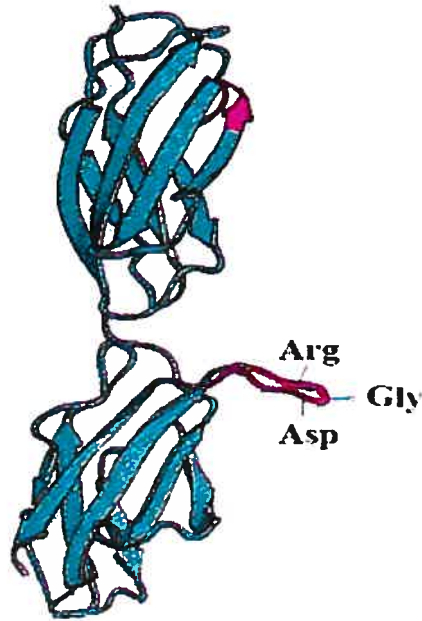


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la fibronectine
 Arg : Arginine, Asp : Aspartate, Gly : Glycine
 (modifiée d'Alberts et *al.*, 2002)

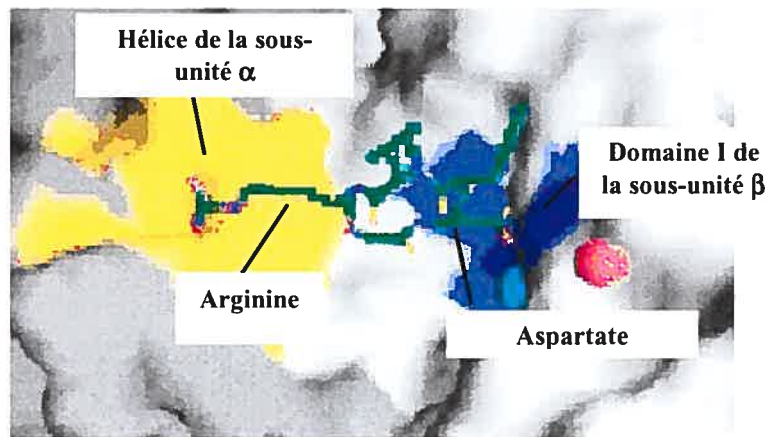


Figure 4 : Représentation de l'interaction du motif RGD avec une intégrine (modifiée d'Arnaout et *al.*, 2002)

Plusieurs études ont démontré qu'il y a plusieurs sites dans la région N-terminale de la sous-unité α et β qui coopèrent dans la reconnaissance du ligand (D'Souza et *al.*, 1990; Smith et Cheresch., 1990; Takada et Puzon, 1993; Irie et *al.*, 1995; Kamata et *al.*, 1995; Schiffer et *al.*, 1995; Loftus et *al.*, 1996). C'est le cas, entre autre, de l'hélice β de la sous-unité α (Springer, 1997) et du motif MIDAS du domaine I putatif de la sous-unité β (D'Souza et *al.*, 1988; Tidswell et *al.*, 1997; Chen et *al.*, 1998; Mould et *al.*, 1998; Zhang et Plow, 1999; Mould et *al.*, 2000). En ce qui a trait le domaine I putatif de la sous-unité β , il a même été démontré, dans plusieurs cas, qu'il y a perte de la liaison au ligand suite à une mutation de ce domaine (Loftus et *al.*, 1990; Takada et *al.*, 1992; Bajt et *al.*, 1995).

2.4. Signalisation des intégrines

Les intégrines n'agissent pas seulement comme médiateur de l'adhésion cellulaire, mais comme transducteur de signaux à travers la membrane cellulaire. Ce rôle contribue à la coordination de l'actine et à l'organisation de la réponse cellulaire face aux composantes de la MEC et aux facteurs de croissance (Juliano et Haskill, 1993; Clark et Brugg, 1995; Longhurst et Jennings, 1998; Shattil et *al.*, 1998; Giancotti et Ruoslahti, 1999).

Par leurs liaisons, les intégrines peuvent transmettre leurs signaux de façon bidirectionnelle. En effet, les intégrines peuvent envoyer un signal provenant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (*outside-in*) et transmettre un signal de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur (*inside-out*) (Calderwood, 2004). Ces deux mécanismes sont importants pour la fonction des intégrines.

La signalisation se déroule dans les foyers d'adhésion et implique le domaine cytoplasmique des intégrines. Ce dernier interagit avec les composantes du cytosquelette et d'autres protéines intracellulaires.

2.4.1. Signalisation bidirectionnelle

Les intégrines, ne possédant pas d'activité kinase intrinsèque, transmettent les signaux mécaniques et chimiques de façon bidirectionnelle. En d'autres termes, l'activité des intégrines peut être modulée par les cellules et, à leur tour, les intégrines peuvent moduler l'activité des cellules (Damsky et Werb, 1992; Hyne, 1992; Loftus et Liddington, 1997; Ogawa et *al.*, 2000; Ross, 2002).

En effet, un agoniste qui se lie à un récepteur, qui n'est pas une intégrine, enclenche une série d'événements intracellulaires qui, par un changement conformationnel, augmente l'affinité des intégrines pour un ligand (Ross et Borg, 2001). Ce processus est appelé *inside-out*. Aussi, après l'interaction de l'intégrine avec un ligand, il en résulte à une série de signaux intracellulaires qui sont transmis par les intégrines. Il s'agit du mécanisme *outside-in*. Ce dernier peut influencer les activités cellulaires suivantes : la croissance, la morphologie cellulaire, la migration, la prolifération, la différenciation, la survie, l'expression des gènes, la suppression des tumeurs et les changements de pH intracellulaire ou de la concentration cytosolique de calcium (Giancotti et Ruoslahti, 1999; Ross et Borg, 2001).

2.4.2. Protéines intracellulaires associées aux intégrines

La domaine cytoplasmique des intégrines lie une multitude de molécules dont la filamine, la taline, l' α -actinine, la kinase associée à l'intégrine (ILK), la vinculine et bien d'autres (Figure 5, p.15) (Chen et *al.*, 1985; Damsky et *al.*, 1985; Lin et Lin, 1996; Hsueh et *al.*, 1998; Defilippi et *al.*, 1999; Geiger et *al.*, 2001; Zamir et Geiger, 2001; Brakebusch et Fässler, 2003). Ces dernières servent de pont entre l'intégrine et le cytosquelette d'actine. Pour ce travail, nous allons nous attarder sur la taline, la vinculine et le cytosquelette d'actine.

La taline est une grosse protéine de plus de 2500 acides aminés. Le domaine N-terminal de la taline se lie à l'intégrine, aux molécules signales, aux récepteurs (autres que les intégrines) et faiblement au filament d'actine (F-actine) (Horwitz et *al.*, 1986; Chen et *al.*, 1995; Borowsky et Hynes, 1998; Martel et *al.*, 2001; Di Paolo et *al.*, 2002; Ling et

al., 2002). La queue de la taline, ayant une faible affinité pour les intégrines (Yan et *al.*, 2001), a trois sites de liaison pour la vinculine. Pour ce qui est du domaine en C-terminal, il constitue un site de liaison pour la F-actine (Hemmings et *al.*, 1996). Plusieurs études ont démontré que la taline est importante pour la fonction normale des intégrines (Brown et *al.*, 2002).

La vinculine est un lien structural et fonctionnel entre l'actine et l'intégrine. La région globulaire N-terminale contient les sites de liaison pour la taline et l' α -actinine (Jones et *al.*, 1989; Gilmore et *al.*, 1992; Kroemker et *al.*, 1994) et la région C-terminale lie la paxiline, la F-actine et les phospholipides acides (Menkel et *al.*, 1994; Hüttelmaier et *al.*, 1997; Johnson et *al.*, 1998).

La F-actine est liée, par une extrémité, à la membrane plasmique et, par l'autre extrémité, à la vinculine, la taline, l' α -actinine et la paxiline (Burrige et *al.*, 1988). Par cette interaction, le cytosquelette d'actine peut s'ancrer à l'environnement extracellulaire et contrôler la tension nécessaire pour le mouvement de la cellule et l'organisation dans le tissu (Defilippi et *al.*, 1999).

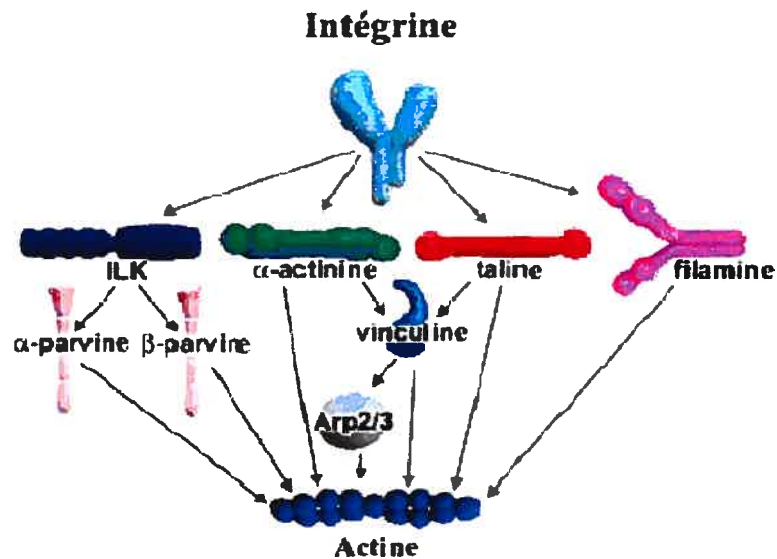


Figure 5 : Les différents patrons par lesquels les intégrines peuvent se lier au cytosquelette d'actine

Arp : Complexe de protéines relié à l'actine, ILK : Kinase associée à l'intégrine (modifiée de Brakebusch et Fässler, 2003)

2.4.3. Foyer d'adhésion

Lorsqu'un ligand extracellulaire se lie à une intégrine et que cette dernière se regroupe avec d'autres intégrines qui sont liées, un complexe organisé se forme. Il s'agit du foyer d'adhésion (Horwitz, 1997) (Figure 6, p. 17).

Le foyer d'adhésion, de forme allongée et plate, est localisé en périphérie de la cellule (Abercrombie et Dunn, 1975; Izzard et Lochner, 1976; Sastry et Burridge, 2000; Zamir et Geiger, 2001). Cette structure contrôle, via les intégrines, la forte adhésion du substrat et ancre un amas de microfilaments d'actine à travers la plaque constituée des protéines suivantes : les protéines du cytosquelette, les intégrines, les protéines kinases, les molécules de signalisation pour ne nommer que celles-ci (Kumar, 1998). En effet, il y a plus de 50 molécules différentes qui ont été retrouvées dans le foyer d'adhésion. Il est à noter que les composantes du foyer d'adhésion ont pour caractéristique d'être des molécules multidomaines qui peuvent interagir avec plusieurs molécules de patrons distincts (DeSimone et Hynes, 1988; Miyamoto et al, 1995; Plopper et *al.*, 1995; Meredith et *al.*, 1996).

Pour maintenir ce foyer d'adhésion, il est important que les intégrines soient intactes, en particulier le domaine cytoplasmique des sous-unités α et β . Il en est ainsi, car ces derniers sont directement liés au complexe de signalisation intracellulaire (Laflamme et *al.* 1992; Ylanne et *al.*, 1993; Shattil et Ginsberg, 1997).

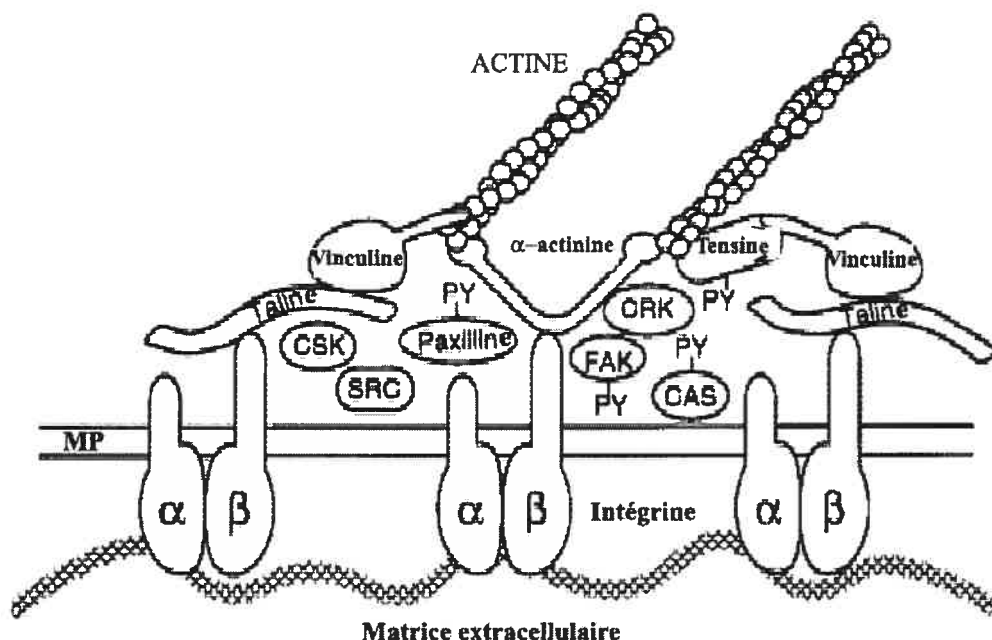


Figure 6 : Représentation d'un modèle de foyer d'adhésion (modifiée de Vuori, 1998)

2.4.4. Voie de signalisation intracellulaire

La signalisation des intégrines implique une multitude de protéines. Une des plus importantes est la *focal adhesion kinase* (FAK). Cette dernière consiste en un domaine kinase entouré d'une région N-terminale et C-terminale (Longhurst et Jennings, 1998). Le domaine N-terminal interagit avec la queue cytoplasmique de l'intégrine (Schaller et *al.*, 1995). Pour ce qui est de la région C-terminale, elle contient deux segments riches en proline (PR1 et PR2) qui facilitent l'interaction avec les protéines contenant un domaine *SRC homology 3* (SH3), telles que *Crk-associated-substrat* (CAS) et *GTPase regulator associated with focal adhesion kinase* (GRAF). De plus, une partie de la région C-terminale, appelée *Focal adhesion targeting* (FAT), est nécessaire pour la localisation du foyer d'adhésion (Longhurst et Jennings, 1998) (Figure 7, p.19).

FAK contient six sites de phosphorylation tyrosine : (Tyr 397, 407, 576, 577, 861, 925) (Calalb et *al.*, 1995; Calalb et *al.*, 1996). Toutefois, l'interaction intégrine-ligand favorise

l'autophosphorylation de FAK au niveau de la Tyr-397, facilitant ainsi la liaison SRC-Fyn. Le complexe FAK-SRC phosphoryle les sites sur CAS, ainsi que la paxiline et la tensine.

D'autres protéines sont recrutées au complexe FAK-SRC, telle que la protéine *Growth factor receptor-bound protein-2* (GRB2). Cette dernière lie FAK au patron *Mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Longhurst et Jennings, 1998) (Figure 8, p.19).

FAK s'associe aussi aux protéines GRAF et ILK et active Rho. Lorsque cette dernière est liée à la guanosine triphosphate (GTP), le complexe interagit avec *Rho-associated kinase* (ROCK) et la protéine pm140mDia, ce qui cause la contraction et la formation d'un foyer d'adhésion (Longhurst et Jennings, 1998) (Figure 8, p.19).

D'autres mécanismes n'impliquant pas FAK, contribuent à la contraction du cytosquelette et à la formation du foyer d'adhésion. C'est le cas de la Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP₂) qui, générée par la Kinase phosphatidyl-5-inositide (PI 5-kinase), forme un complexe avec l' α -actinine et la vinculine. Ainsi, cela crée un site de liaison sur la vinculine pour l'actine et la taline (Longhurst et Jennings, 1998) (Figure 8, p.19).

2.5. Intégrines retrouvées dans les fibroblastes cardiaques

Les fibroblastes cardiaques expriment une grande variété d'intégrines. C'est le cas de l'intégrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$ et peut-être $\alpha_4\beta_1$ (Albelda et Buck, 1990; Belkin et al. 1990; Clover et al. 1992; Mackenna et al., 1998). De plus, les fibroblastes cardiaques ont les intégrines de type RGD suivantes : $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$ et peut-être $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_v\beta_6$ (Mackenna et al., 1998; Thibault et al., 2001).

Pour ce travail, nous allons nous intéresser à l'intégrine $\alpha_1\beta_1$ qui lie le collagène et la laminine, et l'intégrine de type RGD $\alpha_8\beta_1$ qui lie la fibronectine, la vitronectine, la tenascine et l'ostéopontine.

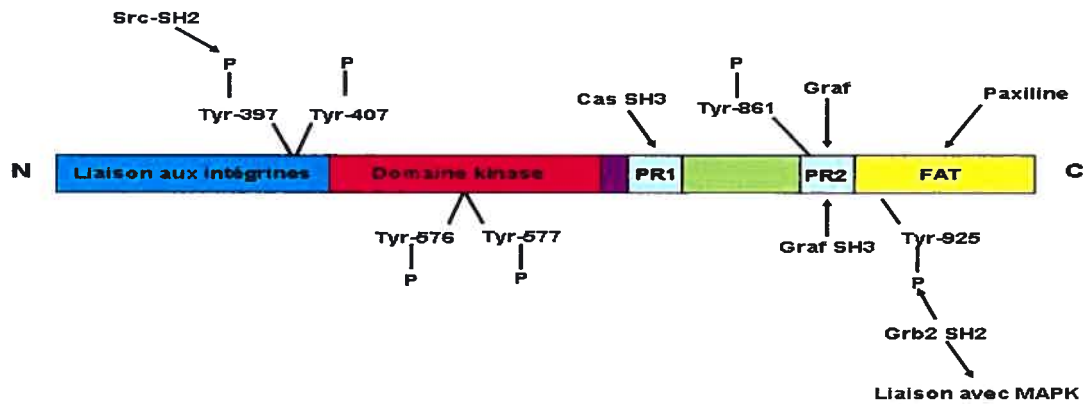


Figure 7 : Représentation des composantes de FAK (modifiée de Longhurst et Jennings, 1998)

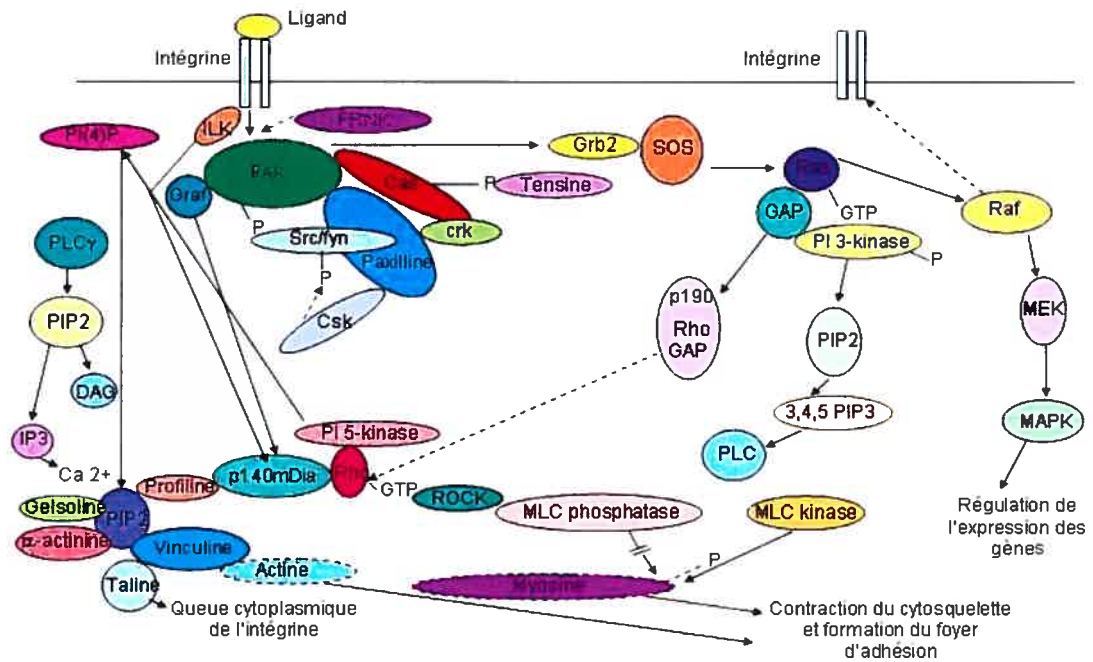


Figure 8 : Différentes voies de signalisation impliquant la protéine FAK (modifiée de Longhurst et Jennings, 1998)

2.6. Intégrines retrouvées dans les VSMC

Comme les fibroblastes cardiaques, les VSMC expriment plusieurs intégrines. Elles expriment, entre autre l'intégrine $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_8\beta_1$ (Clyman et *al.*, 1990; Clyman et *al.*, 1992; Skinner et *al.*, 1994; Yamamoto et Yamamoto, 1994; Lee et *al.*, 1995; Schnapp et *al.*, 1995; Jones et *al.*, 1996; Hillis et *al.*, 1998; Yee et *al.*, 1998).

Pour ce travail, nous allons, tout comme pour les fibroblastes cardiaques, étudier les intégrines $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_8\beta_1$.

2.7. Régulation des intégrines dans le remodelage cardiaque et les maladies vasculaires

Lors de dommages au niveau du myocarde, il y a une augmentation de l'expression des intégrines de type RGD (Hsueh et *al.*, 1998). Cette hausse d'expression favorise l'assemblage de la matrice et l'interaction cellule-matrice. L'augmentation de l'interaction cellule-matrice fait en sorte qu'il y a une hausse de l'activité des voies de signalisation, dont l'activité MAPK, favorisant ainsi la croissance cellulaire et par le fait même le remodelage cardiaque (Hsueh et *al.*, 1998).

Les intégrines peuvent être impliquées dans les maladies vasculaires. En effet, une trop grande expression des intégrines, menant à une plus forte interaction cellule-MEC et cellule-cellule, favorise une plus forte adhésion et à la formation d'agrégat dans les vaisseaux (Williams, 1992). Les agrégats ainsi formés peuvent mener à des thromboses. Afin de résoudre le problème, plusieurs études ont démontrées que l'utilisation d'anti-intégrines était efficace (aspirine) (Schorr, 1999).

3. Matrice extracellulaire

Le réseau complexe de la MEC est composé de deux classes de macromolécules soient, les glycosaminoglycanes et les protéines fibreuses. Cette dernière catégorie inclut le collagène, la fibronectine, la vitronectine, l'élastine et la laminine. Ces molécules sont assemblées

dans un réseau organisé qui est fortement lié avec la surface des cellules qui les synthétisent (Weber, 1989; Lin et Bissell, 1993; Timpl, 1996; Alberts et *al.*, 2002).

La plupart des composantes de la MEC du myocarde sont synthétisées par les fibroblastes cardiaques (Lin et Bissell, 1993). Pour ce qui est de l'aorte, ces composantes sont synthétisées par les VSMC. Ces dernières sont les principales cellules à produire les composantes de la MEC (Ju et Dixon, 1996).

La MEC, en plus de former une connexion physique entre les cellules, fournit un support structurel à la cellule et est une barrière physique pour les molécules solubles. De plus, elle séquestre des facteurs de croissance et joue un rôle dans le développement, la migration, la prolifération, la différenciation, la forme et la fonction de la cellule (Alberts et *al.*, 2002).

En ce qui a trait la MEC du myocarde, qui est importante dans le support et l'organisation des cardiomyocytes, elle est composée des compartiments suivants : l'épimysium, le pérимysium et l'endomysium. L'épimysium se situe le long de l'épicarde et de l'endocarde. Le pérимysium entoure ou connecte les muscles du myocarde. L'endomysium entoure ou lie les cardiomyocytes entre-eux ou avec des capillaires (Weber et *al.*, 1994). Ainsi, par sa structure, la MEC du myocarde permet l'alignement des cellules et empêche tout glissement entre-elles (Ruoslahti et *al.*, 1991). De plus, elle module les fonctions et les performances cardiaques (Weber et *al.*, 1987). En effet, la MEC sert de force contractile directe générée par les cardiomyocytes et contribue à l'étirement passif des ventricules (Robinson et *al.*, 1986).

Tout comme pour le myocarde, la MEC joue un rôle important dans l'organisation et le support de l'aorte (Ruoslahti, 1991). De plus, c'est au collagène et à l'élastine, deux composantes importante de la MEC, que l'on peut conférer la force extensible et le relâchement de l'aorte.

La MEC est donc essentielle pour le maintien de l'organisme, mais nous savons qu'elle peut être aussi impliquée dans plusieurs pathologies. En effet, une accumulation disproportionnée des composantes de la MEC peut engendrer la fibrose réactive (Frohlich, 2001). En effet, contrairement à la fibrose réparative, qui consiste à la cicatrisation de tissu

endommagé, la fibrose réactive augmente la rigidité du myocarde, rend les vaisseaux plus étroits et diminue la capacité vasodilatatrice des artères (Ju et Dixon, 1996; Schwartzkopff, 2000). Ainsi, la fibrose réactive augmente les risques d'hypertension, d'infarctus du myocarde et d'hypertrophie cardiaque et vasculaire (Ju et Dixon, 1996; Frohlich, 2001). De plus, une trop grande dégradation des composantes de la MEC peut être associée à l'athérosclérose et à la cardiomyopathie dilatée (Creemers et *al.*, 2001).

3.1. Composantes de la MEC

Pour ce travail, nous allons nous concentrer principalement sur deux composantes de la MEC, soient le collagène et la fibronectine.

Le collagène constitue 25 à 30 % des protéines totales du corps entier des mammifères. Cette composante contribue à l'organisation de la MEC (Alberts et *al.*, 2002) et forme un réseau responsable de l'intégrité fonctionnelle de plusieurs tissus, dont le cœur et les vaisseaux. Pour ce qui est de la fibronectine, c'est la composante de la MEC la plus synthétisée après le collagène (Mackenna et *al.*, 2000). La fibronectine est une composante de type RGD qui sert de pont entre l'intégrine et le collagène.

3.1.1. Collagène

Le procollagène est constitué de trois chaînes alpha polypeptidiques. Ces dernières s'enroulent dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi grâce à la formation de ponts disulfures. La triple hélice de procollagène représente la forme intracellulaire majoritaire, et c'est sous cette forme que les collagènes fibrillaires sont sécrétés dans l'espace extracellulaire. Le procollagène a en position N et C-terminale des propeptides. Ces derniers, qui sont clivés par des procollagénases lors de l'extrusion de la cellule, sont importants dans la formation de la triple hélice, au transport intracellulaire de la molécule et dans la formation des fibres de collagène dans la MEC (Alberts, 2002) (Figure 9, p. 24).

Il existe différents types de chaînes alpha, résultant des modifications post-transcriptionnelles de leur chaîne et de leur composition en acides aminés. Ces différentes

chaînes contribuent à la formation de 20 types de collagène dont 5 se retrouvent dans les structures du système cardiovasculaire. Tout d'abord, le collagène de type I, qui est le plus abondant chez les mammifères, est composé de deux chaînes alpha 1(I) et d'une chaîne alpha 2(I). Le collagène de type III comporte trois chaînes alpha 1(III). Le collagène de type IV est composé de deux chaînes alpha 1(IV) et d'une chaîne alpha 2(IV). Le collagène de type V est composé d'alpha 1(V), d'alpha 2(V) et d'alpha 3(V). Finalement le collagène de type VI comporte une chaîne alpha 1(VI), une chaîne alpha 2(VI) et une chaîne alpha 3(VI) (Chu et *al.*, 1987; Pelouch, 1993; Alberts et *al.*, 2002).

Le collagène, qui maintient la structure du myocarde et des vaisseaux sanguins, joue un rôle dans les battements cardiaques (Weber et *al.*, 1994; Xiang et *al.*, 2002). En effet, il est proposé que les fibres de collagène conservent l'énergie durant la systole et jouent un rôle dans la relaxation et la phase de remplissage du cycle cardiaque (Weber et *al.*, 1994). Pour ce travail, nous allons étudier davantage le collagène de type I, étant donné qu'il compose à lui seul 80 % et 75 % du collagène total produit par les fibroblastes cardiaques et les VSMC respectivement (Shekhonin et *al.*, 1990; Majesky et *al.*, 1991; Weber et Brilla, 1991; Kim et *al.*, 1995; Lafont et *al.*, 1999).

3.1.2. Fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine homo- ou hétérodimérique composée de deux sous-unités de 250 kDa liées par deux ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. Elle se présente sous deux formes : soluble et insoluble. La première, étant synthétisée par le foie, se retrouve dans le plasma. Pour ce qui est de la forme insoluble, elle est produite par les cellules locales, dont les fibroblastes cardiaques et les VSMC, et se retrouve dans la MEC des tissus et des lames basales (Alberts et *al.*, 2002).

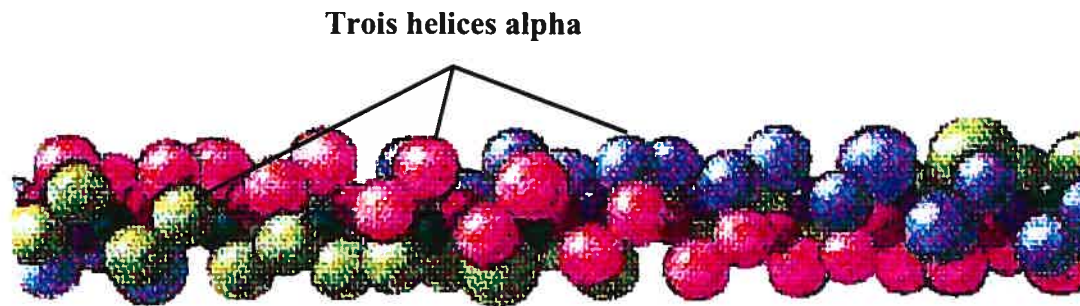


Figure 9 : Représentation de la triple hélice de collagène (modifiée d'Alberts, 2002)

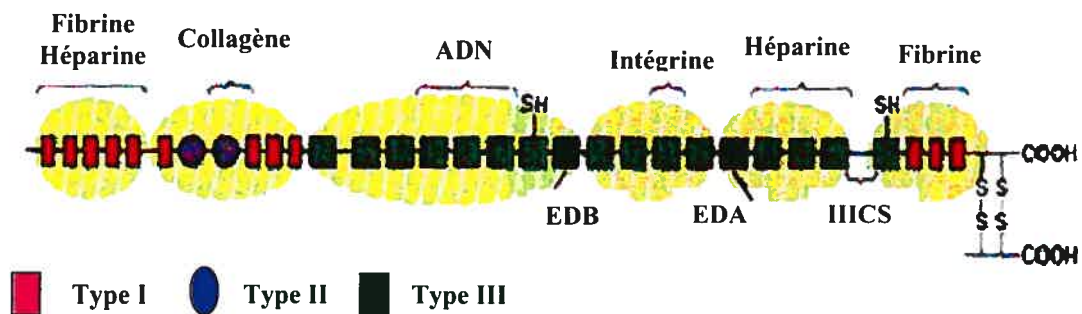


Figure 10 : Structure de la fibronectine (modifiée de Lodish et *al.*, 1997)

La séquence primaire de la fibronectine est constituée de trois modules de séquences répétées homologues : les modules I, II et III. Dans chacune des sous-unités il y a 12 modules I, répartis de l'extrémité N-terminale à C-terminale, deux modules II, se retrouvant en N-terminal, et, entre les deux extrémités, 15 à 17 modules III. Les modules I ont pour fonction de lier la fibrine et l'héparine. De plus, les modules I en association avec les modules II, forment un site de liaison pour le collagène. Ceci lui confère un rôle dans l'orientation de ces fibres. Finalement, les modules III intègrent des séquences RGD qui sont des sites de liaison pour les intégrines (Casscells et *al.*, 1990; Alberts, 2002) (Figure 10, p.24).

Dans le myocarde et l'aorte, la fibronectine joue un rôle dans le développement, la migration, la prolifération, l'adhésion et est surexprimée lorsque le cœur subit une surcharge mécanique (Villarreal et Dillmann, 1992).

3.2. La dégradation de la MEC

La MEC peut être dégradée par deux processus, soient : par internalisation et digestion lysosomale ou par la digestion via des enzymes sécrétées dans le milieu extracellulaire. Parmi les enzymes sécrétées, il y a les sérines protéases qui semblent être plus impliquées dans les processus tumoraux. Pour ce travail, nous allons nous concentrer sur les métalloprotéases matricielles (MMP) qui sont les principales enzymes impliquées dans la dégradation de la MEC (Alberts, 2002).

3.2.1. Les métalloprotéases matricielles

Les MMP, qui ont pour principale fonction de dégrader les composantes de la MEC, sont une famille d'enzymes protéolytiques, zinc-dépendantes, constituée d'une vingtaine d'espèces (Murphy et *al.*, 1994 ; Creemers et *al.*, 2001; Spinale, 2002). Comme nous pouvons le constater à partir de la figure 11 (p. 27), les MMP se partagent 8 domaines qui se distinguent par leur composition. Les MMP sont subdivisées en quatre groupes : les **collagénases**, les **gélatinases**, les **stromelysines** et les métalloprotéases matricielles transmembranaires (**MT-MMP**). Les **collagénases** coupent les collagènes fibrillaires. Les **gélatinases** dégradent la gélatine. Les **stromelysines** s'attaquent à une grande variété de protéines de la MEC. Finalement, les **MT-MMP**, dégradent plusieurs composantes de la MEC, mais activent aussi les MMP (Creemers et *al.*, 2001).

L'activité des MMP est contrôlée à trois niveaux : transcriptionnel, l'activation de la pro-enzyme latente et l'inhibition par les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP) (Creemers et *al.*, 2001).

Une multitude de molécules sont impliquées dans le contrôle transcriptionnel. C'est le cas des cytokines inflammatoires, des hormones et des facteurs de croissance (Creemers et *al.*,

2001). Or, pour ce travail, nous allons discuter un peu plus en détail du facteur de croissance transformant β_1 (TGF- β_1).

Les MMP, sécrétées par les cellules locales, sont sous forme de pro-MMP latentes. Ces dernières doivent être activées par un clivage protéolytique pour exercer leur fonction (Creemers et *al.*, 2001). Pour ce faire, il existe trois mécanismes : l'activation par étape, l'activation à la surface de la cellule par les MT-MMP et l'activation intracellulaire (Nagase, 1997). L'activation par étape implique généralement une plasmine. Cette dernière s'attaque au domaine propeptidique des MMP, menant à un changement conformationnel du domaine et le rend prêt à être clivé par une seconde protéase (généralement une autre MMP) (Murphy et *al.*, 1994; Nagase, 1997). Pour ce qui est de l'activation des MMP à la surface de la cellule (impliquant les MT-MMP), elle est surtout importante pour la dégradation péricellulaire de la MEC durant la migration cellulaire (Knauper et *al.*, 1997). Finalement, le cas où les MT-MMP sont activées par la furine, provenant de l'appareil de Golgi, est un exemple de l'activation intracellulaire (Pei et Weiss, 1995; Sato et *al.*, 1996).

Tel que mentionné plus haut, l'activité des MMP est contrôlée par les TIMP. Il existe quatre espèces de TIMP qui sont synthétisées localement par les cellules, tels que les fibroblastes cardiaques et les VSMC (Spinale, 2002). Les TIMP, ayant un poids moléculaire de 28,5 kDa, ont une grande affinité pour inhiber les formes actives de collagénases, de stromelysines et de gélatinases (Ju et Dixon, 1996). De plus, certains TIMP peuvent se lier au pro-MMP afin de former un complexe qui semble faciliter l'activation des MMP (Baker et *al.*, 1998).

Donc, comme dans de nombreux tissus, les MMP dégradent la MEC au niveau du myocarde et des vaisseaux pour fin de remodelage (Spinale, 2002). Cependant, l'expression anormale des MMP est associée à plusieurs maladies dont l'athérosclérose, la resténose, la cardiomyopathie dilatée et l'infarctus du myocarde (Creemers et *al.*, 2001).

Pour ce travail, nous allons nous concentrer sur la MMP-2. Cette gélatinase a pour fonction de dégrader les deux composantes de la matrice à laquelle nous accordons plus d'importance, soient : la fibronectine et le collagène de type I (Creemer et *al.*, 2001).

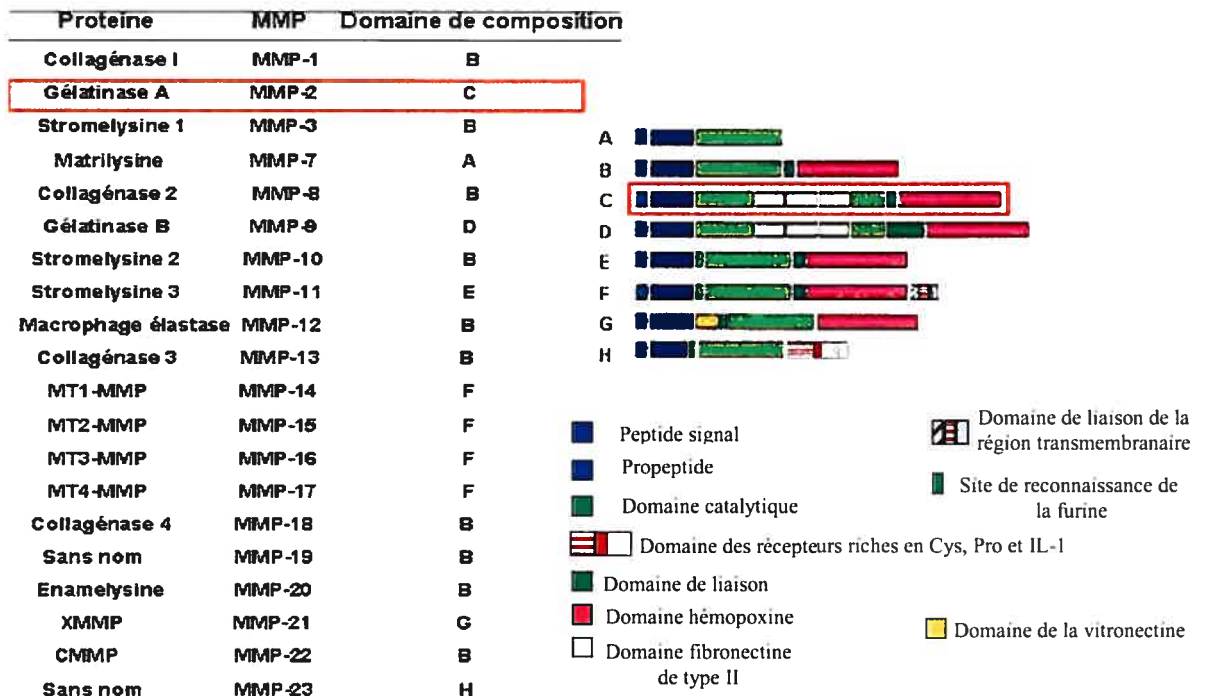


Figure 11 : Les différentes MMP et leurs domaines (modifiée de Nagase et Woessner, 1999)

3.3. La MEC à deux dimensions versus la MEC à trois dimensions

Nous savons que le phénotype cellulaire peut être influencé par les conditions en culture (Burgess et *al.*, 1994). En effet, des expériences effectuées sur des fibroblastes cardiaques démontrent, qu'*in situ*, les cellules sont allongées, bipolaires et résident dans un réseau de collagène. Cependant, à deux dimensions, les fibroblastes cardiaques ont une forme plate avec des projections stellaires. De plus, ces dernières synthétisent beaucoup de collagène. Ceci diffère beaucoup des cellules *in situ*. Dans une MEC à trois dimensions, les fibroblastes cardiaques développent davantage une morphologie *in situ* (Elsdale et Bard, 1972). En effet, ils maintiennent leur forme allongée et bipolaire, ont moins de projections et synthétisent moins de collagène, comparativement au modèle à deux dimensions (Tomasek et Hay, 1984; Tranquillo, 1999; Grinnell, 2000; Tamariz et Grinnell, 2002). Donc, d'après le phénotype, nous sommes portés à croire que le modèle à trois dimensions est plus représentatif des conditions de la matrice tissulaire.

Nous savons aussi que les fonctions cellulaires peuvent être influencées par les conditions en culture (Burgess et *al.*, 1994). En effet, dans le modèle à trois dimensions, il y a un

remodelage global de la matrice (contraction) causé par le mouvement des cellules à travers la matrice (Harris et *al.*, 1981). Cependant, ce processus important pour la morphogénèse se produit lorsqu'il y a une forte densité cellulaire dans la matrice (10^6 cellules/mL) (Harris et *al.*, 1981; Grinnell, 1994; Tamariz et Grinnell, 2002; Tomasek et *al.*, 2002). De plus, toujours dans le modèle à trois dimensions, il est possible de faire subir deux types de tension à la matrice, soient : une tension isométrique ou isotonique. Dans le cas de la première, il s'agit d'une matrice dont les forces mécaniques des cellules et de la matrice, demeurant collée à une surface, sont équilibrées. Il en résulte une contraction sans toutefois affectée la longueur de la matrice. Pour ce qui est de la deuxième, la matrice, décollée de toutes surfaces, n'offre aucune résistance face à la force mécanique exercée par les cellules, ce qui engendre une contraction de la matrice (Tranquillo, 1999; Grinnell, 2000; Grinnell, 2003). Or, le fait que la contraction et les différentes tensions des matrices ne sont pas des phénomènes retrouvés dans les cultures à deux dimensions, mais plutôt dans des cultures à trois dimensions et *in situ* (Grinnell, 2003), démontre, une fois de plus, que la culture à trois dimensions est plus représentative des conditions tissulaires.

Par ces constatations, nous sommes portés à croire que le modèle à trois dimensions nous permettra de visualiser le comportement et l'interaction entre les cellules et les composantes de la MEC de façon plus juste (Grinnell, 2003). C'est pour cette raison, que lors de notre étude, nous allons seulement utiliser des cultures de fibroblastes cardiaques et de VSMC à trois dimensions.

4. Facteurs qui altèrent l'expression des intégrines, des composantes du milieu intracellulaire et des composantes de la MEC

Plusieurs facteurs humoraux peuvent affecter le phénotype et la fonction des cellules cardiaques, tels que les fibroblastes cardiaques et les VSMC. Parmi ces facteurs, il y a l'angiotensine II (Ang II), le TGF- β , les catécholamines, le facteur de croissance insulino-mimétique 1 (IGF-1) et plusieurs autres (Booz et Baker, 1995; Bouzeghrane et Thibault, 2002). Pour ce travail, nous allons nous concentrer sur le TGF- β .

4.1. Facteur de croissance transformant (TGF- β)

Chez les mammifères, il existe trois membres de la famille des TGF- β , soient : le TGF- β_1 , le TGF- β_2 et le TGF- β_3 (Ludbrook et *al.*, 2003). Le TGF- β , un peptide dimérique, est relâché par la cellule sous une forme inactive. En effet, le facteur de croissance mature en C-terminal est associé, de façon non-covalente, au peptide LAP situé en N-terminal. Ce complexe est appelé le petit complexe TGF- β latent (Nakajima et *al.*, 1997). De plus, une glycoprotéine de 190 kDa nommée protéine de liaison pour le TGF- β_1 latent (LTBP-1) s'associe, par un pont disulfure, au peptide associé latent (LAP). Ce complexe de haut poids moléculaire est appelé le *large* complexe TGF- β latent. Ce dernier est incapable de se lier aux récepteurs de TGF- β (Lawrence et *al.*, 1985; Pircher et *al.*, 1986; Miyazono et *al.*, 1991).

Il existe deux mécanismes pour activer le TGF- β : protéolytique et non-protéolytique (Ludbrook et *al.*, 2003). Le mécanisme protéolytique qui dégrade LAP implique plusieurs protéases dont : la plasmine (Lyons et *al.*, 1990; Sato et *al.*, 1990), l'urokinase, la plasminogène (Nunes et *al.*, 1995; Chu et Kawinski, 1998), les MMP-2 et -9 (Yu et Stamenkovic, 2000), la cathepsine (Lyons et *al.*, 1988). Pour ce qui est de l'activation non-protéolytique, elle implique la thrombospondine 1 (Schultz-Cherry et Murphy-Ulrich, 1993; Schultz-Cherry et *al.*, 1995; Ribeiro et *al.*, 1999), les intégrines $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_8$ et plus faiblement $\alpha_v\beta_6$ (Munger et *al.*, 1998; Munger et *al.*, 1999; Mu et *al.*, 2002) qui se lient à LAP. Ces liaisons mènent à des changements conformationnels et l'activation du TGF- β .

Une fois le TGF- β activé, il peut aller se lier à ses récepteurs. Plusieurs récepteurs de TGF- β ont été identifiés, soient les récepteurs type I (55 kDa), II (85 kDa) et III (280 kDa). Il a été démontré que les récepteurs de type I et II possédaient une activité sérine/thréonine kinase transmembranaire (Derynck, 1994). De plus, il est connu que le récepteur TGF- β de type I requiert le récepteur TGF- β de type II pour assurer une liaison avec le ligand et obtenir la transduction des signaux (Wrana et *al.*, 1992 et 1994).

Il y a plusieurs patrons de signalisation activés par TGF- β . C'est le cas de MAPK et de SMAD (Massague, 2000). En ce qui a trait le patron SMAD, le TGF- β va d'abord se lier

au récepteur et ce dernier, une fois activé, va phosphoryler R-Smads, qui à son tour va se lier à Co-Smad. Ce complexe sera par la suite transloqué au noyau pour agir comme facteur de transcription (Moustakas *et al.*, 2001).

Le TGF- β affecte une variété de processus cellulaires : la prolifération, la synthèse des composantes de la MEC (collagène, fibronectine, thrombospondine, tenascine, laminine, MMP, TIMP), l'expression des intégrines, les fonctions immunitaires, le développement et la différenciation. (Massague, 1990; Piek *et al.*, 1999; Blobel *et al.*, 2000; Massague *et al.*, 2000). En ce qui a trait cette dernière, il a été démontré que le TGF- β_1 induit la différenciation des fibroblastes cardiaques en myofibroblastes. En effet, il a été démontré que le TGF- β_1 augmente l'expression de l'ARNm de l'actine sarcomérique, augmente le taux de filaments d'actine et induit un patron morphologique correspondant aux cardiomyocytes (Eghbali *et al.*, 1991).

4.1.1. Effets du TGF- β_1 sur les intégrines, les composantes du milieu intracellulaire et les composantes de la MEC

Le TGF- β_1 augmente de façon significative le niveau d'expression des intégrines $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_8\beta_1$ qui sont les intégrines auxquelles nous accordons le plus d'importance (Arrick *et al.*, 1992; Thibault *et al.*, 2001). Il en est de même pour plusieurs autres sous-unités, dont α_2 , α_3 , α_5 , α_6 , α_V et β_3 (Arrick *et al.*, 1992; Graf *et al.*, 2000; Rout *et al.*, 2002). Ceci nous porte à croire que dans bien des cas, le TGF- β_1 augmente l'adhésion entre les cellules et leurs ligands.

En ce qui a trait les effets du TGF- β_1 sur les composantes du milieu intracellulaire, nous allons nous concentrer sur les deux composantes qui nous intéressent, c'est-à-dire, la F-actine et la vinculine. Tout d'abord, il a été démontré que le TGF- β_1 augmentait l'expression de la F-actine (Eghbali *et al.*, 1991). Du côté de la vinculine, il a été observé qu'il y avait une augmentation du taux de vinculine, au niveau des foyers d'adhésion, suite à une stimulation au TGF- β_1 (Rout *et al.*, 2002).

De plus, le TGF- β_1 est connu pour augmenter la production du collagène et de la fibronectine (Eghbali *et al.*, 1991). En général, pour ce qui est des MMP, le TGF- β_1

favorise l'inhibition des MMP et l'activation des TIMP. Ceci a pour effet de favoriser l'accumulation des composantes de la MEC (Ju et Dixon, 1996). Cependant, il ne s'agit là que d'une généralité. En effet, il a été démontré que le TGF- β_1 active les MMP-2 et MMP-9 de même que les TIMP (Overall *et al.*, 1991; Mauviel, 1993).

Plusieurs études ont démontrées que le TGF- β_1 est impliqué dans le remodelage cardiaque suite à un infarctus (Thompson *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1994). En effet, le TGF- β_1 favorise ce phénomène en promouvant la migration et la prolifération des fibroblastes cardiaques dans les sites nécrotiques et en augmentant le niveau d'expression de l'ARNm des composantes de la MEC et des intégrines (Lijnen *et al.*, 2000). L'augmentation de l'expression des intégrines favorisant ainsi l'interaction cellule-matrice et l'assemblage de la matrice. Une fois que la réparation est effectuée, il y a formation d'une cicatrice (fibrose réparatrice) et le TGF- β_1 lie les protéines de la matrice. Cette liaison a pour effet de signaler la fin du processus de réparation (Border et Noble, 1994). Cependant, lors de dommages répétitifs au niveau du myocarde, il y a une autoinduction continue du TGF- β_1 . Le processus de réparation continuant sans cesse, fait en sorte qu'il y a une production continue des composantes de la MEC et des intégrines allant bien au-delà du tissu endommagé menant ainsi à la fibrose réactive (Lijnen *et al.*, 2000). Contrairement à la fibrose réparative, la fibrose réactive est pathologique et a pour effet de diminuer les fonctions cardiaques.

De plus, au niveau vasculaire, le TGF- β_1 augmente, tout comme pour le myocarde, l'expression des composantes de la MEC et des intégrines. Ceci a pour effet d'assurer le maintien de l'intégrité des vaisseaux qui ont été endommagés (Pepper, 1997). Cependant, s'il y a une trop forte augmentation du TGF- β_1 , il y aura une forte hausse de l'expression des intégrines. Tel qu'il a été expliqué auparavant, une trop grande quantité d'intégrines diminuent la prolifération des VSMC et fait en sorte qu'il y a plus d'interactions cellule-cellule et cellule-MEC. Ces phénomènes ayant pour conséquence de former des agrégats et, par le fait même, des thromboses.

5. Objectif

Au cours de ce travail, nous aurons pour objectif d'observer l'effet du TGF- β_1 sur l'interaction des fibroblastes cardiaques et des VSMC avec une matrice extracellulaire à trois dimensions. Pour ce faire, nous allons examiner la contraction des matrices, contenant des fibroblastes cardiaques ou des VSMC, suite à une stimulation au TGF- β_1 . Nous allons ensuite étudier l'effet du TGF- β_1 sur les interactions suivantes : filaments d'actine-fibronectine, fibronectine-collagène bovin, fibronectine-collagène de rat, α_8 -fibronectine, α_8 -vinculine, α_1 -fibronectine et α_1 -vinculine. De plus, nous allons observer l'effet du TGF- β_1 sur la quantité d' α_8 , d' α_1 , d' $\alpha_8\beta_1$ et sur la sécrétion de la MMP-2.

6. Hypothèses

Nous supposons, autant chez les fibroblastes cardiaques que chez les VSMC, que le TGF- β_1 augmentera la contraction des matrices. De plus, nous croyons que le TGF- β_1 aura pour effet d'augmenter la quantité de collagène, de vinculine, de F-actine, de fibronectine, d' α_8 , d' α_1 et d' $\alpha_8\beta_1$. Par le fait même, nous croyons que les interactions entre ces composantes seront augmentées. Finalement, nous pensons que le TGF- β_1 augmentera l'activité des MMP-2.

Nous savons que plusieurs de ces expériences ont été effectuées à deux dimensions. Cependant, nous supposons que l'utilisation d'une matrice à trois dimensions, pour étudier ces différents paramètres, nous donnera des résultats plus représentatifs des conditions de la matrice des tissus.

CHAPITRE DEUX :
MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE DEUX : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Matériel

Les produits suivants : 2-mercaptoéthanol, acide acétique, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, gélatine, glycérol, glycine, hepes, HgCl_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KCl , KH_2PO_4 , MeOH , MgCl_2 , MnCl_2 , MOPS, NaCl , NaHCO_3 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaN_3 , NaOH , NaSO_4 , paraformaldéhyde, PMSF, sucrose, Triton X-100, Tris et Tween 20 proviennent de Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO), de Fisher Scientific (Montréal, QC) ou VWR, BDH (Toronto, ON).

30 % Brij-35	Technicon, Tarrytown, NY
Acrylamide	Gibco, Invitrogen, Burlington, ON
Ammonium persulfate	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
Anticorps de lapin, anti-collagène	Chemicon (Ab755p), Temecula, CA
Anticorps de souris, anti-fibronectine	Chemicon (Mab1926), Temecula, CA
Anticorps de lapin, anti-fibronectine	Calbiochem (341654), La Jolla, CA
Anticorps de souris, anti-vinculine	Sigma (V-9131), St-Louis, MO
Anticorps de lapin anti- α_1	Chemicon (Ab1934), Temecula, CA
Anticorps de lapin anti- α_8	Anticorps provenant du laboratoire du Dr.G.Thibault, Institut de recherches clinique de Montréal, Montréal, QC
Aprotinine	Sigma, St-Louis, MO
Bleu de bromophénole	ICN Biomedicals Inc, Aurora, OH
Bleu de coomassie	ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH
BSA	Serologicals Proteins Inc., Kankakee, IL
Collagénase	Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ
Collagénase-dispase	Roche, Mississauga, ON
Collagène bovin	Chemicon, Temecula, CA

Collagène bovin de type I	Cohesion, Vitrogen 100, Palo Alto, CA
Collagène de rat	Chemicon, Temecula, CA
DMEM <i>High glucose</i>	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
DMEM <i>Low glucose</i>	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
DMEM 10X <i>Low glucose</i>	Bio Media Canada, Drummondville, QC
Échelle de standards protéiques colorés (Benchmark™ Prestained Protein Ladder)	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
Échistatine	Bachem California Inc., Torrance, CA
Élastase	Worthington Biochemical Co., Freehold, NJ
FBS	Gibco, Invitrogen, Burlington, ON
Fibronectine de rat	Chemicon, Temecula, CA
Fibronectine humaine	Chemicon, Temecula, CA
Gentamycine	Bio Media Canada, Drummondville, QC
Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à l'Alexa-Fluor 488	Molecular Probes Inc., (A-11034), Eugene, OR
Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à HRP	Chemicon, (AP132P), Temecula, CA
Immunoglobuline de chèvre, anti-souris, conjuguée à la rhodamine	Chemicon, (AP128R), Temecula, CA
Kétamine	Ketaset, Guelph, ON
Lait	Carnation, Nestlé Canada Inc., North York, ON
Leupeptine	Bachem, Torrance, CA
L-glutamine	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
Mélange de F12 en poudre	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
Membrane de nitrocellulose Hybond ECL	Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ
NGS	Gibco, Invitrogen, Burlington, ON
Nonidet P-40	Bethesda Research Laboratories, Gaithersurg, MD
OCT	Sakura Finetek U.S.A., Torrance, CA
PAPpen	IMEB INC, Chicago, IL
Penicilline-streptomycine	Gibco, Invitrogen, Burlington, ON
Pepstatine A	Bachem, Torrance, CA
Phalloïdine-TRITC	Sigma, (P-1951), St-Louis, MO
Tampon d'échantillon XT 4X	Bio-Rad, Hercules, CA

SDS	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
Sérum de veau	Gibco, Invitrogen, Burlington, ON
Standard MMP-2	Chemicon, (CC073), Temecula, CA
Substrat chimioluminescent (Super Signal)	Pierce Biotechnology inc., Rockford, IL
Tampon MOPS	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
TEMED	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
TGF- β_1	Research diagnostics inc (1021 R), Flanders, NJ
Trypsine (en poudre)	Gibco BRL Life Technologies, Burlington, ON
Trypsine	Gibco, Invitrogen, Burlington, ON
Xylazine	Rompun, Toronto, ON

1.2. Solutions utilisées :

1.2.1. Milieu

Milieu de base DMEM *High Glucose* pour les fibroblastes cardiaques:

27 g de DMEM *High Glucose*

7,4 g de NaHCO₃

7,0 g d'hepes

4,0 g de BSA

20 mL de penicilline-streptomycine

Compléter à 2 L avec de l'eau distillée

Cette solution est ajustée à un pH de 7,1-7,2 et filtrée stérilement (filtre de 0,2 µm)

Conservation à 4 °C

Milieu de base DMEM *Low Glucose* pour les VSMC:

19,96 g de DMEM *Low Glucose*

7,4 g de NaHCO₃

7,16 g d'hepes

20 mL de L-glutamine

20 mL de penicilline-streptomycine

Compléter à 2 L avec de l'eau distillée

Cette solution est ajustée à un pH de 7,1-7,2 et filtrée stérilement (filtre 0,2 µm)

Conservation à 4 °C

Milieu de digestion pour les fibroblastes cardiaques (2 cœurs) :

120 mL de milieu de base DMEM *High Glucose*

42 mg de collagénase

120 mg de trypsine

Cette solution est ajustée à un pH de 7,1-7,2 et filtrée stérilement (filtre de 0,2 µm)

Conservation à 4 °C

Milieu de culture : Milieu de base (*High* ou *Low*) + 10 % de FBS
Conservation à 4 °C

Solution F12 : 10,62 g de mélange F12
10 mL d'hepes (solution mère : 47,65 g/100 mL) 2 M
10 mL de penicilline-streptomycine
10 mL de gentamycine (10 mg/mL)
10 mL de L-glutamine 200 mM
100 mL de FBS
Compléter à 1 L avec de l'eau distillée

Cette solution est ajustée à un pH de 7,1-7,2 et filtrée stérilement (filtre de 0,2 µm)
Conservation à 4 °C

1.2.2. Tampons

Tampon de lyse : 12,5 mL d'hepes 0,2 M
0,45 g de NaCl
2,5 mL de nonidet P-40 20 %
100 µl de MgCl₂ 0,5 M
500 µl de CaCl₂ 0,1 M
50 µl de pepstatine A 5 mM
50 µl de leupeptine 10 mM
250 µl d'aprotinine 10 000 KIU/mL
11 µl de PMSF 200 mM
Conserver à 4 °C

TBS : 0,05 M de tris-HCl
0,15 M de NaCl

Cette solution est ajustée à un pH de 7,4
Conservation à 4 °C

Tampon de NaPO₄ 0,5 M pH : 7,4 : 141,96 g/ 2L de Na₂HPO₄ dibasique

30 g/500 mL de NaH₂PO₄ monobasique

Mesurer 1600 mL de la solution dibasique avec 300-400 mL de la solution monobasique
jusqu'à l'obtention d'un pH de 7,4

Conserver à la température de la pièce

PBS 10 X pH : 7,4:

80 g de NaCl

2 g de KCl

14,4 g de Na₂HPO₄

2,4 g de KH₂PO₄

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée

La solution est ajustée à un pH de 7,4

Conservation à la température de la pièce

1.2.3. Fixateur

Fixateur Zenker:

10 mL d'eau distillée

0,5 g de HgCl₂

0,1 g de NaSO₄

0,25 g de K₂Cr₂O₇

0,5 mL d'acide acétique

Conservation à la température de la pièce

Paraformaldéhyde 4 % :

4 g de paraformaldéhyde

10 mL de PBS 10 X

60 mL d'eau distillée

La solution est chauffée à 60 °C, filtrée et complétée à 100 mL avec de l'eau distillée

La solution est ajustée à un pH de 7,4

Conserver à la température de la pièce

1.2.4. Matrice à trois dimensions

Mélange pour la fabrication des matrices à trois dimensions (12 matrices) :

204 µl d'eau distillée
 268 µl de DMEM 10X *Low glucose*
 1380 µl de collagène bovin de type I (1,5 mg/mL)
 152 µl de NaOH 0,2 M
 668 µl de cellules (4×10^6 cellules/mL)

1.2.5. Immunocytochimie

Tampon bloquant pour l'immunocytochimie :

1 g de lait
 1 g de BSA
 300 µl de Tween 20
 Compléter à 100 mL avec du TBS

1.2.6. Solution pour immunobuvardage, test de radio-liaison et zymographie

1.2.6.1. Immunobuvardage :

Tampon transfert: 400 mL de MeOH
 6,06 g de tris
 28,82 g de glycine
 Compléter à 2 L avec de l'eau distillée

Cette solution est ajustée à un pH de 8,3

Conservation à 4 °C

Tampon d'immunobuvardage : 200 mL de tampon 0,5 M NaPO₄ à pH : 7,4
 18 g de NaCl
 2 mL de Tween 20

Tampon de blocage : Tampon d'immunobuvardage + 4 % de sérum de veau

1.2.6.2. Test de radio-liaison

Tampon pour les échantillons 5X (6 % SDS):

2,6 mL d'eau distillée
3,0 mL de tris-HCl 0,5 M, pH 6,8
2,4 mL de glycérol
0,48 g de SDS
1 grain de bleu de bromophénole

Cette solution se conserve à -20 °C

Tampon de liaison 5 X :

2,5 mL de tampon $MnCl_2$ 100 mM
2,5 mL de tampon hepes 0,2 M, pH 7,4
5 mL d'eau distillée
Conservation à 4 °C

Acrylamide/Bis 30 % :

14,6 g d'acrylamide
0,4 g de N'N'-bis-méthylène-acrylamide
Compléter à 50 mL avec de l'eau distillée

Conserver à 4 °C à l'abri de la lumière

Gel d'électrophorèse 6 % de polyacrylamide (pour 2 gels de résolution de 1 mm d'épaisseur) :

5,35 mL d'eau distillée
2,5 mL de tris-HCl 1,5 M, pH 8,8
100 µl de SDS 10 %
2 mL d'acrylamide/bis 30 %
50 µl d'ammonium persulfate 10 % (frais du jour)
5 µl de TEMED

Gel d'électrophorèse (pour 4 gels de concentration de 1 mm d'épaisseur) :

6,1 mL d'eau distillée
2,5 mL de tris-HCl de 0,5 M, pH 6,8
100 µl de SDS 10 %
1,33 mL d'acrylamide/bis 30 %
50 µl d'ammonium persulfate 10 %
10 µl de TEMED

**Tampon de migration 5X
(aussi pour la zymographie) :**

15 g de tris
72 g de glycine
5 g de SDS
Compléter à 1 L avec de l'eau distillée
Conservation à 4 °C

**Tampon de migration
(aussi pour la zymographie):**

80 mL de tampon de migration 5X
4 mL de SDS 10 %
Compléter à 400 mL avec de l'eau distillée
Conservation à 4 °C

Solution 1 :1 :9 :

100 mL d'eau distillée
100 mL d'acide acétique
900 mL de MeOH
Conservation à la température de la pièce

Solution 5 :1 :5 :

500 mL d'eau distillée
100 mL d'acide acétique
500 mL de MeOH
Conservation à la température de la pièce

0,5 % de bleu de coomassie dans une solution 5 :1 :5:

500 mg de bleu de coomassie

100 mL de solution 5-1-5

Conservation à la température de la pièce

1.2.6.3. Zymographie**Tampon d'échantillon pour la zymographie:**

5 mL de tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

0,4 g de sucrose

1 g de SDS

5 mg de bleu de bromophénole

Compléter à 10 mL avec de l'eau distillée

Cette solution se conserve à -20 °C

Gel d'électrophorèse pour la zymographie (Gel de résolution):

3,33 mL d'acrylamide 30 %

0,74 mL d'eau distillée

3,33 mL de gélatine 0,3 %

2,5 mL de tris-HCl 1,5 M, pH 8,8

50 µl de SDS 20 %

65 µl d'ammonium persulfate 10 %

12 µl de TEMED

Gel d'électrophorèse pour la zymographie (Gel de concentration):

1,3 mL d'acrylamide 30 %

6,1 mL d'eau distillée

2,5 mL de tris-HCl 0,5 M, pH 6,8

50 µl de SDS 20 %

65 µl d'ammonium persulfate 10 %

12 µl de TEMED

Tampon de renaturation :

25 mL de Triton X-100

Compléter à 1 L avec de l'eau distillée

Tampon substrat :

10 mL de Tris-HCl 2M, pH 8,0

20 mL de NaCl 4M

1 mL de CaCl₂ 2M

266 µl de Brij-35 30%

4 mL de NaN₃ 2 %

Compléter à 400 mL avec de l'eau distillée

2. Méthodes

2.1. Culture des fibroblastes cardiaques

La culture primaire de fibroblastes cardiaques, selon Fareh et *al.* (1997) et Thibault (2000), est effectuée à partir de rats mâles Sprague-Dawley de 200-250 g (Charles River, St-Constant, QC). Ces rats sont anesthésiés avec une solution de kétamine (160 mg/kg) et de xylazine (12 mg/kg) afin de prélever le cœur qui sera ensuite déposé dans un tube conique contenant 30 mL de milieu de base *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose*. Stérilement, la partie supérieure du cœur est découpée (oreillettes et vaisseaux sanguins). Les ventricules, hachés, sont déposés dans des fioles de verre stériles contenant 10 mL de milieu de digestion. Ces fioles, sont incubées à 37 °C et agitées à 120 cycles/min pendant 15 min. Cette digestion est effectuée cinq fois par l'addition de milieu frais. Après chacune des incubations, il y a trituration des tissus et récupération du surnageant dans des tubes coniques de 50 mL. Une centrifugation de tous les surnageants, à 2000 tours/min pendant 3 min, permet d'obtenir un culot de cellules. Celui-ci est resuspendu dans 10 mL de milieu de culture *DMEM High Glucose* et filtré (filtre de 200 µm et 50 µm). Cette solution de cellules est ensuite diluée (1 cœur dans 80 mL) etensemencée dans des boîtes de pétri de 15 cm (20 mL par boîte) (Sarstedt, Montréal, QC). Il y a une incubation de 2 h à 37 °C et 10 % de CO₂. Pendant ce temps, les fibroblastes cardiaques adhèrent à la surface des boîtes (95 % des cellules totales étant des fibroblastes cardiaques). Les autres types cellulaires et les débris, n'ayant pas adhérents, sont éliminés lors du changement de milieu. Les fibroblastes cardiaques croissent dans le milieu de culture qui est renouvelé à tous les deux jours. Les cellules atteignent leur confluence en 6 jours de culture.

2.2. Culture des VSMC de la média

La culture de VSMC, selon Schiffrin et *al.* (1986), est effectuée à partir de rats mâles Sprague-Dawley de 200-250 g. Ces rats sont anesthésiés avec une solution de kétamine (160 mg/kg) et de xylazine (12 mg/kg), afin de prélever l'aorte. Les aortes, conservées dans un bécher contenant du F12 froid, sont nettoyées et coupées longitudinalement dans une boîte de pétri. Une première digestion des aortes s'effectue dans 12 mL de F12 + 12 mg de collagénase à 37 °C sous agitation de 120 cycles/min pendant 15 min. Il y a arrêt de la

réaction enzymatique lors de l'incorporation des aortes dans une solution F12, afin de séparer l'adventice de la média à l'aide de forceps. La média récupérée est coupée en petits morceaux et subie une deuxième digestion enzymatique dans 12 mL de F12-collagénase. Ce contenu est incubé 30 min à 37 °C. Le tissu subit une troisième digestion par l'ajout de 12 mL de F12-collagénase suivie d'une incubation de 30 min à 37 °C. Les milieux combinés sont centrifugés pendant 5 minutes à 2000 tours/min et il y a aspiration du surnageant. Le culot résultant est mélangé à une solution de 12 mL de F12 + 6 mg de collagénase + 6 mg d'élastase, afin d'effectuer la quatrième digestion d'une durée de 90 min à 37 °C. Le mélange final est transféré dans un tube conique en le passant successivement à travers une aiguille de 16, 18 et 20 G pour ensuite être filtré (filtre de 100 μm). La solution est centrifugée 5 min à 2000 tours/min. Le culot de cellules est resuspendu dans 5 mL de milieu de base DMEM *Low Glucose* et est ensemencé dans une boîte de pétri dans laquelle 25 mL de milieu de culture DMEM *Low Glucose* a été ajouté. Les cellules sont incubées pendant 24 h à 37 °C et 10 % de CO_2 . Le changement de milieu s'effectue à tous les deux jours et les cellules atteignent leur confluence après deux semaines et demie d'incubation.

2.3. Fabrication des matrices à trois dimensions

La fabrication de matrice à trois dimensions, selon Grinnell et Lamke (1984), est effectuée à partir de cellules (fibroblastes cardiaques ou VSMC) de passage 1 à 4. Les cellules sont lavées à deux reprises avec du tampon phosphate salin 1X (PBS 1X) puis détachées à l'aide de trypsine 1X. Les cellules sont transférées dans un tube conique de 50 mL et centrifugées à 2000 tours/min pendant 2 min. Le culot de cellules est resuspendu dans du milieu de culture (5 mL par boîte digérée) et centrifugé. Le culot est resuspendu dans le milieu de culture (5 mL par boîte digérée) et les cellules sont comptées dans un hémacymètre. Les cellules ($4 \times 10^6/\text{mL}$), l'eau, le DMEM 10 X *Low Glucose*, le collagène bovin de type I, le NaOH 0,2 M sont mélangés et 200 μl de cette solution (pH 7,8) est déposée dans chacun des puits qui ont été délimités par un emporte pièce (11 mm de diamètre). Une incubation d'une heure (37 °C et 10 % de CO_2), permet la gélification des matrices. Après cette période, 1 mL de milieu sans sérum est ajouté dans les puits et les matrices sont incubées pendant 24 h (37 °C et 10 % de CO_2).

Les matrices à trois dimensions peuvent subir deux types de tensions : isotonique ou isométrique (Figure 12, p. 47). Pour ce faire, des boîtes de pétris non-irradiées pour la microbiologie (BD Biosciences Falcon (351008), Oakville, ON) et des plaques de 24 puits (BD Biosciences Falcon, Oakville, ON) sont utilisées.

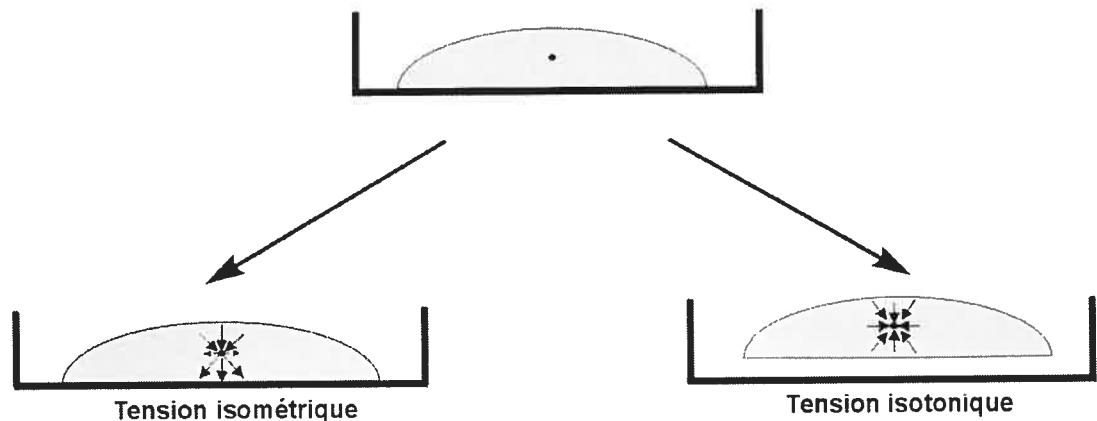


Figure 12 : Les différentes tensions subies par les matrices extracellulaires à trois dimensions

2.4. Stimulation des matrices à trois dimensions

Après 24 h de stimulation, les matrices isotoniques sont stimulées avec 1, 3 ou 10 ng/mL de TGF- β_1 , tandis que les matrices isométriques sont stimulées avec 10 ng/mL de TGF- β_1 . Selon l'expérience, le temps de stimulation peut varier de 0 à 96 h.

2.5. Calcul du diamètre des matrices isotoniques

La mesure précise du diamètre des matrices isotoniques est effectuée au microscope à dissection Leica MZ12 (McBain Instruments, CA) à l'aide d'une acétate quadrillée. Ces mesures sont prises à différents temps de stimulations, soit à : 0, 24, 48 et 72 h.

2.6. Immunocytochimie

À différents temps de stimulation, variant de 0 à 96 h, les matrices isométriques sont fixées avec de la paraformaldéhyde 4 % ou le fixateur Zenker (pour l'étude des intégrines) et perméabilisées avec du Triton X-100 0,2 % (dans du PBS). Les matrices sont alors congelées dans l'OCT et coupées au cryostat (Leica Microsystem, Richmond Hill, ON) en tranche de 20 μm . Ces tranches, déposées sur des lames Superfrost/Plus (Fisher Scientific, Montréal, QC), sont hydratées avec du tampon Tris-NaCl (TBS) et les liaisons non-spécifiques sont bloquées avec 200 μl de lait 1 %. Puis, les coupes sont incubées avec les premiers anticorps toute la nuit (Tableau II, p. 50). Les seconds anticorps (Tableau II, p. 50) sont ensuite utilisés, afin de révéler le premier anticorps. Les lames sont montées, dans du glycérol 50 %, et examinées au microscope confocal à un grossissement de 63 X (Carl Zeiss, Thornwood, NY).

2.6.1. Problème rencontré au cours de l'étude immunocytochimique

Lors de l'étude de l'interaction de l'actine avec la fibronectine, nous utilisons du (Sérum de chèvre (NGS) au lieu du lait comme bloqueur de liaisons non-spécifiques. Nous nous sommes aperçus, par le biais d'immunobuvardage, que ce bloqueur n'était pas adéquat pour observer la fibronectine. Tel que présenté à la figure 13 (p. 51), nous observions, même en absence de cellules, de la fibronectine dans la matrice. Ceci était illogique, étant donné que la matrice n'est constituée que de collagène et que ce sont les cellules, fibroblastes cardiaques ou VSMC, qui synthétisent la fibronectine.

Nous pouvons constater (Figure 14, p. 51) qu'il y a des bandes correspondant aux sous-unités $\alpha_1(\text{I})$ et $\alpha_2(\text{I})$ du collagène bovin et de rat, lors du dépôt de l'anticorps de souris anti-fibronectine, sur la membrane bloquée avec le NGS (membrane 1). Toutefois, lorsque la membrane est bloquée avec du lait (membrane 2), nous ne détectons pas de bandes au niveau du collagène après l'application de l'anti-fibronectine. Cela nous mène à supposer que le NGS contient de la fibronectine et que cette protéine, par le biais de son site de liaison, se lie au collagène. Il en résulte que l'anti-fibronectine détecte la fibronectine associée au collagène.

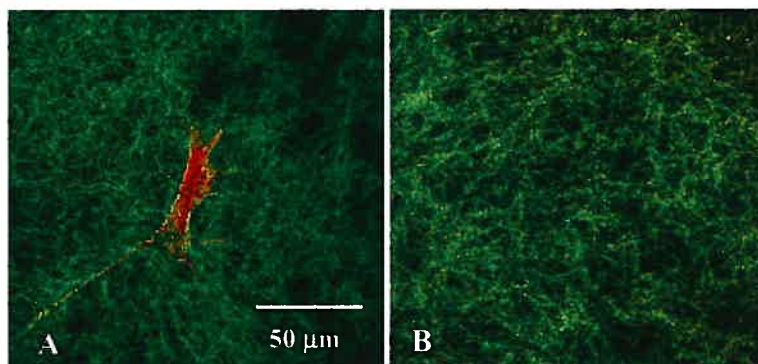
2.7. Solubilisation des protéines

Après 24 et 48 h de stimulation, les matrices isométriques subissent une extraction de protéines. Les matrices, nettoyées à deux reprises dans du PBS 1X, sont transférées dans une solution de collagénase-dispase et sont incubées à 37 °C pendant 20 min. L'incubation terminée, les microtubes sont agités et centrifugés 10 min à 15 000 rpm. Suite au dépôt de 500 µl de tampon HEPES 0,05 M pH 7,4 sur le culot, les tubes sont agités et centrifugés 15 min à 15 000 rpm. Le culot est resuspendu dans 40 µl de tampon de lyse, agité et centrifugé 15 min à 15 000 rpm.

Étude	Premier anticorps et concentration	Deuxième anticorps et concentration
Interaction F-actine et fibronectine	Phalloïdine-TRITC (1:6000)	
	Anticorps de lapin, anti-fibronectine (1 :500)	Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à l'Alexa-Fluor 488 (1:200)
Interaction fibronectine et collagène bovin	Anticorps de souris, anti-fibronectine (1 :200)	Immunoglobuline de chèvre, anti-souris, conjuguée à la rhodamine (1:200)
	Anticorps de lapin, anti-collagène (1 :200)	Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjugué à l'Alexa-Fluor 488 (1:200)
Interaction fibronectine et collagène de rat	Anticorps de souris, anti-fibronectine (1 :200)	Immunoglobuline de chèvre, anti-souris, conjuguée à la rhodamine (1:200)
	Anticorps de lapin, anti-collagène (1 :200)	Immunoglobuline de chèvre anti-lapin conjuguée à l'Alexa-Fluor 488 (1:200)
Interaction α_8 et fibronectine	Anticorps de lapin, anti- α_8 (1 :500)	Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à l'Alexa-Fluor 488 (1:200)
	Anticorps de souris, anti-fibronectine (1 :200)	Immunoglobuline de chèvre anti-souris conjuguée à la rhodamine (1:200)
Interaction α_8 et vinculine	Anticorps de lapin, anti- α_8 (1 :500)	Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à l'Alexa-Fluor 488 (1:200)
	Anticorps de souris, anti-vinculine (1 :300)	Immunoglobuline de chèvre anti-souris conjuguée à la rhodamine (1:200)
Interaction α_1 et fibronectine	Anticorps de lapin, anti- α_1 (1 :500)	Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à l'Alexa-Fluor 488 (1:200)
	Anticorps de souris, anti-fibronectine (1 :200)	Immunoglobuline de chèvre, anti-souris, conjuguée à la rhodamine (1:200)
Interaction α_1 et vinculine	Anticorps de lapin, anti- α_1 (1 :500)	Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à l'Alexa-Fluor 488 (1:200)
	Anticorps de souris, anti-vinculine (1 :300)	Immunoglobuline de chèvre, anti-souris, conjuguée à la rhodamine (1:200)

Tableau II : Représentation de toutes les expériences immunocytochimiques qui ont été effectuées, ainsi que la concentration des anticorps utilisés

TRITC : Tétraméthylrhodamine B isothiocyanate

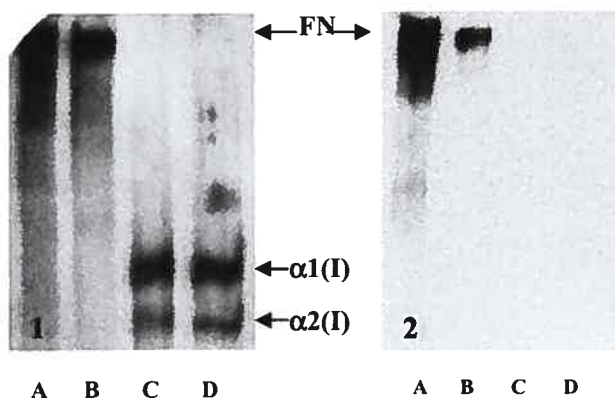


Figures 13: Représentation de matrices isométriques
A : Matrice avec un fibroblaste cardiaque B : Matrice sans cellule

Figure 14: Immunobuvardage avec l'anti-fibronectine provenant de la souris (1:2000) dont le blocage a été effectué avec (1) du Normal Goat Serum (4 %) et avec (2) du lait (5 %).

- A: Fibronectine de rat (50 ng/ml)
- B: Fibronectine humaine (50 ng/ml)
- C: Collagène bovin (20 ng/ml)
- D: Collagène de rat (20 ng/ml)

FN: Fibronectine



2.8. Dosage de protéines

La technique *Pierce BCA Protein Assay* a été employée pour doser les protéines.

2.9. Immunobuvardage

Du tampon d'échantillon XT 2X, contenant du 2-mercaptoéthanol (1:5 Tampon d'échantillon) est ajouté aux échantillons, contenant 20 µg de protéines solubilisées (fibroblastes cardiaques ou VSMC). Les échantillons sont ensuite chauffés à 95 °C.

Après le dépôt de l'échelle de standards protéiques colorés et des échantillons sur les gels Criterion 4-12 % Bis-Tris XT (Bio-Rad, Hercules, CA), il y a migration des protéines à 200 V, avec le tampon MOPS. Cette migration se poursuit jusqu'au moment où le marqueur protéique rouge (63 kDa) atteint le bas du gel. Les protéines séparées par l'électrophorèse sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond ECL, à 100 V, dans un tampon transfert pendant 30 min à 4 °C.

Le transfert effectué, les membranes sont bloquées, avec du tampon de blocage sans Tween 20, pendant 1 h à la température de la pièce. Après avoir été nettoyé (4 X 5 min), les membranes sont incubées dans le premier anticorps toute la nuit à 4 °C (Tableau III, p.53). Cette incubation effectuée, les membranes sont nettoyées (4 X 5 min) pour ensuite être incubées dans le deuxième anticorps conjugué à la peroxidase pendant 60 min (Tableau III, p. 53). Les membranes sont ensuite lavées (4 X 5 min) et trempées pendant 1 min dans le substrat chimioluminescent Super Signal pour ainsi observer l'activité peroxidase sur les films X-OMAT Blue XB-1 (Kodak, Rochester, NY). Les bandes résultantes sont quantifiées par densimétrie avec le logiciel Alpha-Ease (Alpha Innotech, San Leandro, CA).

Étude	Premier anticorps	Deuxième anticorps
α_1	Anticorps de lapin, anti- α_1 (1:1000 dans le tampon d'immunobuvardage + 2 % de sérum de veau)	Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à HRP (1:15000 dans le tampon d'immunobuvardage + 2 % de sérum de veau)
α_8	Anticorps de lapin, anti- α_8 (1:2000 dans le tampon d'immunobuvardage + 2 % de sérum de veau)	Immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à HRP (1:15000 dans le tampon d'immunobuvardage + 2 % de sérum de veau)

Tableau III : Résumé des anticorps utilisés pour l'immunobuvardage, ainsi que de leur concentration

HRP : Horseradish peroxidase

2.10. Test de radio-liaison

Chacuns des échantillons, de 10 μ g de protéines solubilisées, sont incubés dans un volume total de 20 μ l contenant 200 000 cpm d'échistatine iodée (Thibault, 2000), du tampon hepes 0,2 M et du tampon de liaison 5X. Les échantillons sont agités et laissés reposer à la température de la pièce pendant 90 min. Après cette étape, 5 μ l de tampon d'échantillon 5X (6 % SDS) est ajouté.

L'échelle de standards protéiques colorés et les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse non dénaturant (sans thiol et sans chauffage) de 6 % de polyacrylamide (SDS-PAGE) dans un système Mini-Protean II (Bio-Rad, Hercules, CA) selon Laemmli, (1970). Le gel migre à 100 V, avec le tampon de migration, jusqu'au moment où la bande rouge (63 kDa) du marqueur protéique atteint le bas du gel.

Le gel est ensuite coloré avec 0,05 % de bleu de coomassie pendant 45 min et décoloré avec la solution 1 : 1 : 9 et 5 : 1 : 5 pendant 15 et 45 minutes respectivement.

Après avoir séché le gel, il est exposé sur un écran Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) toute la nuit et peut ainsi être numérisé par le numériseur storm (Molecular

Dynamics, Sunnyvale, CA). Les bandes, représentant le complexe intégrine RGD-échistatine, sont quantifiées par le programme Phosphorimager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

2.11. Zymographie

Les échantillons contiennent 10 μg de protéines, provenant du milieu de base des matrices isométriques, 5 μl de tampon d'échantillon et de l'eau distillée, afin d'obtenir un volume total de 20 μl .

L'échelle de standards protéiques colorés, le standard MMP-2 (15 ng) et les échantillons sont déposés sur un gel d'électrophorèse pour la zymographie, contenant 0,1 % de gélatine et 10 % d'acrylamide. La migration s'effectue à 100 V, avec le tampon de migration, pendant 2 heures. Les gels, une fois récupérés, sont nettoyés (30 min et 4 X 5 min à 37 °C) dans le tampon de renaturation. Il y a ensuite incubation des gels à 37 °C, pendant 18 h, dans le tampon substrat. Ceci étant effectué, il y a coloration avec 0,5 % de bleu de coomassie pendant 30 minutes et décoloration avec la solution 5-1-5 pendant 1 h. Les bandes sont quantifiées avec le programme Alpha-Ease.

2.12. Tests statistiques utilisés

Un test de double analyse de variance (ANOVA) a été utilisé, afin de déterminer l'effet du temps et de la stimulation au TGF- β_1 sur le diamètre, l' α_8 , l' α_1 , l' $\alpha_8\beta_1$ et la MMP-2 de la MEC à trois dimensions. À cet effet, les programmes Sigma Plot et Sigma Stat (SPSS Inc., Chicago, IL) ont été utilisés.

CHAPITRE TROIS :
RÉSULTATS

CHAPITRE TROIS : RÉSULTATS

1. Étude de la contractilité sur les matrices isotoniques

Afin de vérifier si le TGF- β_1 a un effet sur la contractilité, nous avons déposé 1, 3 ou 10 ng/mL de TGF- β_1 sur les matrices isotoniques qui étaient à jeun depuis 24 h. Nous avons par la suite mesuré le diamètre des matrices 0, 24, 48 et 72 h * après le début des stimulations.

En ce qui a trait les fibroblastes cardiaques, nous observons une diminution significative du diamètre (11 à $2,5 \pm 0,2$ mm) en fonction de la concentration en TGF- β_1 (Figure 15A, p.57) et du temps (Figure 15B, p.57).

Pour ce qui est des VSMC, il y a une diminution significative du diamètre (11 à $4,3 \pm 0,3$ mm) en fonction du temps (Figure 16B, p.58). Toutefois, contrairement à ce que nous observons avec les fibroblastes cardiaques, il y a une diminution significative seulement entre le diamètre des matrices non-stimulées et stimulées au TGF- β_1 (1,3,10 ng/mL) (Figure 16A, p.58).

Donc, cette étude nous a permis de démontrer que le TGF- β_1 et le temps ont un effet sur la contractilité des matrices des fibroblastes cardiaques et des VSMC.

2. Immunocytochimie

Plusieurs études immunocytochimiques (Tableau II, p. 50) ont été effectuées sur des tranches de matrices isométriques à trois dimensions, stimulées ou non au TGF- β_1 . Après avoir fixé ces dernières à différents temps, nous avons observé l'effet du TGF- β_1 sur les différentes composantes de la MEC et des cellules (Tableau IV, p. 77 et 78).

* Mesure effectuée seulement chez les fibroblastes cardiaques

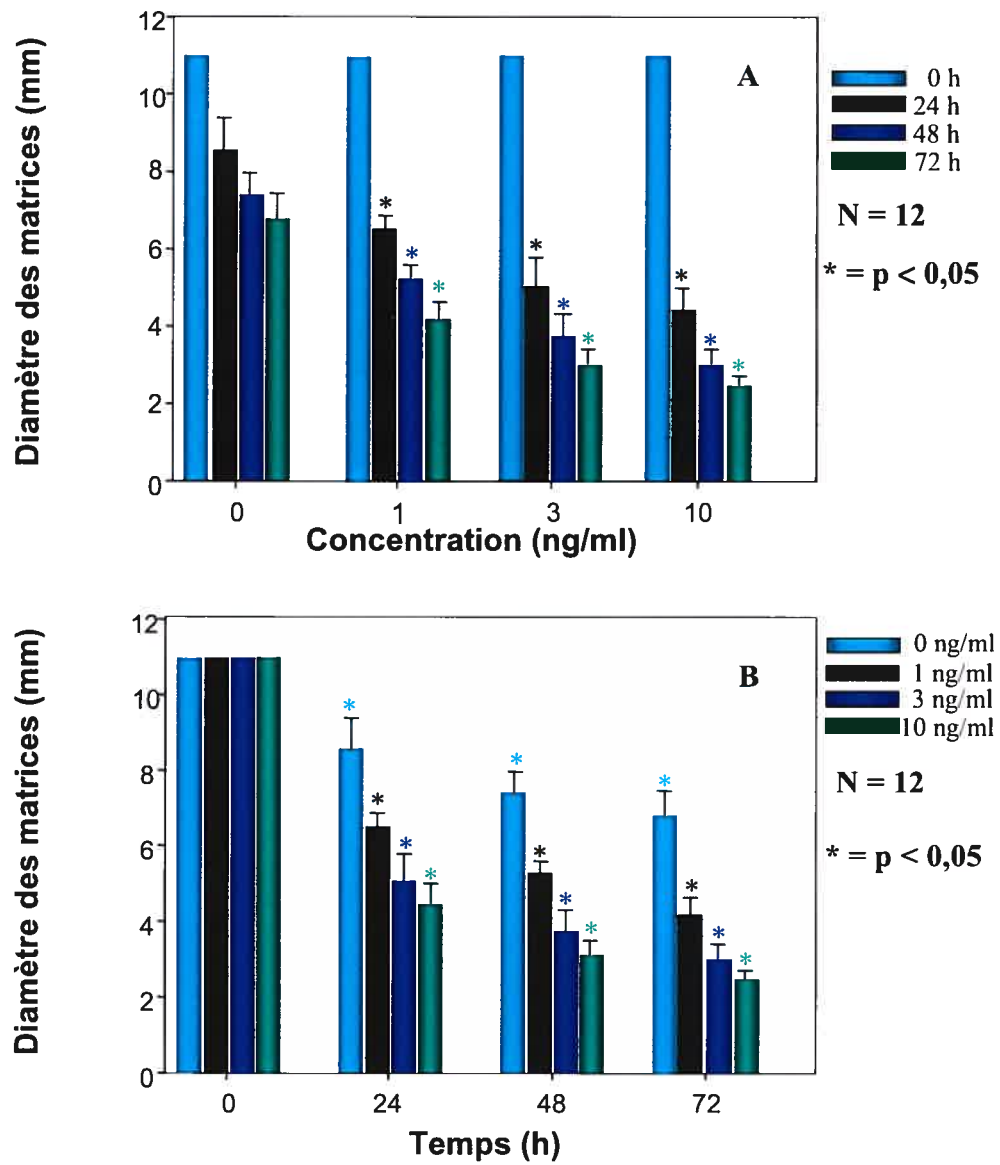


Figure 15: Étude de la contraction des matrices isotoniques, contenant des fibroblastes cardiaques, en fonction de la concentration en TGF- β_1 (A) et du temps de stimulation (B)

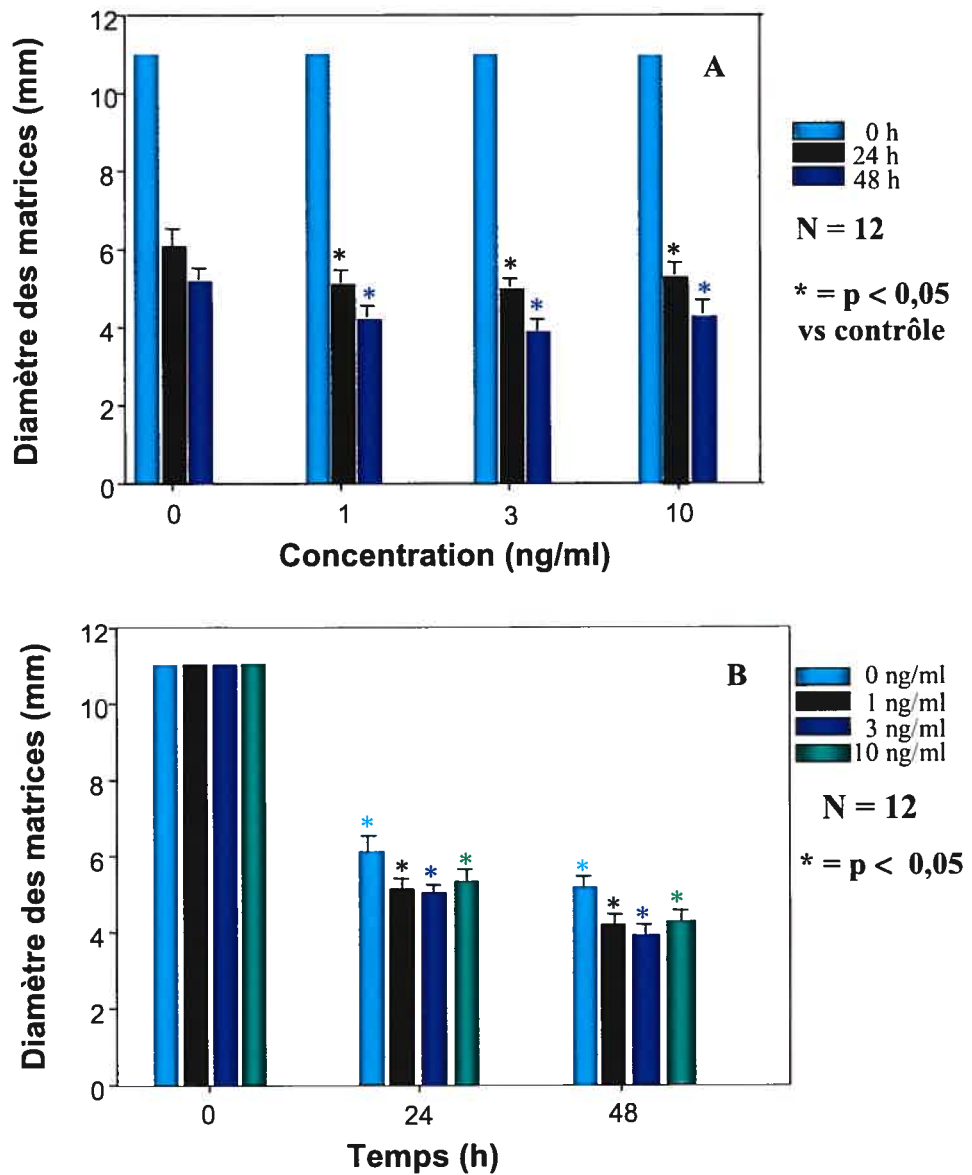


Figure 16 : Étude de la contraction des matrices isotoniques, contenant des VSMC, en fonction de la concentration en TGF- β_1 (A) et du temps de stimulation (B)

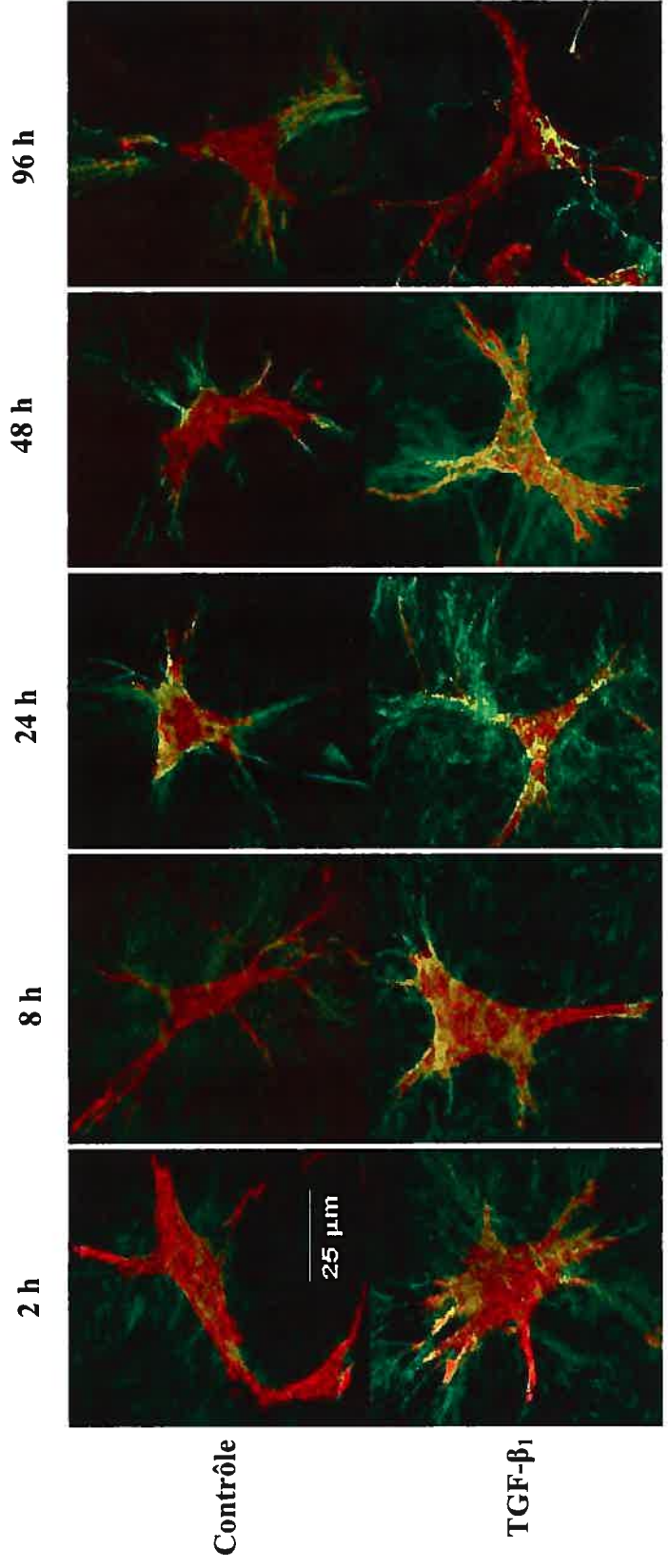
2.1. Étude de l'interaction entre la F-actine et la fibronectine

Pour cette étude, la F-actine est marquée en rouge et la fibronectine en vert.

Comme nous pouvons le constater à partir de la figure 17 (p. 60), la fibronectine et l'interaction entre la F-actine et la fibronectine (observée par la colocalisation) semblent augmenter chez les fibroblastes cardiaques en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 . Cependant, il est à noter qu'il semble y avoir une baisse de fibronectine et, par le fait même, de l'interaction entre la F-actine et la fibronectine chez les fibroblastes cardiaques stimulés pendant 96 h.

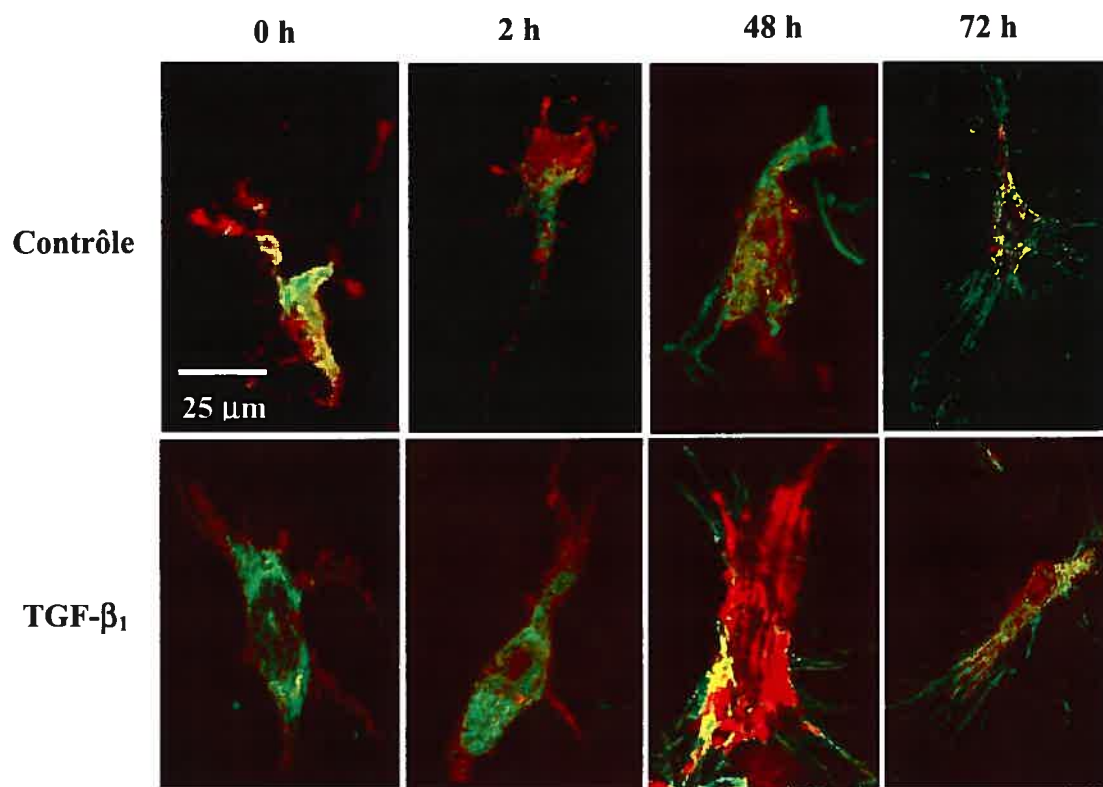
Pour ce qui est des VSMC (Figure 18, p. 61), il se produit, de façon moins prononcée, les mêmes phénomènes que chez les fibroblastes cardiaques, à l'exception de la baisse de fibronectine et de l'interaction entre la F-actine et la fibronectine à 96 h.

Finalement, nous notons, d'après les figures 17 et 18 (p. 60 et 61), qu'il ne semble pas y avoir d'effet du TGF- β_1 sur la quantité de F-actine des fibroblastes cardiaques et des VSMC.



Rouge : F-Actine
Vert : Fibronectine

Figure 17 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la F-actine et la fibronectine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF-β₁ (10 ng/mL)



Rouge : F-Actine
Vert : Fibronectine

Figure 18 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la F-actine et la fibronectine des VSMC contrôles et stimulés au TGF-β₁ (10 ng/mL)

2.2. Étude de l'interaction entre la fibronectine et collagène bovin

Pour cette étude, la fibronectine est marquée en rouge, le collagène en vert et le noyau en bleu.

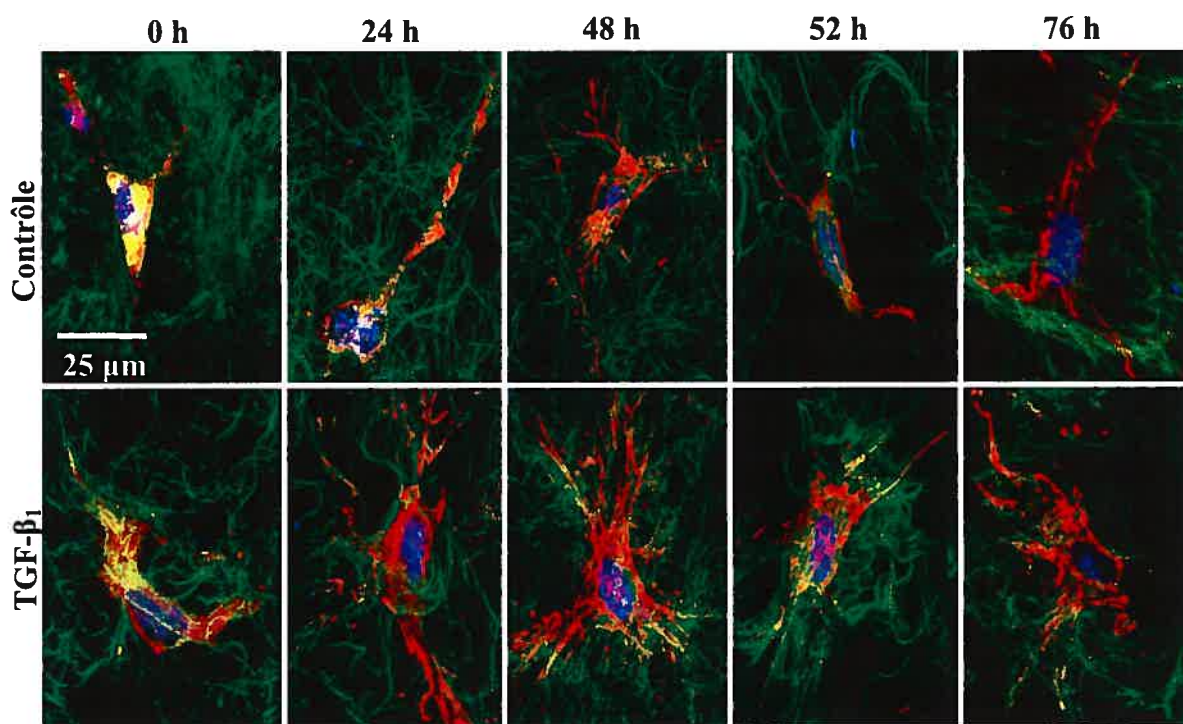
En ce qui a trait les fibroblastes cardiaques (Figure 19, p. 63), il semble y avoir une augmentation de l'interaction fibronectine-collagène bovin en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 . Toutefois, cette observation s'applique jusqu'à 52 h. En effet, après ce temps, il semble y avoir une moins grande interaction entre les deux composantes.

Pour ce qui des VSMC (Figure 20, p. 64), il semble avoir une augmentation de l'interaction fibronectine-collagène bovin en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 et ce, jusqu'à 96 h.

2.3. Étude de l'interaction entre la fibronectine et le collagène (synthétisé par les cellules)

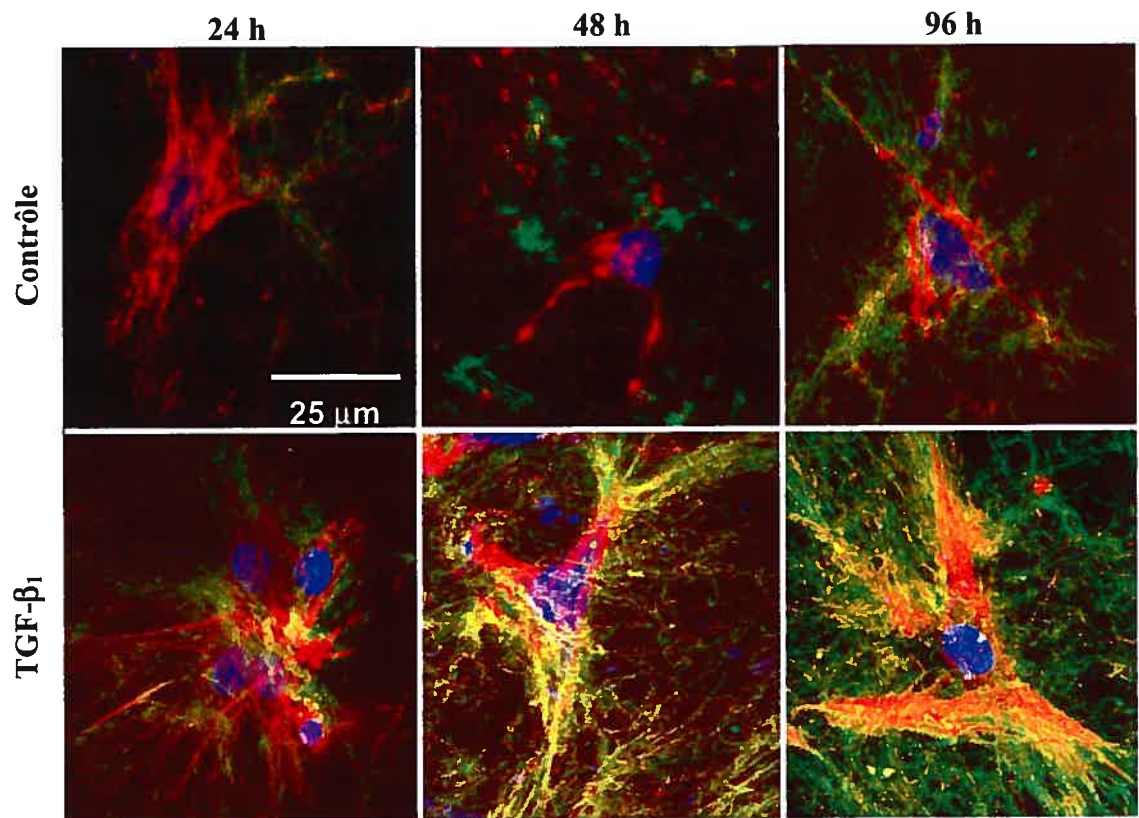
Pour cette étude, la fibronectine est marquée en rouge et le collagène, synthétisé par les fibroblastes cardiaques ou les VSMC, en vert.

Nous constatons, d'après les figures 21 et 22 (p. 65 et 66), que la stimulation au TGF- β_1 ne semble pas affecter la synthèse de collagène et l'interaction fibronectine-collagène chez les deux types de cellules.



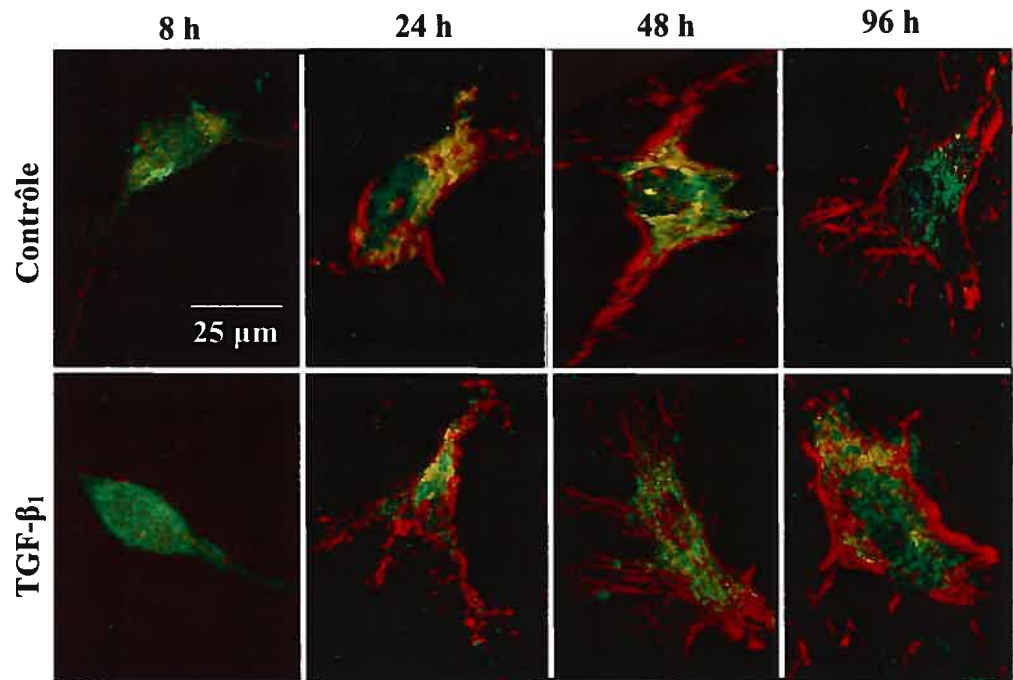
Rouge : Fibronectine
Vert : Collagène bovin de type I
Bleu : Noyau

Figure 19 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la fibronectine et le collagène bovin des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF-β₁ (10 ng/mL)



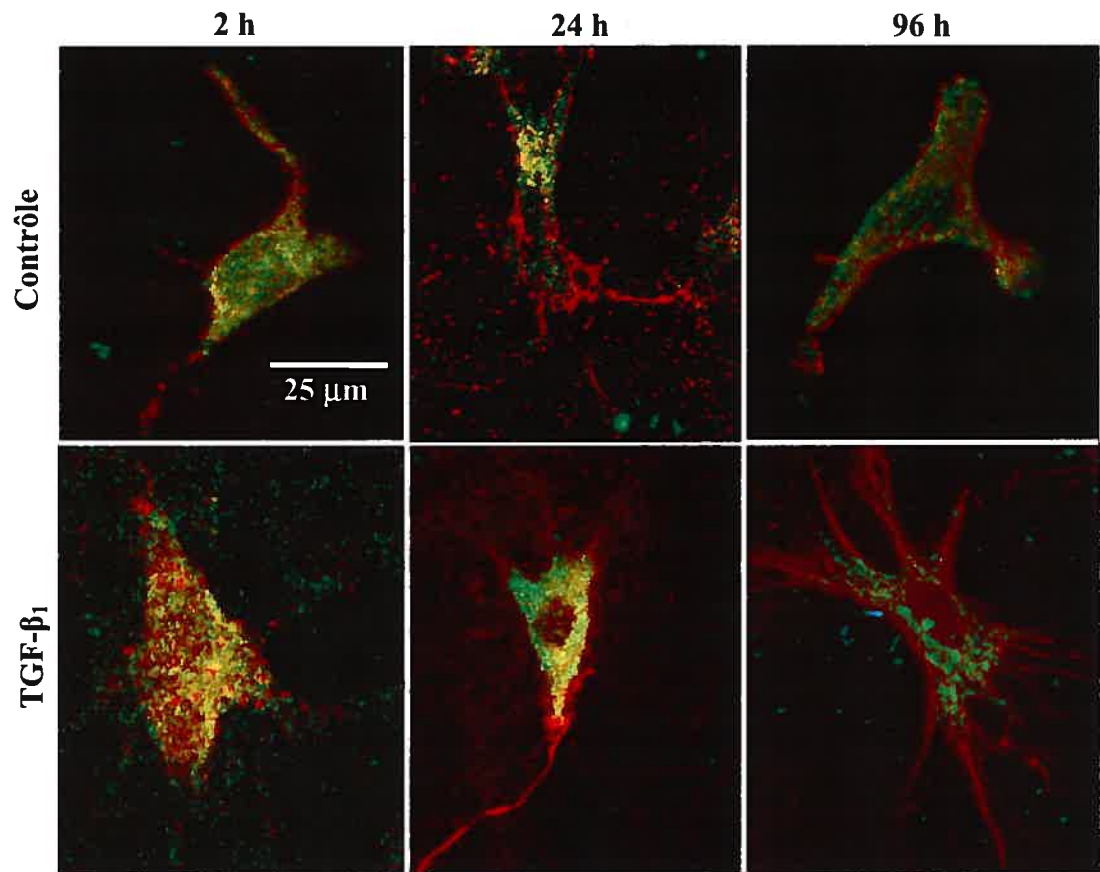
Rouge : Fibronectine
Vert : Collagène bovin de type I
Bleu : Noyau

Figure 20 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la fibronectine et le collagène bovin des VSMC contrôles et stimulés au TGF-β₁ (10 ng/mL)



Rouge : Fibronectine
Vert : Collagène

Figure 21 : Immunocytochimie étudiant l'interaction entre la fibronectine et le collagène synthétisé par les fibroblastes cardiaques en fonction du temps et de la stimulation au TGF-β₁ (10 ng/mL)



Rouge : Fibronectine

Vert : Collagène

Figure 22 : Immunocytochimie étudiant l'interaction entre la fibronectine et le collagène synthétisé par les VSMC en fonction du temps et de la stimulation au TGF-β₁ (10 ng/mL)

2.4. Étude de l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la fibronectine

Pour cette étude, nous avons marqué la fibronectine en rouge, l' α_8 en vert et le noyau en bleu.

Chez les fibroblastes cardiaques (Figure 23, p. 68), nous constatons, à 2 h et 24 h, qu'il semble y avoir beaucoup plus de sous-unités α_8 chez les contrôles comparativement aux cellules stimulées au TGF- β_1 de ces mêmes temps. Toutefois, les fibroblastes cardiaques stimulés pendant 48 heures semblent avoir beaucoup plus d' α_8 , comparativement aux contrôles, favorisant ainsi la forte interaction α_8 -fibronectine.

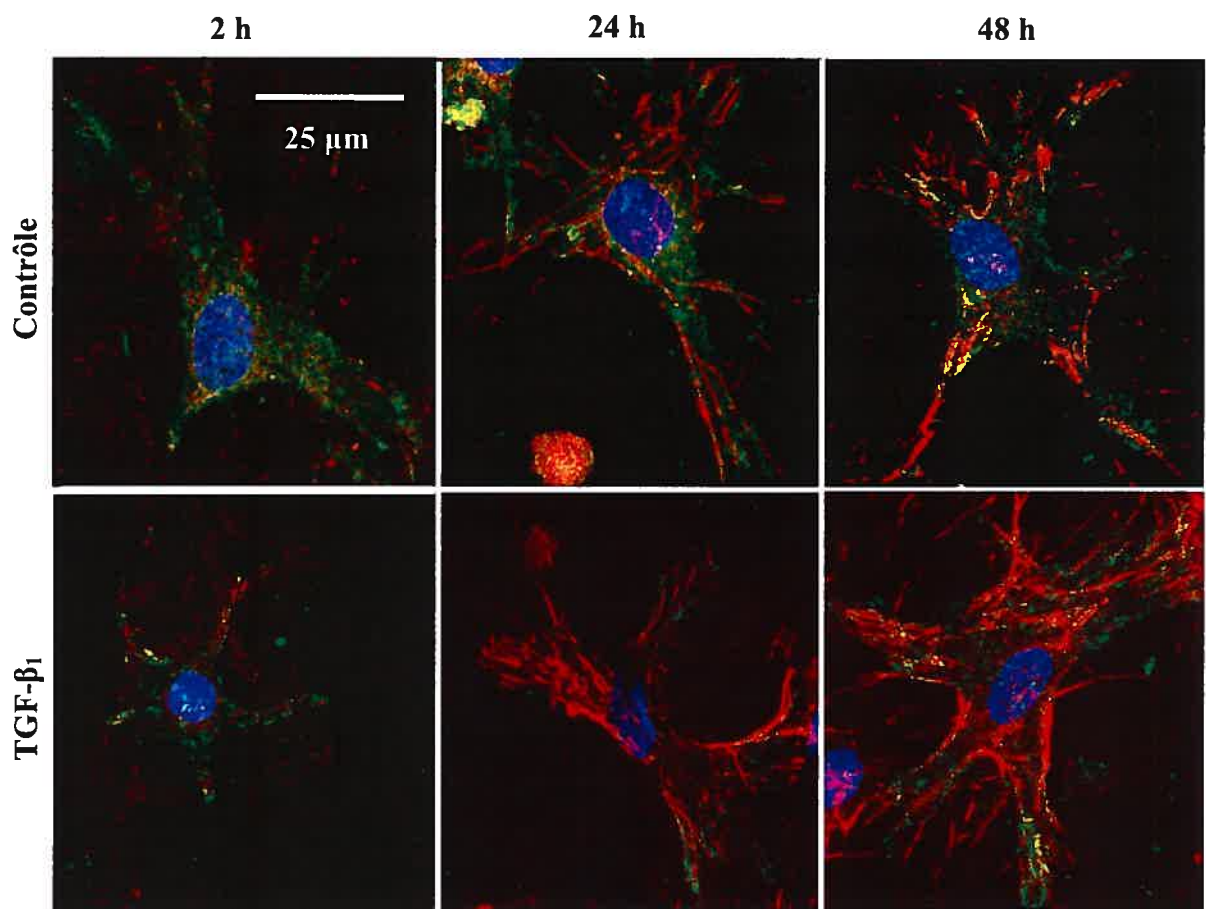
En ce qui a trait les VSMC (Figure 24, p. 69), nous observons une tendance à l'augmentation de la sous-unité α_8 et de l'interaction α_8 -fibronectine, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 .

2.5. Étude de l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la vinculine

Nous avons marqué, pour cette étude, la vinculine en rouge, l' α_8 en vert et le noyau en bleu.

Chez les deux types cellulaires (Figures 25 et 26, p. 70 et 71), nous remarquons qu'il y a une tendance à l'augmentation de l'interaction l' α_8 -vinculine en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 . Cependant, chez les fibroblastes cardiaques, une stimulation de 72 heures produit l'effet contraire. De plus, nous notons, chez les VSMC ayant subis une stimulation de 2 h ou 24 h, moins d' α_8 comparativement aux contrôles.

Finalement, nous constatons que la stimulation au TGF- β_1 ne semble pas affecter la quantité de vinculine.

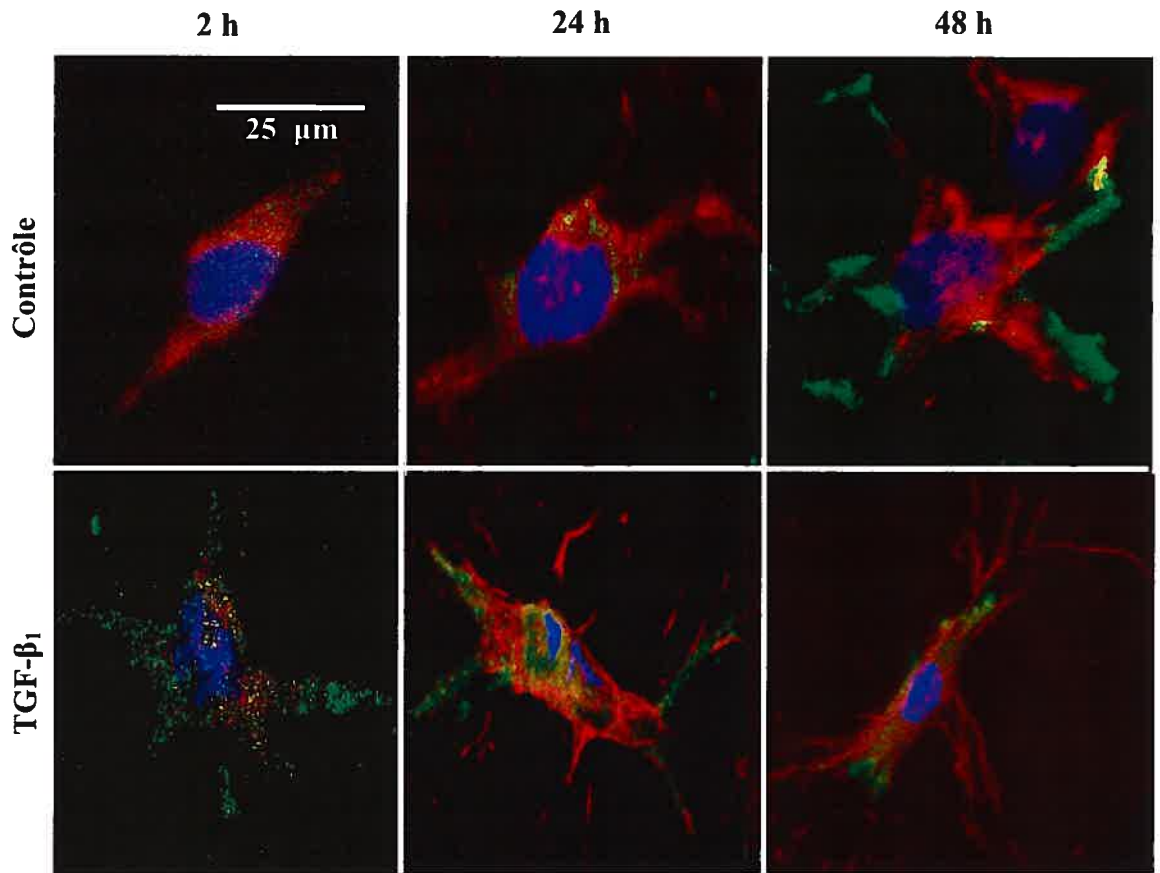


Rouge : Fibronectine

Vert : α_8

Bleu : Noyau

Figure 23 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la fibronectine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)

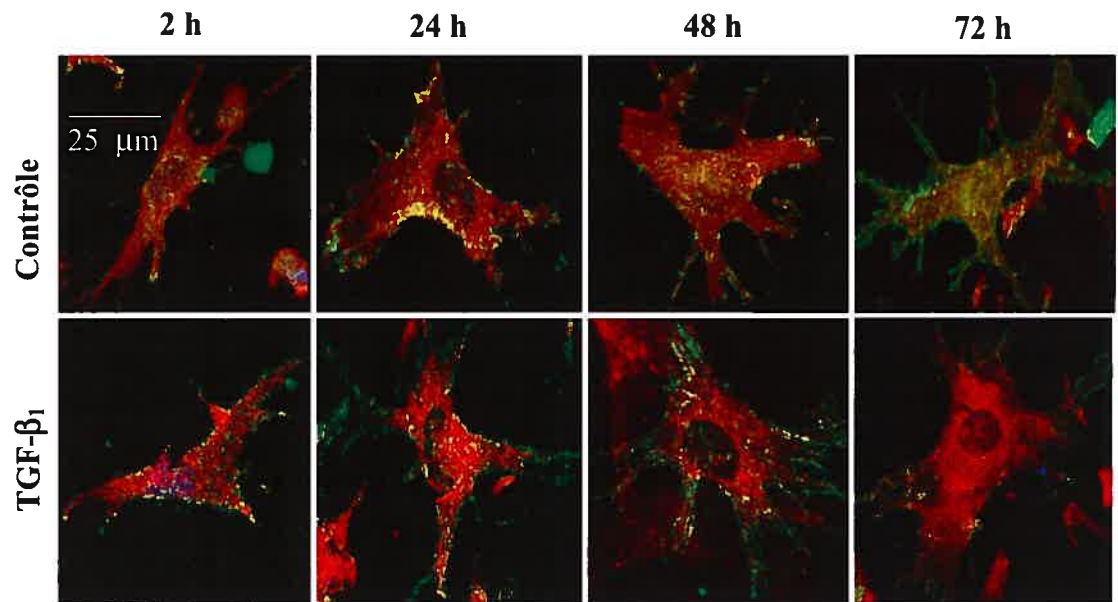


Rouge : Fibronectine

Vert : α_8

Bleu : Noyau

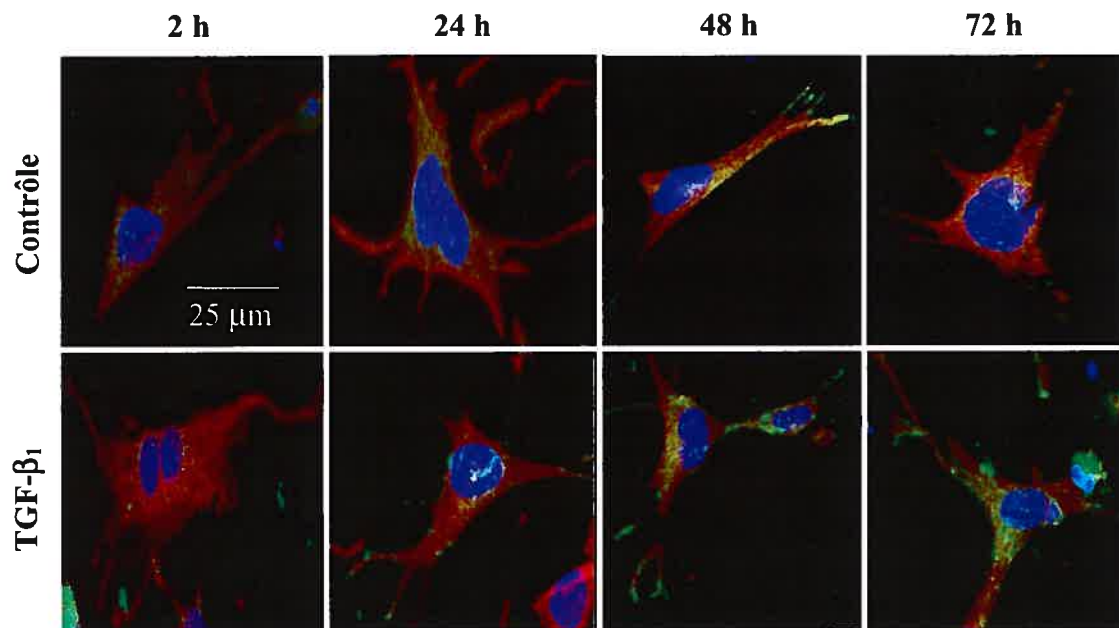
Figure 24 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la fibronectine des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)



Rouge : Vinculine

Vert : α_8

Figure 25 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la vinculine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)



Rouge : Vinculine
Vert : α_8
Bleu : Noyau

Figure 26 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_8 de l'intégrine et la vinculine des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)

2.6. Étude de l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la fibronectine

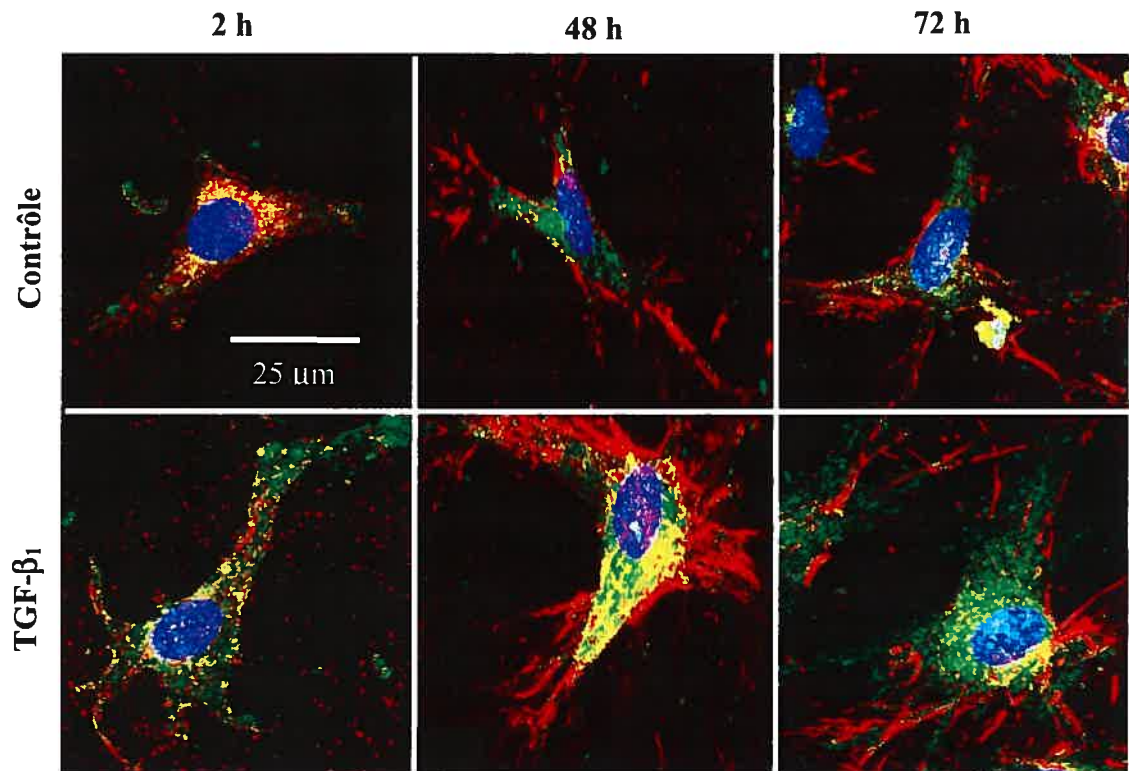
Nous avons marqué, pour cette étude, la fibronectine en rouge, l' α_1 en vert et le noyau en bleu.

Nous remarquons, dans les deux types cellulaires (Figures 27 et 28, p. 73 et 74), que la stimulation au TGF- β_1 ne semble pas affecter la quantité d' α_1 . De plus, autant chez les fibroblastes cardiaques que les VSMC, la stimulation au TGF- β_1 ne semble pas avoir d'effet sur l'interaction de ces deux composantes. En effet, comme chez les contrôles, il a y peu de colocalisation de l' α_1 avec la fibronectine.

2.7. Étude de l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la vinculine

Pour cette étude, nous avons marqué la vinculine en rouge, l' α_1 en vert et le noyau en bleu.

En ce qui a trait les deux types cellulaires (Figures 29 et 30, p. 75 et 76), nous constatons que la stimulation au TGF- β_1 ne semble pas affecter la quantité d' α_1 et l'interaction de cette dernière avec la vinculine.

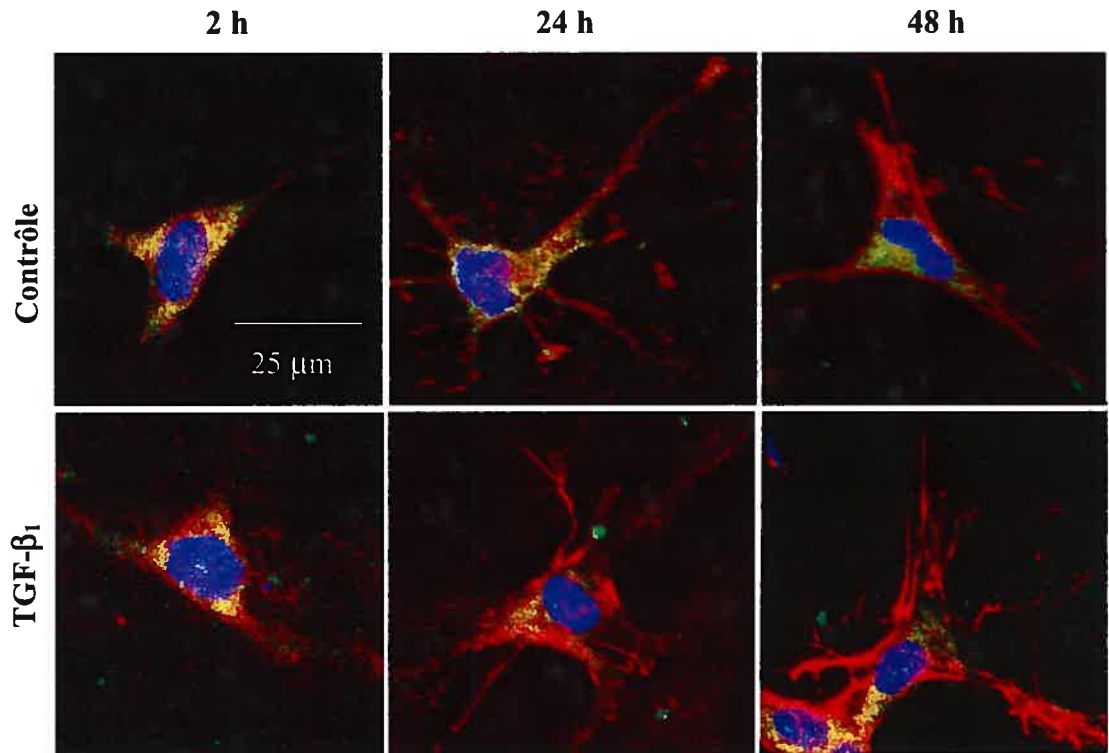


Rouge : Fibronectine

Vert : α_1

Bleu : Noyau

Figure 27 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la fibronectine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)

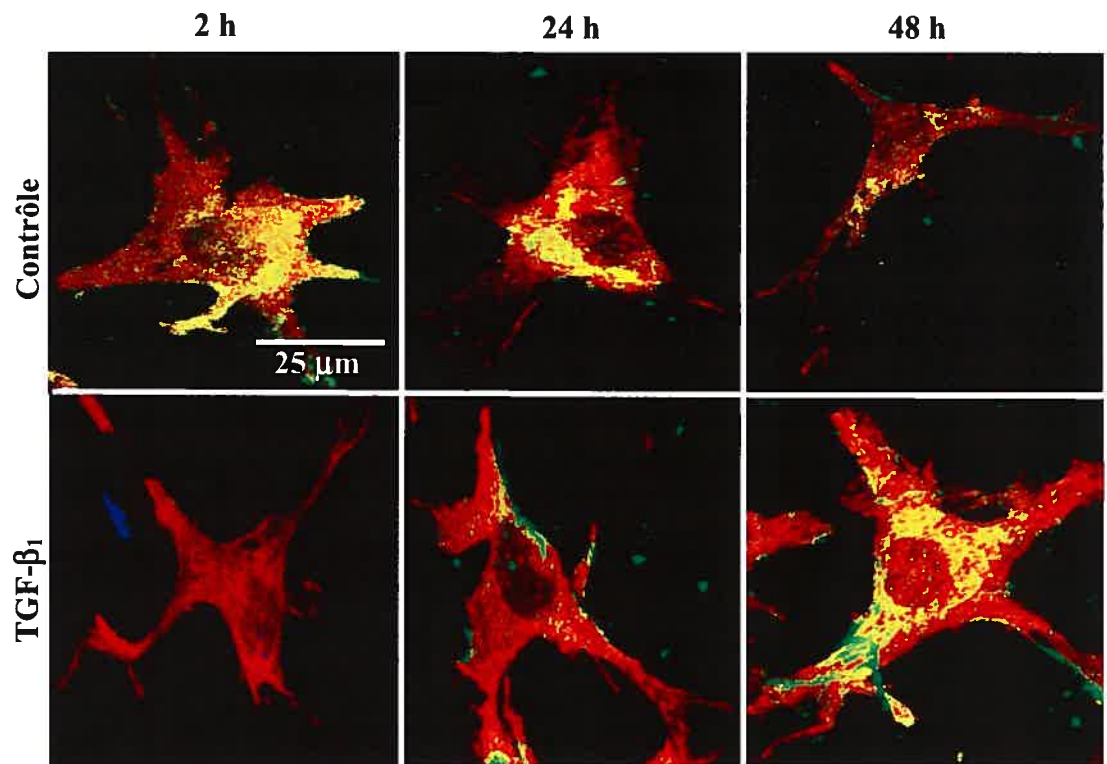


Rouge : Fibronectine

Vert : α_1

Bleu : Noyau

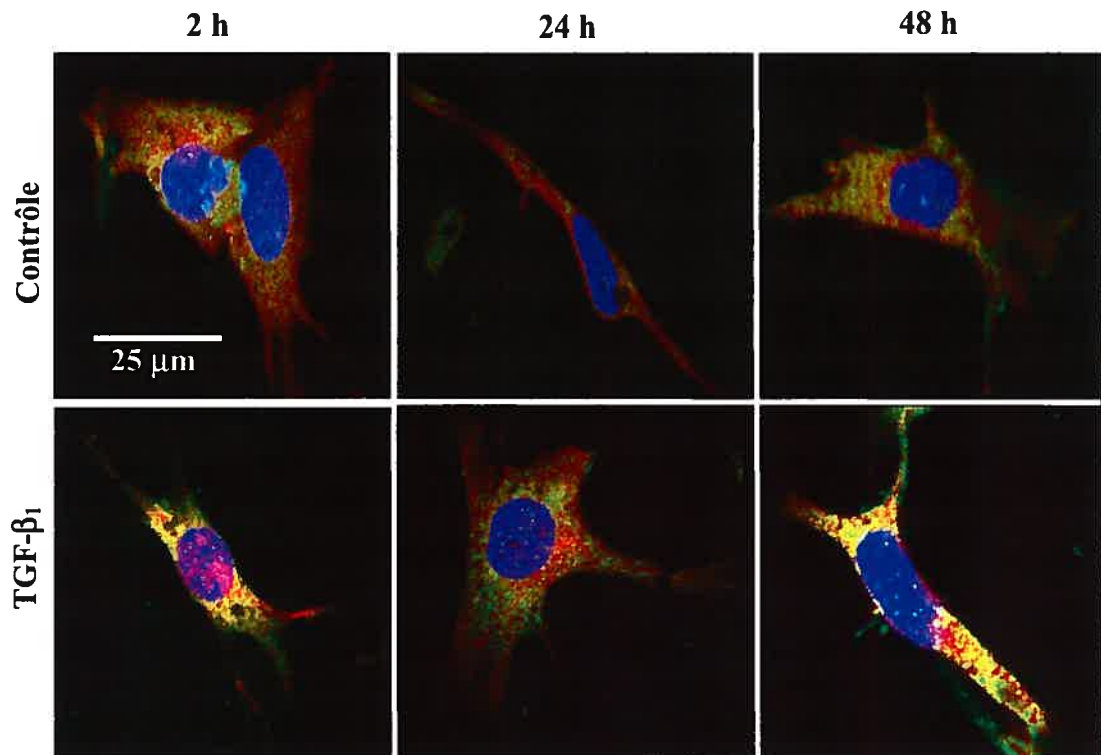
Figure 28 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la fibronectine des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)



Rouge : Vinculine

Vert : α_1

Figure 29 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la vinculine des fibroblastes cardiaques contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)



Rouge : Vinculine

Vert : α_1

Bleu : Noyau

Figure 30 : Immunocytochimie, comparant, à différents temps, l'interaction entre la sous-unité α_1 de l'intégrine et la vinculine des VSMC contrôles et stimulés au TGF- β_1 (10 ng/mL)

Étude	Cellules		Composantes							
	F.C.	VSMC	Actine	FN	Collagène bovin	Collagène rat	VN	α_8	α_1	Interaction
F-Actine - FN	X		=	↑ (sauf à 96 h)						↑ (sauf à 96 h)
		X	=	↑						↑
FN-Collagène bovin	X			↑	=					↑ (jusqu'à 52 h)
		X		↑	=					↑
FN-Collagène rat	X			↑		=				=
		X		↑		=				=
α_8 -FN	X			↑				Peu à 2 et 24 h, comparativement aux contrôles, et ↑ à 48 h		Plus forte interaction, comparativement aux contrôles, seulement à 48 h
		X		↑				↑		↑

Tableau IV (A) : Résumé des résultats obtenus en immunocytochimie sur les effets du TGF- β_1 (Première partie)

F-Actine : Filament d'actine, **VSMC** : Cellules musculaires lisses vasculaires, **F.C.** : Fibroblaste cardiaque, **FN** : Fibronectine, **VN** : Vinculine, **X** : Cellule sélectionnée, **↑** : augmentation de l'expression, **=** : Pas de changement au niveau de l'expression

Étude	Cellules		Composantes							
	F.C.	VSMC	Actine	FN	Collagène bovin	Collagène rat	VN	α_8	α_1	Interaction
α_8 -VN	X						=	↑		↑ (sauf 72 h)
		X					=	↑ (très peu comparative-ment aux contrôles à 2 et 24 h)		↑
α_1 -FN	X			↑					=	=
		X		↑					=	=
α_1 -VN	X						=		=	=
		X					=		=	=

Tableau IV (B) : Résumé des résultats obtenus en immunocytochimie sur les effets du TGF- β_1 (Deuxième partie)

F-Actine : Filament d'actine, **VSMC** : Cellules musculaires lisses vasculaires, **F.C.** : Fibroblaste cardiaque, **FN** : Fibronectine, **VN** : Vinculine, **X** : Cellule sélectionnée, **↑** : augmentation de l'expression, **=** : Pas de changement au niveau de l'expression

3. Étude de l'expression des sous-unités α_8 et α_1 de l'intégrine par immunobuvardage

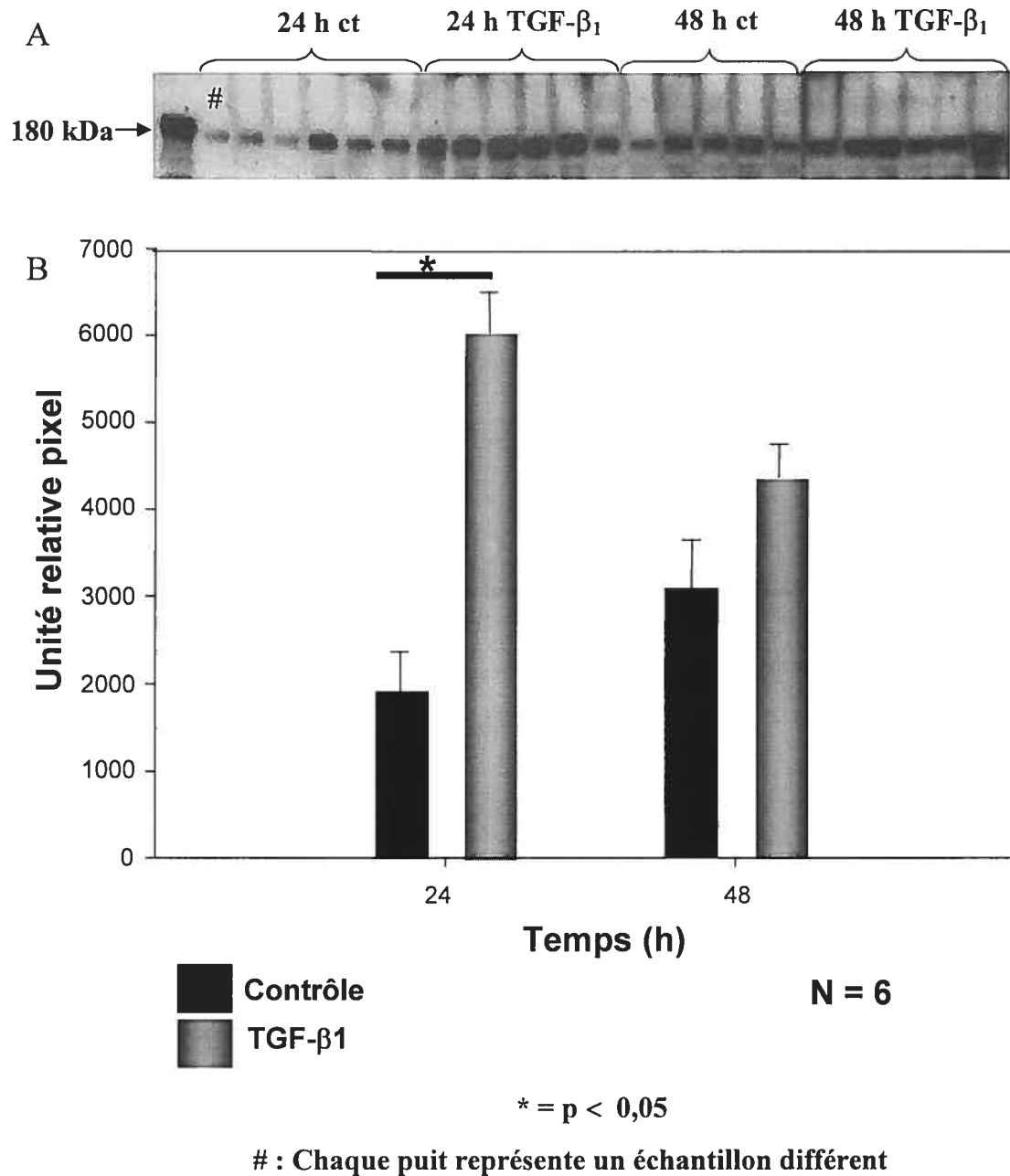
Afin d'étudier l'effet du TGF- β_1 sur l'expression de la sous-unité α_8 et α_1 de l'intégrine des fibroblastes cardiaques et des VSMC, provenant des matrices à trois dimensions, nous avons, en plus de l'étude immunocytochimique, effectué une immunobuvardage.

3.1. Étude de l'expression de la sous-unité α_8 de l'intégrine

Pour cette étude, nous avons marqué l' α_8 , avec l'anticorps de lapin anti- α_8 combiné à l'immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à HRP.

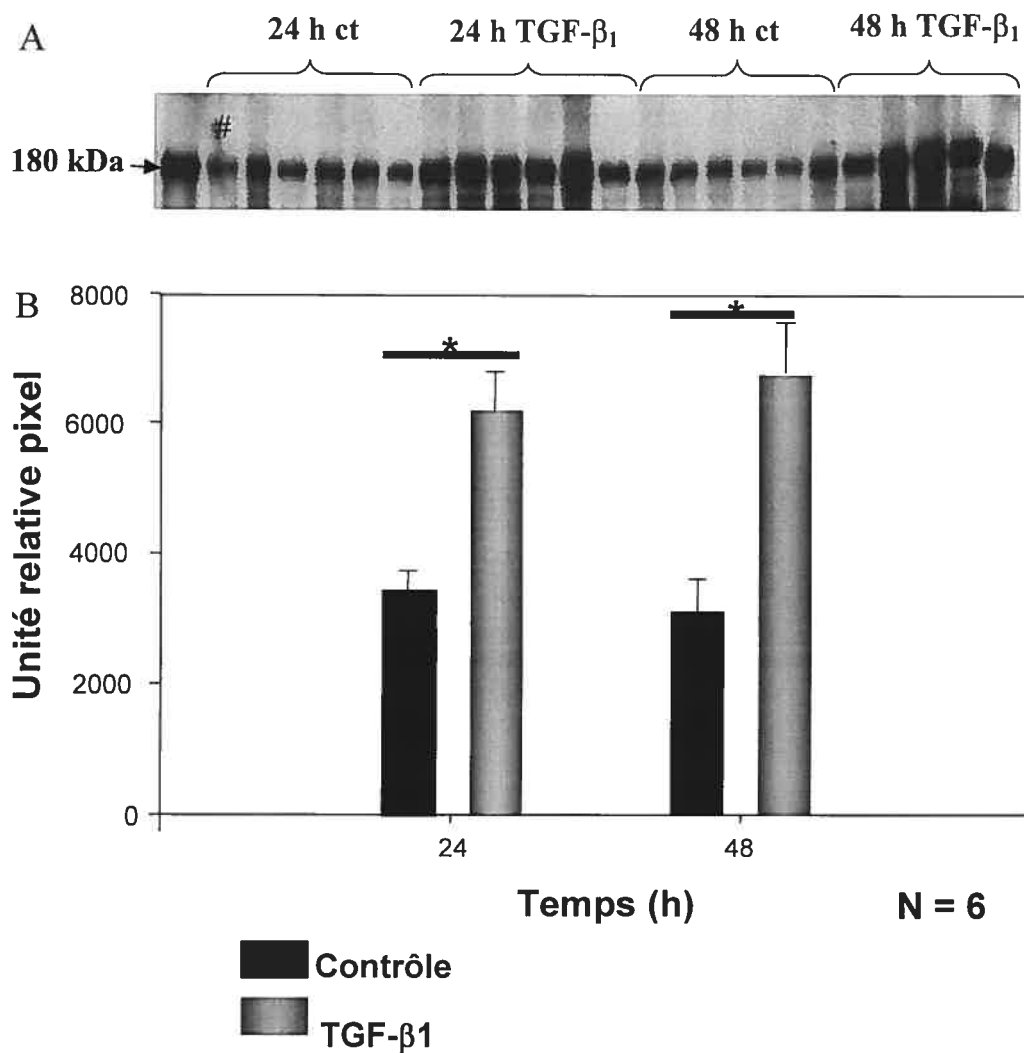
Nous pouvons constater, chez les fibroblastes cardiaques (Figure 31, p. 80), qu'il y a une augmentation significative, comparativement aux contrôles, de l'expression de l' α_8 après 24 h de stimulation au TGF- β_1 . Toutefois, le TGF- β_1 n'a pas d'effet significatif sur l' α_8 , 48 heures après le début des stimulations.

En ce qui a trait les VSMC (Figure 32, p. 81), nous observons une augmentation significative, comparativement aux contrôles, de l'expression de la sous-unité α_8 après 24 et 48 h de stimulation au TGF- β_1 .



Figures 31 : Étude, par immunobuvardage, de l'expression de la sous-unité α_8 de l'intégrine des fibroblastes cardiaques, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)

A : Représentation des protéines sur le gel, B : Représentation sous forme graphique de la quantification des protéines du gel



* = $p < 0,05$

: Chaque puit représente un échantillon différent

Figures 32 : Étude, par immunobuvardage, de l'expression de la sous-unité α_8 de l'intégrine des VSMC, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)

A : Représentation des protéines sur le gel, B : Représentation sous forme graphique de la quantification des protéines du gel

3.2. Étude de l'expression de la sous-unité α_1 de l'intégrine

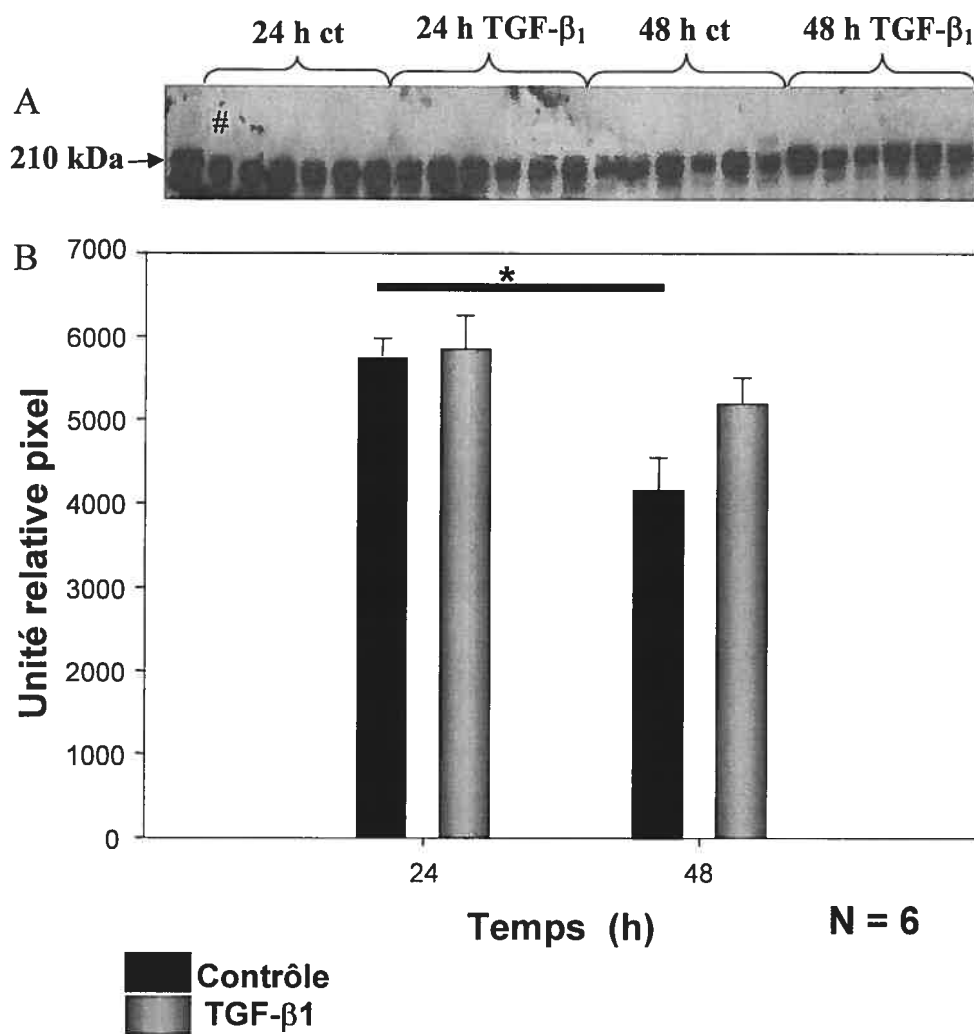
Pour cette étude, nous avons marqué l' α_1 avec l'anticorps de lapin anti- α_1 combiné avec de l'immunoglobuline de chèvre, anti-lapin, conjuguée à HRP.

Chez les fibroblastes cardiaques et les VSMC (Figures 33 et 34, p. 83 et 84), nous voyons que la stimulation au TGF- β_1 n'a pas d'effet significatif sur l'expression de l' α_1 . Cependant, si nous analysons les fibroblastes cardiaques en fonction du temps, nous observons une baisse significative entre les 24 et 48 h contrôles.

4. Étude de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ par test de radio-liaison

Afin d'étudier l'expression de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ des fibroblastes cardiaques et des VSMC, provenant des matrices extracellulaires à trois dimensions, nous avons effectué des tests de radio-liaison avec l' ^{125}I échistatine.

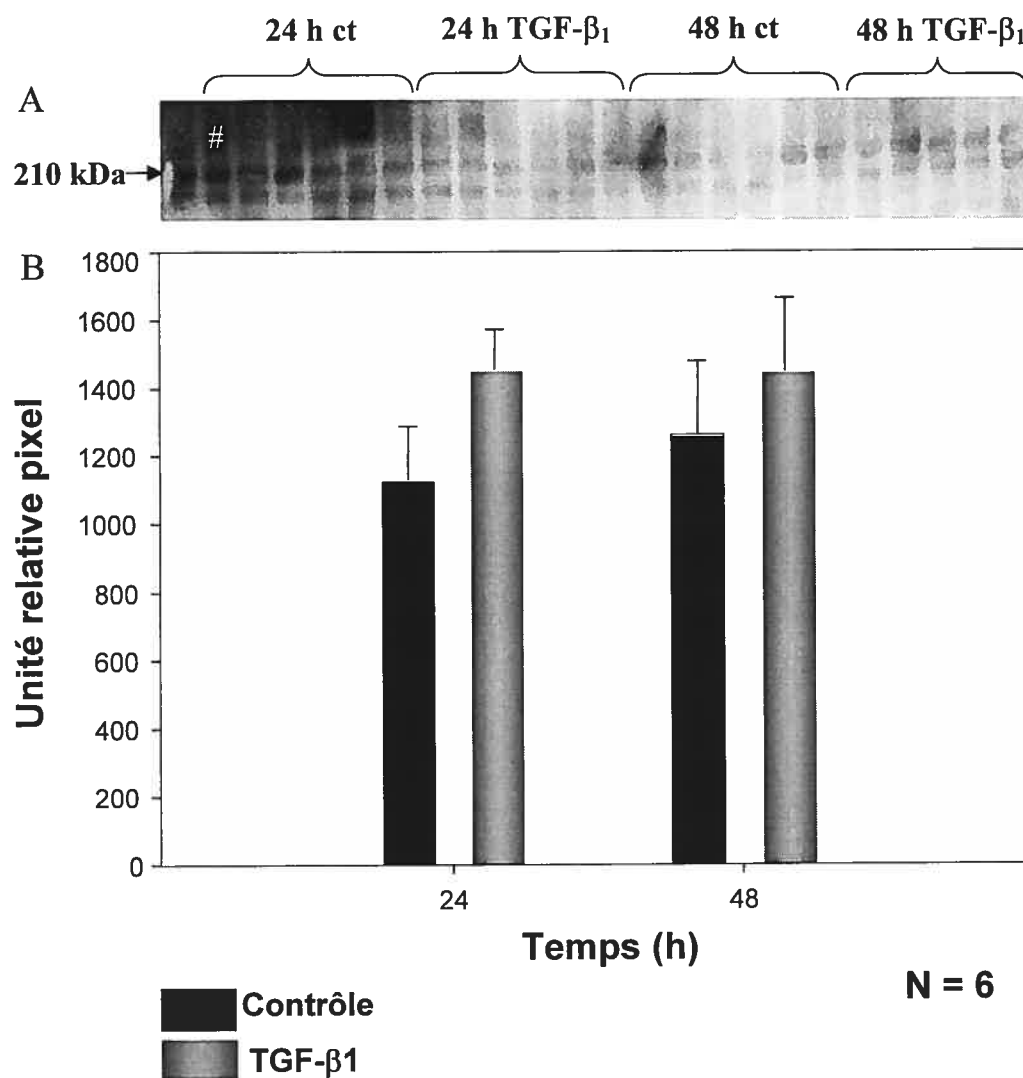
Nous observons, chez les deux types cellulaires (Figures 35 et 36, p. 85 et 86), une augmentation significative de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ après 48 h de stimulation au TGF- β_1 . De plus, si nous comparons l'expression de cette intégrine en fonction du temps, nous notons une augmentation significative entre les VSMC stimulées pendant 24 h et les VSMC stimulées pendant 48 h.



: Chaque puit représente un échantillon différent

Figure 33 : Étude, par immunobuvardage, de l'expression de la sous-unité α₁ de l'intégrine des fibroblastes cardiaques, en fonction du temps de stimulation au TGF-β₁ (10 ng/mL)

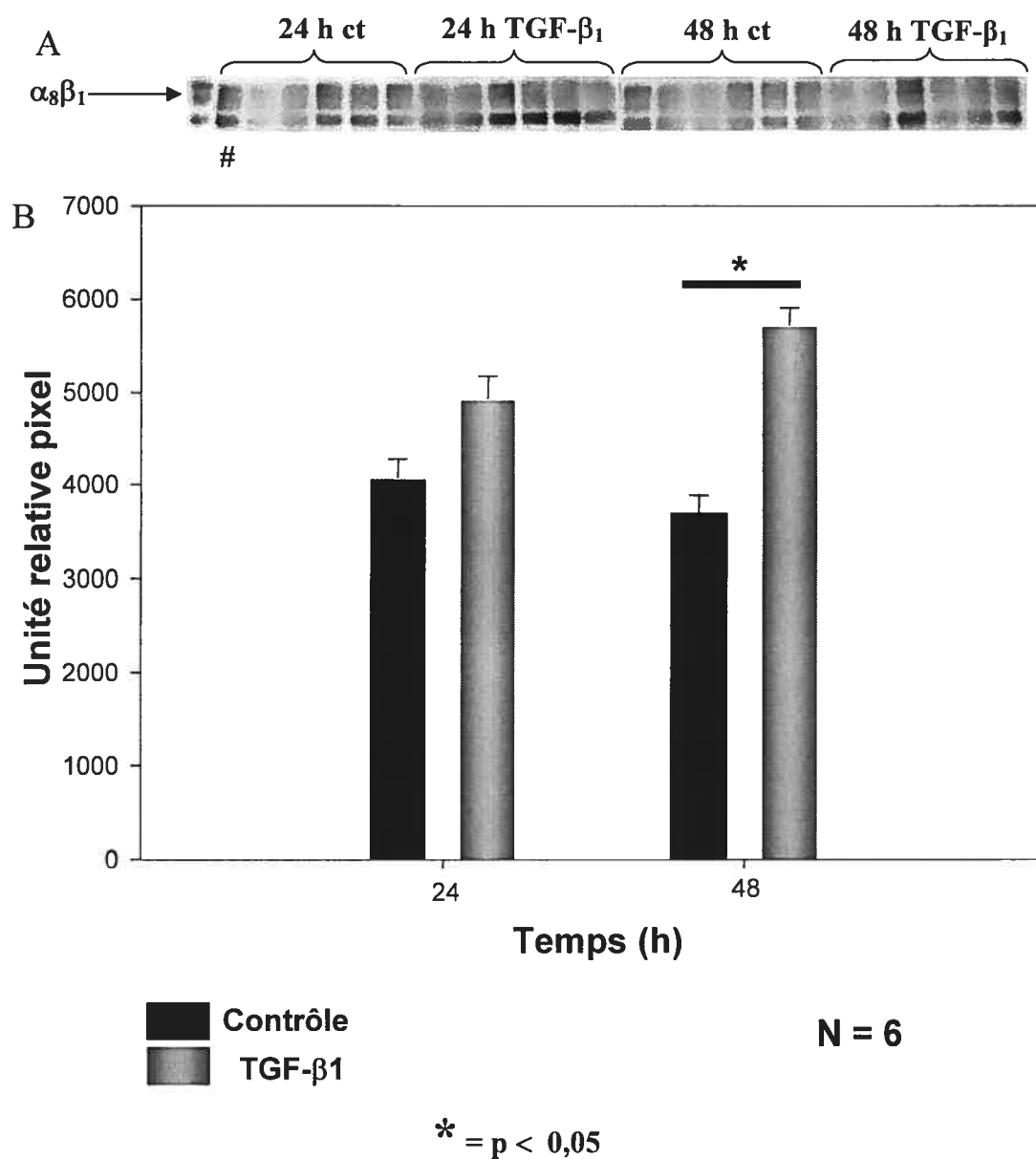
A : Représentation des protéines sur le gel, B : Représentation sous forme graphique de la quantification des protéines du gel



: Chaque puit représente un échantillon différent

Figure 34 : Étude, par immunobuvardage, de l'expression de la sous-unité α_1 de l'intégrine des VSMC, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)

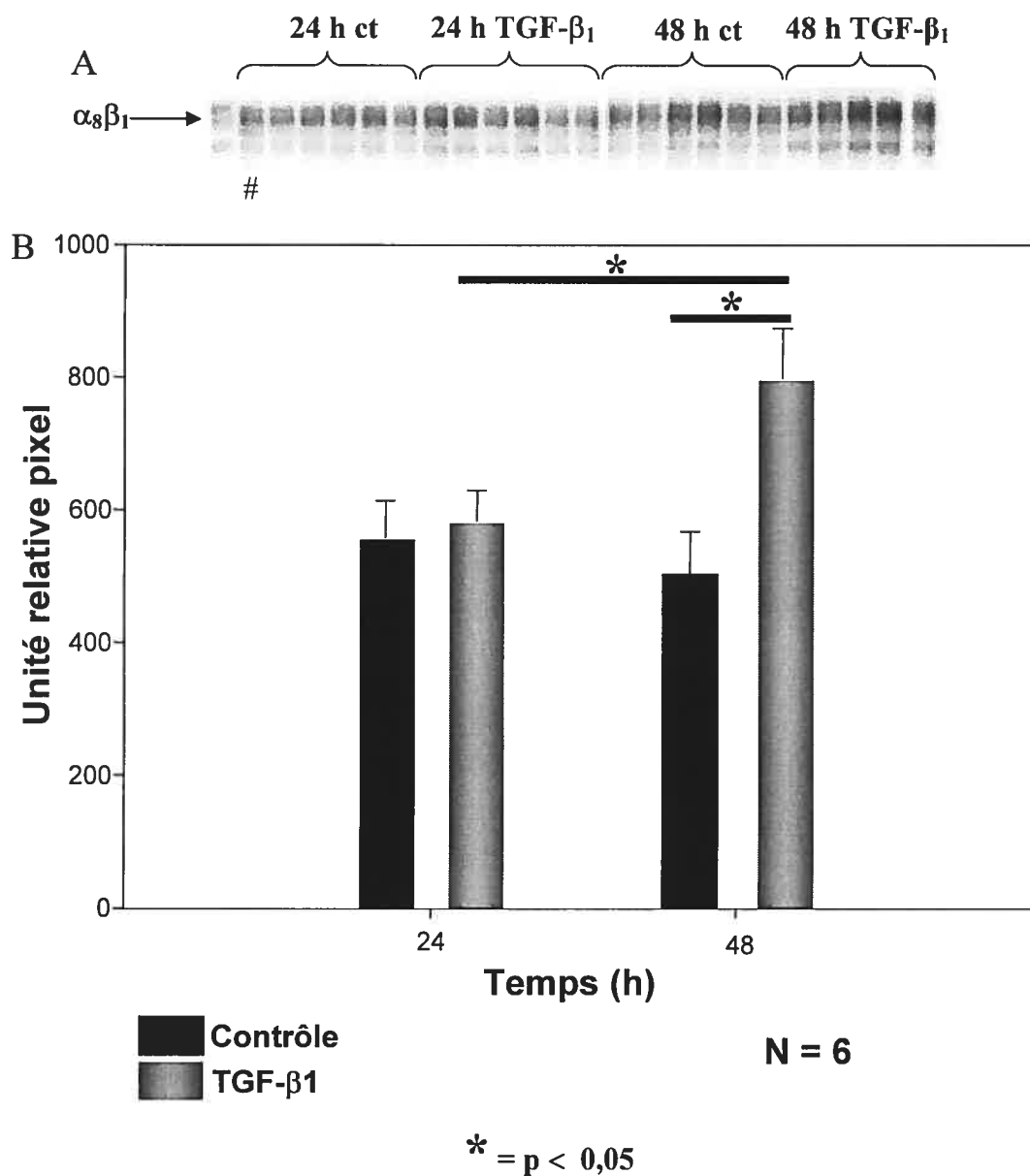
A : Représentation des protéines sur le gel, B : Représentation sous forme graphique de la quantification des protéines du gel



: Chaque puit représente un échantillon différent

Figure 35 : Étude, par test de radio-liaison, de l'expression de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ des fibroblastes cardiaques, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)

A : Représentation de la liaison protéine-ligand sur le gel, B : Représentation sous forme graphique de la quantification de la liaison protéine-ligand



: Chaque puit représente un échantillon différent

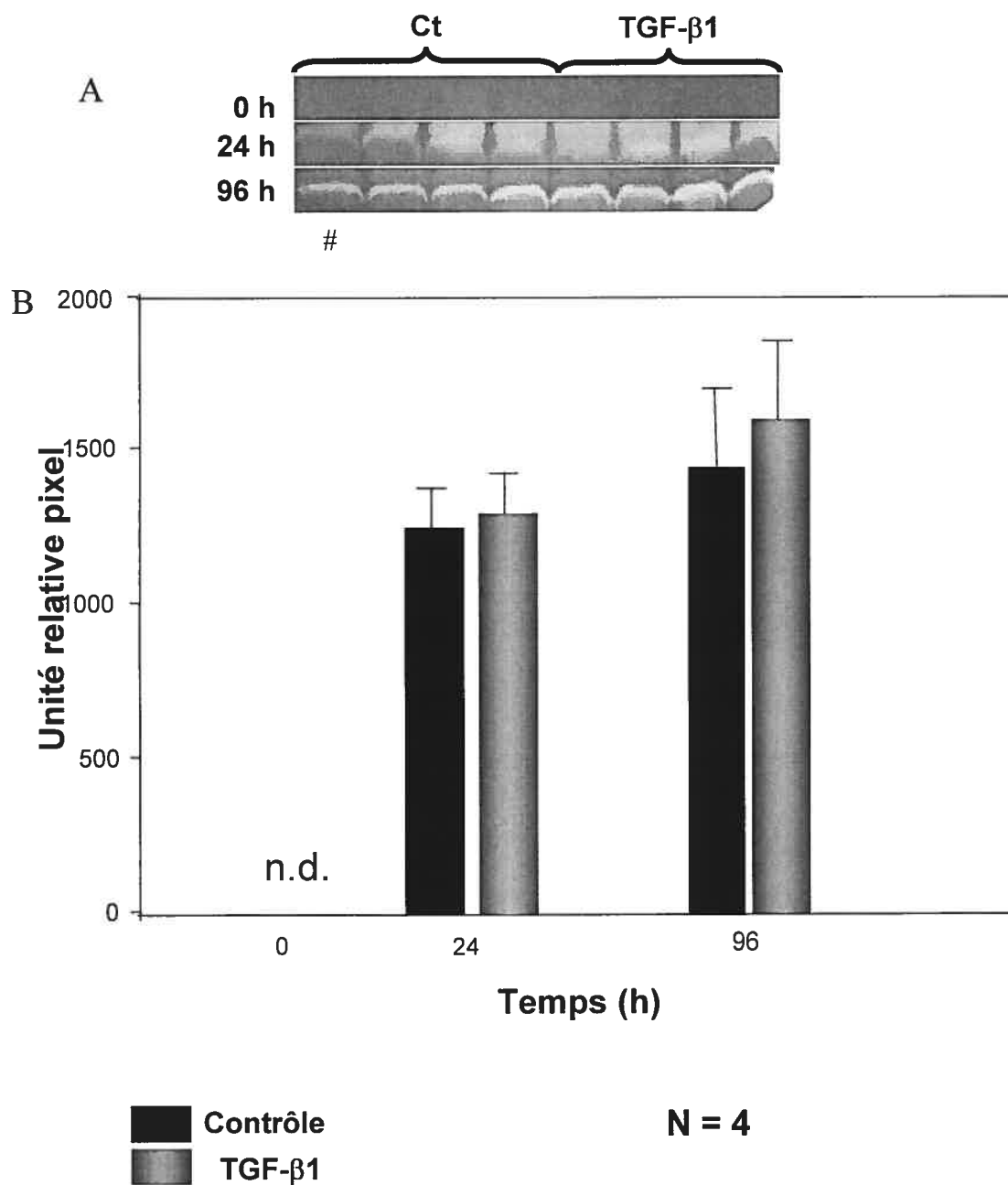
Figure 36 : Étude, par test de radio-liaison, de l'expression de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ des VSMC, en fonction du temps de stimulation au TGF- β_1 (10 ng/mL)

A : Représentation de la liaison protéine-ligand sur le gel, B : Représentation sous forme graphique de la quantification de la liaison protéine-ligand

5. Étude de l'activité enzymatique de MMP-2

Étant donné que nous avons observé, dans notre étude immunocytochimique, une baisse de fibronectine autour de certains fibroblastes cardiaques à des temps de 96 h, nous avons cru important d'analyser l'activité de MMP-2. Cette gélatinase, qui a pour substrat la fibronectine, a été étudiée par zymographie avec le milieu DMEM des matrices à trois dimensions.

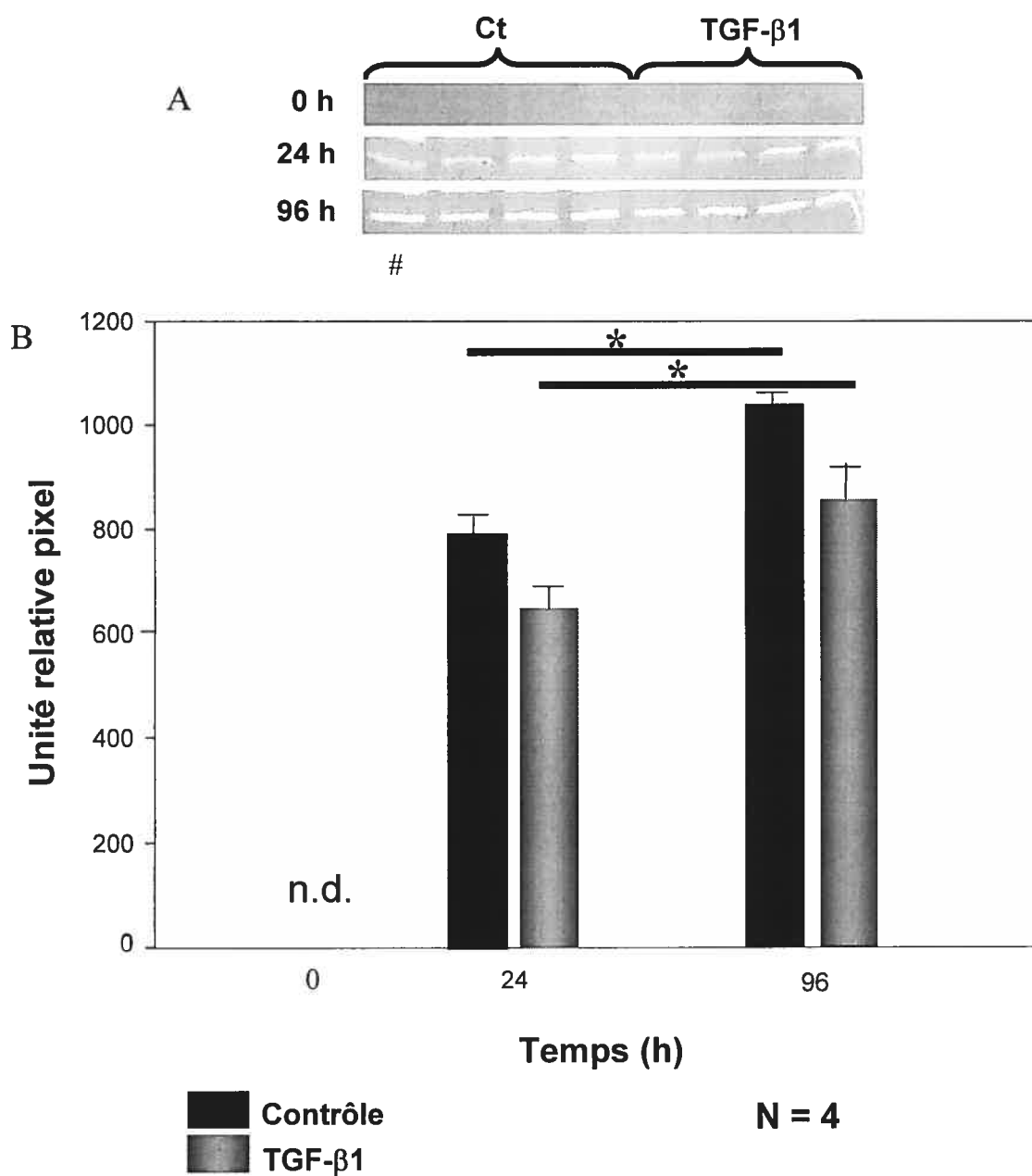
D'après les résultats obtenus (Figures 37 et 38, p. 88 et 89), nous pouvons observer, autant chez les fibroblastes cardiaques que chez les VSMC, qu'il n'y a pas d'effet significatif du TGF- β_1 sur l'activité enzymatique des MMP-2. Cependant, en fonction du temps, nous constatons une augmentation significative entre les VSMC 24 et 48 h contrôles et les 24 et 48 h stimulées au TGF- β_1 .



: Chaque puit représente un échantillon différent

Figure 37 : Étude, par zymographie, de l'activité enzymatique de la MMP-2 du DMEM des fibroblastes cardiaques, en fonction du temps de stimulation au TGF- β ₁ (10 ng/mL)

A : Représentation de l'activité enzymatique de la MMP-2 sur le gel, B : Représentation sous forme graphique de la quantification de l'activité enzymatique de la MMP-2



: Chaque puit représente un échantillon différent

Figure 38 : Étude, par zymographie, de l'activité enzymatique de la MMP-2 du DMEM des VSMC, en fonction du temps de stimulation au TGF- β ₁ (10 ng/mL)
A : Représentation de l'activité enzymatique de la MMP-2 sur le gel, B : Représentation sous forme graphique de la quantification de l'activité enzymatique de la MMP-2

CHAPITRE QUATRE : DISCUSSION

CHAPITRE QUATRE : DISCUSSION

Au cours de ce travail, nous avons utilisé des cultures de fibroblastes cardiaques et de VSMC, à trois dimensions. Une culture à trois dimensions, composée principalement de collagène bovin de type I et de cellules, nous permet d'obtenir des résultats plus représentatifs des conditions *in situ*. En effet, selon Elsdale et Bard (1972), Tomasek et Hay (1984), Tranquillo (1999), Grinnell (2000) et Tamariz et Grinnell (2002), les fibroblastes cardiaques, dans une matrice à trois dimensions, ont une forme allongée et bipolaire. Ces caractéristiques, que nous ne retrouvons pas chez les fibroblastes cardiaques cultivés à deux dimensions, correspondent à la morphologie retrouvée *in situ*.

Les cellules, contenues dans des matrices gélifiées depuis 24 h, sont ensuite stimulées au TGF- β_1 . Selon la littérature (Eghbali et *al.*, 1991; Vaughan et *al.*, 2000), le TGF- β_1 a la capacité d'augmenter l'expression des composantes de la MEC (fibronectine et collagène) et de la cellule (actine, vinculine et intégrines), de même que la force contractile des cellules sur la matrice.

Nous avons pour hypothèse que le TGF- β_1 induirait un phénotype contractile chez les deux types cellulaires. En effet, en plus d'augmenter la contraction de la matrice, le TGF- β_1 augmenterait la quantité de collagène, de vinculine, de F-actine, de fibronectine, d' α_8 , d' α_1 et d' $\alpha_8\beta_1$, ainsi que l'interaction entre ces composantes. Finalement, nous pensons que le TGF- β_1 augmenterait l'activité des MMP-2.

Afin de vérifier ces hypothèses nous avons, à partir des matrices, effectué une série d'expériences, soient : test de contraction, immunocytochimie, immunobuvardage, test de radio-liaison et zymographie.

1. Étude des matrices isotoniques

1.1. Test de contraction

Les résultats obtenus lors de l'étude de la contraction des matrices isotoniques correspondent bien à notre hypothèse de départ. En effet, nous démontrons, qu'en fonction du temps de stimulation (0 à 72 h), il y a une diminution du diamètre des matrices isotoniques contenant, soit des fibroblastes cardiaques, soit des VSMC. De plus, nous notons une baisse significative du diamètre des matrices, en fonction de la concentration en TGF- β_1 (1 à 10 ng/mL), chez les fibroblastes cardiaques. Or, ce dernier phénomène est observé chez les VSMC, mais la diminution significative de diamètre s'observe seulement entre les matrices non-stimulées et stimulées au TGF- β_1 . En effet, les diamètres des matrices stimulées avec 1, 3 ou 10 ng/mL sont quasi similaires. Cela tend à démontrer que, chez les VSMC, le niveau optimal de contraction est atteint à de moins grande concentration, comparativement aux fibroblastes cardiaques.

Des études antérieures effectuées par Thieszen et *al.* (1996) et Grinnell et Ho (2002) en sont venues aux mêmes conclusions, soit que le temps (0 à 24 h) et la concentration en TGF- β_1 (0,01 à 1 ng/mL) favorisaient la contraction des matrices chez les deux types cellulaires. Ainsi, nos expériences étant effectuées sur une plus longue période et à de plus fortes concentrations viennent compléter ces résultats.

Or, à notre avis et, à celui de plusieurs auteurs (Eghbali et *al.*, 1991; Vaughan et *al.*, 2000), l'augmentation de la contraction des matrices en fonction du temps et de la stimulation au TGF- β_1 , pourrait s'expliquer par la tendance qu'a le TGF- β_1 à favoriser un phénotype cellulaire contractile. En effet, selon ces auteurs, il y a, suite à une stimulation au TGF- β_1 , une augmentation des éléments contractiles (actine, vinculine, intégrine, collagène et fibronectine) et des interactions entre ces éléments. Ceci engendre une augmentation du potentiel de contractilité et de la force appliquée par la cellule sur la MEC.

2. Études des matrices isométriques

2.1. Étude immunocytochimique

Afin d'étudier l'effet du TGF- β_1 sur les différentes composantes cellulaires et de la MEC, nous avons utilisé des matrices isométriques. L'utilisation de ces dernières nous a permis de mieux visualiser la réorganisation des composantes de la MEC (fibronectine et collagène) suite à la stimulation au TGF- β_1 . Cette réorganisation, offrant une résistance face à la tension cellulaire, n'est pas observée dans les matrices isotoniques (Grinnell, 2003).

L'étude de l'interaction entre la F-actine et la fibronectine révèle, chez les deux types cellulaires, que la stimulation au TGF- β_1 semble augmenter l'organisation de la fibronectine. Ceci concorde bien avec notre hypothèse et les résultats obtenus par Ignotz et Massagué (1986) et Chen et *al.* (2000). En effet, leurs recherches ont démontré que le TGF- β_1 augmentait le taux de fibronectine chez les fibroblastes d'embryons de poulet (Ignotz et Massagué, 1986) et les fibroblastes cardiaques (Chen et *al.*, 2000). Cependant, le mécanisme par lequel le TGF- β_1 agit pour augmenter la fibronectine n'est pas encore défini (Vaughan et *al.*, 2000). Or, nous pouvons supposer que le patron de signalisation SMAD pourrait être un des mécanismes. En effet, ce patron de signalisation, activé par la liaison du TGF- β_1 à son récepteur, va phosphoryler R-Smads, qui à son tour va se lier à Co-Smad (Moustakas et *al.*, 2001). Ainsi, ce processus pourrait mener à l'augmentation de l'expression de l'ARNm de la fibronectine, tel qu'observée par Hamaguchi et *al.* (1995). Aussi, l'étude de l'interaction entre la F-actine et la fibronectine démontre que, chez les fibroblastes cardiaques et les VSMC, le TGF- β_1 tend à augmenter l'interaction entre les deux composantes. Ce qui nous porte à croire que les intégrines, servant d'intermédiaire dans la liaison entre la F-actine et la fibronectine, sont surexprimées par le TGF- β_1 . De plus, nous constatons que l'expression de la F-actine ne semble pas être affectée par la stimulation au TGF- β_1 et ce, chez les deux types cellulaires. Cette constatation ne concorde ni avec ce que nous pensions et ni avec les études d'Eghbali et *al.* (1991) et Thibault et *al.* (2001). En effet, ces derniers avaient démontré, par microscopie à fluorescence, une augmentation de la F-actine suite à une stimulation au TGF- β_1 chez les fibroblastes cardiaques. Cependant, d'autres auteurs (Vaughan et *al.*, 2000) ont démontré que le TGF- β_1 augmentait non pas la F-actine, mais le SM- α -actine chez les fibroblastes cardiaques. Or,

étant donné que nous n'avons pas étudié cette composante, il serait intéressant de vérifier, avec nos matrices isométriques, l'expression de la SM- α -actine suite à la stimulation au TGF- β_1 . Par le fait même, nous pourrions vérifier si les fibroblastes cardiaques sont transformés en myofibroblastes, suite à la stimulation au TGF- β_1 , étant donné que l'augmentation de la SM- α -actine est le marqueur principal de cette transformation.

Aussi, l'étude immunocytochimique nous révèle que la fibronectine, constituée d'un site de liaison pour le collagène, semble augmenter son interaction fibronectine-collagène bovin en fonction de la stimulation au TGF- β_1 chez les deux types cellulaires. Ceci nous semble juste, étant donné l'augmentation de l'organisation de la fibronectine. Toutefois, chez les deux types cellulaires, le TGF- β_1 ne semble pas avoir d'effet sur la synthèse de collagène et, par le fait même, sur l'interaction fibronectine-collagène, ce qui appuie ni notre hypothèse ni la littérature. En effet, Nabel et *al.* (1993) a démontré par immunohistochimie une augmentation de la synthèse de collagène dans les artères de porc, suite à une stimulation au TGF- β_1 . De plus, Petrov et *al.* (2002) a démontré, par la méthode Peterkofsky (estimation de la production totale de collagène par la digestion à la collagénase), une hausse de la production de collagène, chez les fibroblastes cardiaques, suite à une stimulation au TGF- β_1 . Pour expliquer ce phénomène, Vaheri et *al.* (1985) ont suggéré que la hausse de production de fibronectine, suite à la stimulation au TGF- β_1 , peut être précurseur de la hausse de déposition de collagène. Alors, comment se fait-il que nous ne détectons pas d'augmentation de synthèse de collagène dans notre étude immunocytochimique ? Tout d'abord, il faut noter que l'immunocytochimie est une étude qualitative. Cette dernière ne nous permet pas d'émettre des conclusions solides, en ce qui a trait l'effet du TGF- β_1 sur les diverses composantes, dont le collagène. Malgré le fait que nous puissions observer les différentes interactions, il aurait été plus concluant de quantifier ces images via le programme LSM 510 (Carl Zeiss, Thornwood, NY). Un autre point important est l'échantillonnage. En effet, de toutes les cellules qui ont été observées, seulement quelques-unes ont été sélectionnées. Les images conservées n'étaient peut-être pas, dans ce cas-ci, représentatives de l'effet du TGF- β_1 sur la synthèse de collagène des cellules de la matrice, ce qui a engendré des résultats n'appuyant pas ceux cités dans la littérature.

Une autre étude immunocytochimique nous permet d'observer que le TGF- β_1 semble augmenter l'expression de l' α_8 , une sous-unité liant la fibronectine, chez les fibroblastes cardiaques et les VSMC. Ceci appuie notre hypothèse et les études de Thibault et *al.* (2001) qui ont démontré une augmentation (50 %) de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$, par une méthode utilisant ^{125}I échistatine. Sur ce, nous pouvons supposer que le TGF- β_1 agit au niveau transcriptionnel, afin d'augmenter l'ARNm des sous-unités des intégrines, tel qui a été proposé par Heino (1989). Or, on constate que cette hausse se produit, dans certains cas, assez tardivement, soit 48 h après le début des stimulations. Il en résulte donc une augmentation des interactions α_8 -fibronectine et α_8 -vinculine, même si cette dernière composante ne semble pas être affectée par la présence du TGF- β_1 . Cette constatation ne correspond pas à notre hypothèse de départ et n'est pas appuyée par Vaughan et *al.* (2000). En effet, ces derniers ont constaté, par microscopie confocale, une augmentation de l'expression de la vinculine suite à la stimulation des fibroblastes cardiaques au TGF- β_1 . Encore une fois, la teneur qualitative de l'étude immunocytochimique, ainsi que l'échantillonnage, pouvant ne pas être représentatif, peut expliquer la divergence entre nos résultats et la littérature.

Aussi, une analyse de l'interaction α_1 -fibronectine a été effectuée. Il en découle que, chez les fibroblastes cardiaques et les VSMC, il semble y avoir très peu d'interaction entre l' α_1 et la fibronectine et ce, avec ou sans stimulation au TGF- β_1 . Or, à notre avis, ceci nous semble juste étant donné que l' α_1 est un récepteur de collagène et de la laminine. De plus, nous notons chez les deux types de cellules, que la stimulation au TGF- β_1 ne semble pas affecter l'expression de l' α_1 . Cette observation n'appuie ni notre hypothèse ni les études de Santala et *al.* (1991) qui ont démontré une augmentation de l' α_1 suite à une stimulation au TGF- β_1 des fibroblastes de la peau. Nous pouvons tenter d'expliquer la divergence des résultats par le fait qu'il n'y ait pas eu d'augmentation de l'expression de collagène en fonction de la stimulation au TGF- β_1 . Ainsi, il n'y a pas eu de signaux extracellulaires évoquant la nécessité de produire davantage de sous-unités α_1 pour lier les nouvelles fibres de collagène. De plus, nous pouvons évoquer le fait qu'au cours de ce travail, il était très difficile de marquer les sous-unités d'intégrines. Plusieurs fixateurs ont été utilisés, afin d'observer clairement ces sous-unités (fixateur à base de formaldéhyde, acide acétique, méthanol, acétone). De ces tests, il nous semblait que le fixateur Zenker était le plus approprié. Cependant, il y a encore place à l'amélioration étant donné que ce fixateur n'est

pas toujours efficace. Peut-être que le fixateur méthanol-acétone (1 :1) utilisé par Kanse et *al.* (2004) serait plus approprié.

Finalement, étant donné que le TGF- β_1 ne semble pas avoir d'effet sur le niveau d'expression de l' α_1 et de la vinculine, il en résulte qu'il en est de même pour l'interaction α_1 -vinculine des fibroblastes cardiaques et des VSMC.

2.2. Étude de l'activité des MMP-2

Au cours de l'étude immunocytochimique, nous avons constaté, surtout chez les fibroblastes cardiaques, qu'au-delà de 48 h, il pouvait avoir une baisse de la fibronectine, et par le fait même, de son interaction avec les autres composantes. Sur ce, nous avons deux hypothèses, soient : une augmentation de l'activité des MMP ou une perte de viabilité de la cellule due à un relâchement de tension de la matrice. Pour vérifier ceci, nous avons analysé l'activité enzymatique de la MMP-2, une gélatinase ayant pour substrat la fibronectine, la gélatine, la laminine, le collagène, la tenascine-C et la vitronectine (Creemers et *al.*, 2001). De cette analyse, il en résulte que le TGF- β_1 n'affecte pas de manière significative l'activité des MMP-2 et ce, chez les deux types cellulaires. Ce résultat n'appuie pas notre hypothèse et la littérature. En effet, d'après Overall et *al.* (1991) et Mauviel (1993) le TGF- β_1 a pour effet d'augmenter l'activité de la MMP-2 par stimulation transcriptionnelle. Le fait qu'il y ait divergence, entre la théorie et les résultats obtenus, pourrait s'expliquer par le fait que nous n'avons pas laissé les échantillons digérer le gel assez longtemps dans le tampon substrat (18 h). Ainsi, cela a pu avoir pour effet que les échantillons stimulés au TGF- β_1 n'avaient pas atteint leur niveau d'activité optimale, réduisant donc l'écart entre les échantillons non-stimulés et stimulés au TGF- β_1 . Ce résultat n'explique donc pas la baisse de fibronectine chez les fibroblastes cardiaques. Sur ce, nous sommes portés à croire, qu'au-delà de 48 h, il y a une perte de viabilité des cellules dans quelques-unes de nos expériences. En effet, il a été démontré par Grinnell et *al.* (1999) qu'un relâchement de tension de la matrice peut contribuer à la mort cellulaire d'environ 15 % des fibroblastes de la peau et ce, après 3 jours en culture. Ainsi, cette mort cellulaire a pu contribuer à fausser d'autres résultats n'appuyant pas la littérature.

2.3. Étude de la sous-unité α_8 et α_1 par immunobuvardage

Étant donné que les résultats immunocytochimiques n'étaient pas très révélateurs, nous avons voulu pousser davantage notre étude, par immunobuvardage, afin de quantifier l'effet du TGF- β_1 sur les sous-unités α_8 et α_1 .

Nous constatons qu'il y a, chez les fibroblastes cardiaques, une augmentation significative de l'expression de l' α_8 , comparativement aux contrôles, après 24 h de stimulation au TGF- β_1 . De plus, chez les mêmes cellules, nous détectons une augmentation de l' α_8 , sans toutefois être significative, 48 h après le début des stimulations. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait qu'en fonction du temps, les cellules développent peut-être plus de sous-unités, ce qui a pour effet de diminuer l'écart entre les cellules non-stimulées et stimulées au TGF- β_1 . Pour ce qui est des VSMC, une augmentation significative de l' α_8 est observée après 24 et 48 h de stimulation au TGF- β_1 .

Ces résultats se différencient de ceux obtenus en immunocytochimie. En effet, les études immunocytochimiques montraient que le TGF- β_1 semblait affecter l'expression de l' α_8 , dans certains cas, seulement après 48 h de stimulation. De ce fait, nous croyons que les résultats obtenus par immunobuvardage sont plus justes à cause de leur teneur quantitative.

Toujours par immunobuvardage, nous constatons que le TGF- β_1 , chez les deux types cellulaires, n'affectent pas significativement l'expression de l' α_1 et ce après 24 et 48 h de stimulation. Sur ce, nous pouvons penser que, tout comme nous l'avons observé en immunocytochimie, il n'y a pas d'augmentation de collagène suite à la stimulation au TGF- β_1 . Ceci fait en sorte qu'il n'y a pas de signaux extracellulaires évoquant la nécessité de produire davantage de sous-unités α_1 . De plus, nous notons qu'il y a une baisse significative de l'expression de la sous-unité α_1 entre les fibroblastes cardiaques non-stimulés à 24 et 48 h. Sur ce, nous pouvons penser qu'il y a une baisse de cette sous-unité suite à une diminution de viabilité des cellules après 48 h ou par le fait qu'il n'y avait pas la même quantité de protéines dans les échantillons. Afin de rendre les résultats beaucoup plus concluants il aurait été avantageux d'utiliser des contrôles de protéines (GAPDH ou bêta-actine).

2.4. Étude de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ par test de radio-liaison

Dans la grande famille des intégrines, seule une intégrine est composée de la sous-unité α_8 , soit l' $\alpha_8\beta_1$. Afin d'étudier l'effet du TGF- β_1 sur ce récepteur, nous avons fait un test de radio-liaison avec ^{125}I échistatine. Ce dernier, consiste à la liaison d'une désintégrine avec une intégrine de type RGD.

Le test nous démontre, chez les fibroblastes cardiaques et les VSMC, une augmentation significative de l'expression de l'intégrine $\alpha_8\beta_1$ seulement après 48 h de stimulation au TGF- β_1 . Ce résultat concorde avec nos données immunocytochimiques, mais n'appuie pas nos tests effectués par immunobuvardage. En effet, l'immunobuvardage nous avait démontré que la stimulation au TGF- β_1 avait pour conséquence d'hausser l'expression de l' α_8 à 24 h, chez les fibroblastes cardiaques, et à 24 et 48 h, chez les VSMC.

Il est donc difficile d'émettre une conclusion. Cependant, nous pouvons affirmer qu'il y a, chez les fibroblastes cardiaques et les VSMC, une augmentation de la sous-unité α_8 et, par le fait même, de l' $\alpha_8\beta_1$ suite à une stimulation au TGF- β_1 dans la matrice à trois dimensions. Ceci concorde avec les études de Thibault et *al.* (2001), qui avaient démontré, par un test de radio-liaison avec ^{125}I échistatine, une hausse de 50 % de l'expression de l' $\alpha_8\beta_1$ chez les fibroblastes cardiaques dans un milieu à deux dimensions. Toutefois, nous ne pouvons affirmer à partir de quel moment l'effet de ce facteur de croissance est détectable.

3. Le TGF- β_1 sur les fibroblastes cardiaques et les VSMC de la MEC à trois dimensions

Au cours de nos expériences, nous avons remarqué, qu'en général, les fibroblastes cardiaques et les VSMC semblaient réagir de la même façon face au TGF- β_1 . Cependant, comparativement aux fibroblastes cardiaques, nous avons noté que les VSMC semblaient avoir besoin d'une moins forte concentration de TGF- β_1 , afin d'atteindre la contraction optimale de la matrice. De plus, par l'étude immunocytochimique et l'immunobuvardage de l' α_8 , nous avons observé que le TGF- β_1 affecte les VSMC beaucoup plus longtemps, comparativement aux fibroblastes cardiaques. Aussi, nous avons noté, chez les fibroblastes

cardiaques, qu'il pouvait y avoir une baisse de fibronectine à des temps supérieurs à 48 h. Ce phénomène, qui n'est pas observé chez les VSMC, est selon nous dû à une perte de viabilité cellulaire.

4. Le TGF- β_1 dans l'organisme

Par l'utilisation des matrices à trois dimensions, nous constatons que le TGF- β_1 peut avoir des conséquences sévères dans l'organisme. En effet, l'augmentation du taux de fibronectine, d'intégrines et le fait que les MMP, dont les MMP-2, ne soient pas activés, peuvent engendrer la fibrose (Frohlich, 2001). La fibrose, rendant le myocarde plus rigide, les vaisseaux plus étroits et diminuant la contractilité des artères (Ju et Dixon, 1996; Schwartzkopff, 2000), peut mener à l'hypertension, l'infarctus du myocarde et l'hypertrophie cardiaque et vasculaire (Ju et Dixon, 1996; Frohlich, 2001).

5. Perspectives

Avec les matrices de collagène à trois dimensions, il serait avantageux d'approfondir l'étude immunocytochimique. En effet, la quantification des composantes, par le programme LSM 510, nous donnerait une vision encore plus juste de l'effet du TGF- β_1 sur les matrices de collagène à trois dimensions. De plus, il pourrait être intéressant, d'effectuer, en parallèle, cette quantification par RT-PCR.

Aussi, la matrice de collagène à trois dimensions, étant un modèle efficace, pourrait être utilisé, afin de tester l'effet du TGF- β_1 et d'autres facteurs (Ex : l'angiotensine). L'étude de ces derniers pourrait être effectuée sur différentes composantes (Ex : SM- α -actine) et d'autres types cellulaires (Ex : cellules mésangiales).

Finalement, il serait avantageux de travailler avec d'autres types de matrices à trois dimensions. En effet, nous pourrions tester l'effet du TGF- β_1 (ou d'autres facteurs) sur des matrices de fibrine (Ye et *al.*, 2000) ou sur des matrices contenant non seulement du

collagène, mais des glycosaminoglycanes, de la fibronectine, de la vitronectine, de l'élastine et de la laminine. Ainsi, ces matrices correspondraient davantage à la MEC et, par le fait même, les résultats obtenus seraient plus représentatifs des conditions de la matrice des tissus.

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons voulu étudier les effets du TGF- β_1 sur l'interaction des fibroblastes cardiaques et des VSMC avec une matrice de collagène à trois dimensions. Cette dernière nous permet d'avoir des résultats plus représentatifs des conditions *in situ*.

Par différentes techniques nous avons pu démontrer, chez les deux types cellulaires, que le TGF- β_1 semblait favoriser la contraction des matrices et augmenter l'expression de la fibronectine, l' α_8 , l' $\alpha_8\beta_1$ et les interactions suivantes : filaments d'actine-fibronectine, fibronectine-collagène bovin, α_8 -fibronectine, α_8 -vinculine. Toutefois, le TGF- β_1 ne semble pas affecter, chez les deux types cellulaires, l'expression de la F-actine, la vinculine, le collagène synthétisé par les cellules, l' α_1 , l'activité de la MMP-2 et les interactions suivantes : fibronectine-collagène (synthétisé par les cellules), α_1 -fibronectine et α_1 -vinculine.

Or, étant donné que la plupart de nos résultats étaient qualitatifs, il serait, en perspective, avantageux de quantifier les images obtenues en immunocytochimie. Nous pourrions aussi quantifier les différentes composantes par RT-PCR. De plus, par ce modèle, nous pourrions tester les effets d'autres facteurs, tel que l'Ang II, sur différents types cellulaires (Ex : fibroblastes cardiaques, VSMC, cellules mésangiales etc.). Finalement, il serait intéressant d'expérimenter d'autres modèles de matrice à trois dimensions (Ex : matrice à base de fibrine). Ceux-ci nous permettraient peut-être d'obtenir des résultats plus représentatifs des conditions dans la matrice des tissus.

RÉFÉRENCES

- Abercrombie, M. Cunn, G.A. 1975. Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp. Cell. Res.* 92: 57-62.
- Akiyama SK, Yamada SS, Yamada KM, LaFlamme SE. 1994. Transmembrane signal transduction by integrin cytoplasmic domains expressed in single-subunit chimeras. *J Biol Chem.*269(23):15961-4.
- Albelda, S.M. Buck, C.A. 1990. Integrins and other cell adhesion molecules *FASEB J.* 4: 2868-80.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2002. Cells in their social context in *Molecular biology of the cell.* New-York. Garland Science. pp. 1063-1126.
- Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP. 2002. Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr Opin Cell Biol.*14(5):641-51.
- Arrick BA, Lopez AR, Elfman F, Ebner R, Damsky CH, Derynck R. 1992. Altered metabolic and adhesive properties and increased tumorigenesis associated with increased expression of transforming growth factor beta 1. *J Cell Biol.* 118(3):715-26.
- Bajt ML, Goodman T, McGuire SL. 1995. Beta 2 (CD18) mutations abolish ligand recognition by I domain integrins LFA-1 (alpha L beta 2, CD11a/CD18) and MAC-1 (alpha M beta 2, CD11b/CD18). *J Biol Chem.* 270(1):94-8.
- Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. 1998. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest.*101(6):1478-87.
- Beglova N, Blacklow SC, Takagi J, Springer TA. 2002. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nat Struct.* 9(4):282-7.
- Belkin, V.M., Belkin, A.M., Koteliansky, V.E. 1990. Human smooth muscle VLA-1 integrin: purification, substrate specificity, localization in aorta, and expression during development. *J. Cell Biol.* 111: 2159-70.
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. 2000. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med.* 342(18):1350-8.
- Booz GW, Baker KM. 1995. Molecular signalling mechanisms controlling growth and function of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 30(4):537-43.

- Border WA, Noble NA. 1994. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med.* 331(19):1286-92.
- Borg, T.K., Terracio, L. 1990. Interaction of the extracellular matrix with cardiac myocytes during development and disease. Dans Stolte, H., Kinne, R.K.H., Bach, P.H. *Cardiac myocyte-connective tissue interaction in health and disease.* New-York, S. Karger, AG, pp. 113-29.
- Borg, T.K., Burgess, M.L. 1993. Holding it all together: organization and function(s) of the extracellular matrix in heart. *Heart Failure.* 8: 230-8.
- Borowsky ML, Hynes RO. 1998. Layilin, a novel talin-binding transmembrane protein homologous with C-type lectins, is localized in membrane ruffles. *J Cell Biol.*143(2):429-42.
- Bouzeghrane F, Thibault G. 2002. Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovasc Res.* 53(2):304-12.
- Brakebusch C, Fässler R. 2003. The integrin-actin connection, an eternal love affair. *EMBO J.*22(10):2324-33.
- Broberg, A., Heino, J. 1996. Integrin $\alpha_2\beta_1$ -dependent contraction of floating collagen gels and induction of collagenase are inhibited by tyrosine kinase inhibitors. *Experimental cell research.* 228: 29-35.
- Brown NH, Gregory SL, Rickoll WL, Fessler LI, Prout M, White RA, Fristrom JW. 2002. Talin is essential for integrin function in *Drosophila*. *Dev Cell.*3(4):569-79.
- Buck, C.A., Horwitz, A.F. 1987. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3: 179-205.
- Bundy RE, Marczin N, Birks EF, Chester AH, Yacoub MH. 2000. Transplant atherosclerosis: role of phenotypic modulation of vascular smooth muscle by nitric oxide. *Gen Pharmacol.* 34(2): 73-84.
- Burgess ML, Carver WE, Terracio L, Wilson SP, Wilson MA, Borg TK. 1994. Integrin-mediated collagen gel contraction by cardiac fibroblasts. Effects of angiotensin II. *Circ Res.* 74(2):291-8.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolis, B., Turner, C. 1988. Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 487-525.
- Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. 1995. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion Kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol.*15(2):954-63.

- Calalb MB, Zhang X, Polte TR, Hanks SK. 1996. Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src. *Biochem Biophys Res Commun.* 21;228(3):662-8.
- Calderwood DA. 2004. Integrin activation. *J Cell Sci.* 117(Pt 5):657-66.
- Calvete JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriguez J. 1991. Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the beta-subunits of the integrin family. *Biochem J.* 274 (Pt 1):63-71.
- Campbell NA. 1995. Circulation chez les Vertébrés. Dans *Biologie.* Canada, ERPI, pp. 820-830.
- Casscells W, Kimura H, Sanchez JA, Yu ZX, Ferrans VJ. 1990. Immunohistochemical study of fibronectin in experimental myocardial infarction. *Am J Pathol.* 137(4):801-10.
- Chen, W.T., Hasegawa, T., Hasegawa, C., Weinstock, C., Yamada, K.M. 1985. Development of cell surface linkage complexes in cultivated fibroblasts. *J. Cell Biol.* 100: 1103-14.
- Chen HC, Appeddu PA, Parsons JT, Hildebrand JD, Schaller MD, Guan JL. 1995. Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin. *J Biol Chem.*270(28):16995-9.
- Chen Y, Garrison S, Weis JJ, Weis JH. 1998. Identification of pactolus, an integrin beta subunit-like cell-surface protein preferentially expressed by cells of the bone marrow. *J Biol Chem.* 273(15):8711-8.
- Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH. 2000. CTGF expression is induced by TGF- beta in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis. *J Mol Cell Cardiol.* 32(10):1805-19.
- Chu ML, Mann K, Deutzmann R, Pribula-Conway D, Hsu-Chen CC, Bernard MP, Timpl R. 1987. Characterization of three constituent chains of collagen type VI by peptide sequences and cDNA clones. *Eur J Biochem.*168(2):309-17.
- Chu TM, Kawinski E. 1998. Plasmin, subtilisin-like endoproteases, tissue plasminogen activator, and urokinase plasminogen activator are involved in activation of latent TGF-beta 1 in human seminal plasma. *Biochem Biophys Res Commun.* 253(1):128-34.
- Clark, E.A., Brugge, J.S. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* 268: 233-9.
- Clover, J., Dodds, R.A., Gowen, M. 1992. Integrin subunit expression by human osteoblasts and osteoclasts *in situ* and in culture. *J. Cell. Sci.* 103: 267-71.

- Clyman RI, Turner DC, Kramer RH. 1990. An alpha 1/beta 1-like integrin receptor on rat aortic smooth muscle cells mediates adhesion to laminin and collagen types I and IV. *Arteriosclerosis*.10(3):402-9.
- Clyman RI, Mauray F, Kramer RH. 1992. Beta 1 and beta 3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exp Cell Res*.200(2):272-84.
- Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. 2001. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*. 89(3):201-10.
- Curley GP, Blum H, Humphries MJ. 1999. Integrin antagonists. *Cell Mol Life Sci*.56(5-6):427-41.
- Damsky, C.M., Knudsen, K.A., Bradley, D., Buck, C.A., Horwitz, A.F. 1985. Distribution of the CSAT cell-matrix antigen on myogenic and fibroblastic cells in culture. *J. Cell Biol*. 100: 1528-39.
- Dawsky, C.H., Werb, Z. 1992. Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr Opin Cell Biol* 4(5): 722-81.
- Defilippi P, Olivo C, Venturino M, Dolce L, Silengo L, Tarone G. 1999. Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc Res Tech*. 47(1):67-78.
- Derynck R. 1994. TGF-beta-receptor-mediated signaling. *Trends Biochem Sci*.19(12):548-53.
- DeSimone DW, Hynes RO. 1988. *Xenopus laevis* integrins. Structural conservation and evolutionary divergence of integrin beta subunits. *J Biol Chem*. 263(11): 5333-40.
- Dickinson CD, Veerapandian B, Dai XP, Hamlin RC, Xuong NH, Ruoslahti E, Ely KR. 1994. Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin. *J Mol Biol*. 236(4):1079-92.
- Di Paolo G, Pellegrini L, Letinic K, Cestra G, Zoncu R, Voronov S, Chang S, Guo J, Wenk MR, De Camilli P. 2002. Recruitment and regulation of phosphatidylinositol phosphate kinase type 1 gamma by the FERM domain of talin *Nature*. 420(6911):85-9.
- Downey JM, Heuch G. 2001. Sequence of Cardiac Activation and Ventricular Mechanics. In Sperelakis N, Kurachi Y, Terzic A, Cohen MV. *Heart Physiology and Pathophysiology* 4th edition. Florida, Academic Press, p.3.
- D'Souza, S.E., Ginsberg, M.H., Lam, S. C-T., Plow, E. 1988. Chemical cross-linking of arginyl-glycyl-aspartic acid peptides on adhesion receptors on platelets. *Science* 242: 91-93.

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

Eghbali, M. Czaja, M.J., Zeydel, M., Weiner, F.R., Zern, M.A., Seifter, S. et Blumenfeld, O.O. 1988. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *Journal of Molecular Cell Cardiology.* 20: 267-76.

Eghbali, M., Blumenfeld, O.O., Seifter, S., Buttrick, P.M., Leinwand, L.A., Robinson, T.F., Zern, M.A. et Giambone, M.A. 1989. Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by *in situ* hybridization. *Journal of Molecular Cell Cardiology.* 12: 103-13.

Eghbali, M., Tomer, R., Woods, C. et Bhambi, B. 1991. Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: Specific effect of transforming growth factor β . *PNAS.* 88: 795-99.

Elsdale T, Bard J. 1972. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol.* 54(3):626-37.

Emsley J, Knight CG, Farndale RW, Barnes MJ, Liddington RC. 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin $\alpha 2\beta 1$. *Cell.* 101(1):47-56.

Fareh J, Touyz RM, Schiffrin EL, Thibault G. 1997. Cardiac type-1 angiotensin II receptor status in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension in rats. *Hypertension* (5):1253-9.

Farrell MJ, Kirby ML. 2001. Cell biology of cardiac development. *Int Rev Cytol.* 202: 99-158.

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

Frohlich ED. 2001. Fibrosis and ischemia: the real risks in hypertensive heart disease. *Am J Hypertens.* 14(6 Pt 2):194S-199S.

Gailit, J., Ruoslahti, E. 1988. Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *Journal of Biology and Chemistry.* 263: 12927-33.

Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., Yamada, K.M. 2001. Transmembrane extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nature.* 2: 793-805.

Giancotti, F.G. 1997. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Current Opinion of Cell Biology.* 9: 691-700.

Giancotti FG, Ruoslahti E. 1999. Integrin signaling. *Science.* 285(5430): 1028-32.

- Gilmore AP, Jackson P, Waites GT, Critchley DR. 1992. Further characterization of the talin-binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Sci.* 103 (Pt3):719- 31.
- Graf K, Neuss M, Stawowy P, Hsueh WA, Fleck E, Law RE. 2000. Angiotensin II and alpha(v)beta(3) integrin expression in rat neonatal cardiac fibroblasts. *Hypertension.* 35(4):978-84.
- Grinnell F, Lamke CR. 1984. Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts. 1984. *J Cell Sci.* 66:51-63.
- Grinnell F. 1994. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol.* 124(4):401-4.
- Grinnell F, Zhu M, Carlson MA, Abrams JM. 1999. Release of mechanical tension triggers apoptosis of human fibroblasts in a model of regressing granulation tissue. *Exp Cell Res.* 248(2):608-19.
- Grinnell F. 2000. Fibroblast-collagen-matrix contraction: growth-factor signalling and mechanical loading. *Trends Cell Biol.* 10(9):362-5.
- Grinnell F, Ho CH. 2002. Transforming growth factor beta stimulates fibroblast collagen matrix contraction by different mechanisms in mechanically loaded and unloaded matrices. *Exp Cell Res.* 273(2):248-55.
- Grinnell F. 2003. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol.* 13(5):264-9
- Guan JL, Hynes RO. 1990. Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell.* 60(1):53-61.
- Haisong J, Dixon IMC. 1996. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Canadian Journal of Cardiology.* 12 (12):1259-1267.
- Hamaguchi A, Kim S, Ohta K, Yagi K, Yukimura T, Miura K, Fukuda T, Iwao H. 1995. Transforming growth factor-beta 1 expression and phenotypic modulation in the kidney of hypertensive rats. *Hypertension.* 26(1):199-207.
- Harris AK, Stopak D, Wild P. 1981. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature.* 290(5803):249-51.
- Heino J, Ignatz RA, Hemler ME, Crouse C, Massague J. 1989. Regulation of cell adhesion receptors by transforming growth factor-beta. Concomitant regulation of integrins that share a common beta 1 subunit. *J Biol Chem.* 264(1):380-8.
- Hemler, M.E. 1990. VLA proteins in the integrin family : structures, functions, and their role on leukocytes. *Annual Review of Immunology.* 8: 365-400.

Hemmings L, Rees DJ, Ohanian V, Bolton SJ, Gilmore AP, Patel B, Priddle H, Trevithick JE, Hynes RO, Critchley DR. 1996. Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J Cell Sci.* 109 (Pt 11):2715-26.

Hillis GS, Mlynski RA, Simpson JG, MacLeod AM. 1998. The expression of beta integrins in human coronary artery. *Basic Res Cardiol.* 93(4):295-302.

Hirst, A.E., Gore, I., 1983. The etiology and pathology of aortic dissection. Dans Doroghazi, R.M., Slater, E.E., *Aortic Dissection*. U.S.A., McGraw-Hill, Inc., pp. 13-53.

Hornberger LK, Singhroy S, Cavalle-Garrido T, Tsang W, Keeley F, Rabinovitch M. 2000. Synthesis of extracellular matrix and adhesion through beta(1) integrins are critical for fetal ventricular myocyte proliferation. *Circ Res.* 87(6): 508-15.

Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC, Burridge K. 1986. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin--a transmembrane linkage. *Nature.* 320 (6062):531-3.

Horwitz, A.F. 1997. Integrins and Health. *Scientific American*. May: 68-75.

Hsueh WA, Law RE, Do YS. 1998. Integrins, adhesion, and cardiac remodeling. *Hypertension.* 31(1 Pt 2): 176-80.

Humphries MJ. 2000. Integrin structure. *Biochem Soc Trans.* 28(4): 311-39.

Humphries MJ, McEwan PA, Barton SJ, Buckley PA, Bella J, Paul Mould A. 2003. Integrin structure: heady advances in ligand binding, but activation still makes the knees wobble. *Trends Biochem Sci.*(6):313-20.

Hüttelmaier S, Bubeck P, Rudiger M, Jockusch BM. 1997. Characterization of two F-actin-binding and oligomerization sites in the cell-contact protein vinculin. *Eur J Biochem.* 247(3):1136-42.

Hynes, R.O. 1990. *Fibronectins*. New-York, Springer-Verlag.

Hynes, R.O. 1992. Integrins: versality, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell.* 69: 11-25.

Hynes RO. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 110(6):673-87.

Ignatz RA, Massague J. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 261(9):4337-45.

Irie A, Kamata T, Puzon-McLaughlin W, Takada Y. 1995. Critical amino acid residues for ligand binding are clustered in a predicted beta-turn of the third N-terminal repeat in the integrin alpha 4 and alpha 5 subunits. *EMBO J.* 14(22):5550-6.

- Izzard, C.S., Lochner, L.R. 1976. Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J. Cell. Sci.* 21: 129-59.
- Johnson RP, Niggli V, Durrer P, Craig SW. 1998. A conserved motif in the tail domain of vinculin mediates association with and insertion into acidic phospholipid bilayers. *Biochemistry.* 37(28):10211-22.
- Johnson JL, van Eys GJ, Angelini GD, George SJ. 2001. Injury induces dedifferentiation of smooth muscle cells and increased matrix-degrading metalloproteinase activity in human saphenous vein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21(7): 1146-51.
- Jones JI, Prevette T, Gockerman A, Clemmons DR. 1996. Ligand occupancy of the alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(6):2482-7.
- Jones P, Jackson P, Price GJ, Patel B, Ohanion V, Lear AL, Critchley DR. 1989. Identification of a talin binding site in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Biol.* 109(6 Pt 1):2917-27.
- Ju H, Dixon IM. 1996. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol.*12(12):1259-67.
- Juliano, R.L., Haskill, S. 1993. Signal transduction from the extracellular matrix. *Journal of Cell Biology.* 120: 577-85.
- Kamata T, Puzon W, Takada Y. 1995. Identification of putative ligand-binding sites of the integrin alpha 4 beta 1 (VLA-4, CD49d/CD29). *Biochem J.* 305 (Pt 3):945-51. Erratum in: *Biochem J* 1996 Aug 1;317(Pt 3):959.
- Kanse SM, Chavakis T, Al-Fakhri N, Hersemeyer K, Monard D, Preissner KT. 2004. Reciprocal regulation of urokinase receptor (CD87)-mediated cell adhesion by plasminogen activator inhibitor-1 and protease nexin-1. *J Cell Sci.* 117(Pt 3):477-85.
- Kawano H, Cody RJ, Graf K, Goetze S, Kawano Y, Schnee J, Law RE, Hsueh WA. 2000. Angiotensin II enhances integrin and alpha-actinin expression in adult rat cardiac fibroblasts. *Hypertension.* 35(1 Pt 2):273-9.
- Kim S, Ohta K, Hamaguchi A, Yukimura T, Miura K, Iwao H. 1995. Angiotensin II induces cardiac phenotypic modulation and remodeling in vivo in rats. *Hypertension.* 25(6):1252-9.
- Kirchhofer, D., Gailit, J., Ruoslahti, E., Grzesiak, J., Pierschbacher, M.D. 1990. Cation-dependent changes in the binding specificity of the platelet receptor GPIIb/IIIa. *Journal of Biology and Chemistry.* 265: 18525-30.

Kirchhofer, D., Grzesiak, J., Pierschbacher, M.D. 1991. Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. *Journal of Biology and Chemistry*. 266: 4471-7.

Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G. 1997. The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem*. 272(12):7608-16.

Kroemker M, Rudiger AH, Jockusch BM, Rudiger M. 1994. Intramolecular interactions in vinculin control alpha-actinin binding to the vinculin head. *FEBS Lett*. 355(3):259-62.

Kumar CC. 1998. Signaling by integrin receptors. *Oncogene*. 17(11 Reviews):1365-73.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(259):680-5.

Laflamme SE, Akiyama SK, Yamada KM. 1992. Regulation of fibronectin receptor distribution. *J Cell Biol*. 117(2):437-47.

Lafont A, Durand E, Samuel JL, Besse B, Addad F, Levy BI, Desnos M, Guerot C, Boulanger CM. 1999. Endothelial dysfunction and collagen accumulation: two independent factors for restenosis and constrictive remodeling after experimental angioplasty. *Circulation*. 100(10):1109-15.

Lawrence DA, Pircher R, Jullien P. 1985. Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 133(3):1026-34.

Leahy DJ, Hendrickson WA, Aukhil I, Erickson HP. 1992. Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science*. 258(5084):987-91.

Leahy DJ, Aukhil I, Erickson HP. 1996. A crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell*. 84(1):155-64.

Leahy DJ. 1997. Implications of atomic-resolution structures for cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:363-93.

Lee RT, Berditchevski F, Cheng GC, Hemler ME. 1995. Integrin-mediated collagen matrix reorganization by cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 76(2):209-14.

Lijnen PJ, Petrov VV, Fagard RH. 2000. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1). *Mol Genet Metab*. 71(1-2):418-35.

Lin CQ, Bissell MJ. 1993. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J*. 7(9):737-43.

- Lin, S., Lin, D. 1996. Mapping of actin, vinculin, and integrin binding domains suggests a direct role of tensin in actin-membrane association. *Mol. Biol. Cell.* 7 (suppl): 389a.
- Ling K, Doughman RL, Firestone AJ, Bunce MW, Anderson RA. 2002. Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase targets and regulates focal adhesions. *Nature.*420(6911):89-93.
- Liu, S., Calderwood, D.A., Ginsberg, M.H. 2000. Integrin cytoplasmic domain binding proteins. *J. Cell. Sci.* 113: 3563-71.
- Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira and Darnell. 1997. *Société de cellules: interaction entre cellules et entre cellules matrice. Dans biologie moléculaire de la cellule.* New-York, de Boeck Université, pp1123 à 1200.
- Loftus JC, O'Toole TE, Plow EF, Glass A, Frelinger AL 3rd, Ginsberg MH. 1990. A beta 3 integrin mutation abolishes ligand binding and alters divalent cation-dependent conformation. *Science.*249(4971):915-8.
- Loftus JC, Halloran CE, Ginsberg MH, Feigen LP, Zablocki JA, Smith JW. 1996. The amino-terminal one-third of alpha IIb defines the ligand recognition specificity of integrin alpha IIb beta 3. *J Biol Chem.*Jan 26;271(4):2033-9.
- Loftus, J.C., Liddington, R.C. 1997. New insights into integrin-ligand interaction. *J Clin Invest.* 100 (Suppl 11): S77-81.
- Longhurst CM, Jennings LK. 1998. Integrin-mediated signal transduction. *Cell Mol Life Sci.*54(6):514-26.
- Ludbrook SB, Barry ST, Delves CJ, Horgan CM. 2003. The integrin alphavbeta3 is a receptor for the latency-associated peptides of transforming growth factors beta1 and beta3. *Biochem J.* 369(Pt 2):311-8.
- Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol.* 106(5):1659-65.
- Lyons RM, Gentry LE, Purchio AF, Moses HL.1990. Mechanism of activation of latent recombinant transforming growth factor beta 1 by plasmin. *J Cell Biol.* 110(4):1361-7.
- MacKenna DA, Dolfi F, Vuori K, Ruoslahti E. 1998. Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *J Clin Invest.*101(2):301-10.
- MacKenna D, Summerour SR, Villarreal FJ. 2000. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res.* 46(2):257-63.

- Majesky MW, Lindner V, Twardzik DR, Schwartz SM, Reidy MA. 1991. Production of transforming growth factor beta 1 during repair of arterial injury. *J Clin Invest.* 88(3):904-10.
- Manabe, I., Shindo, T., Nagai, R. 2002. Gene expression in fibroblasts and fibrosis. *Circulation Research.* 91: 1103-13.
- Markwald RR. 1979. The role of extracellular matrix in cardiogenesis. *Tex Rep Biol Med.*39: 249-51.
- Martel V, Racaud-Sultan C, Dupe S, Marie C, Paulhe F, Galmiche A, Block MR, Albiges-Rizo C. 2001. Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *J Biol Chem.*15; 276(24):21217-27.
- Massague J. 1990. Transforming growth factor-alpha. A model for membrane-anchored growth factors. *J Biol Chem.* 265(35):21393-6.
- Massague J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.*1(3):169-78.
- Mauviel A. 1993. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem.* 53(4):288-95.
- Menkel AR, Kroemker M, Bubeck P, Ronsiek M, Nikolai G, Jockusch BM. 1994. Characterization of an F-actin-binding domain in the cytoskeletal protein vinculin. *J Cell Biol.*126(5):1231-40.
- Meredith JE Jr, Winitz S, Lewis JM, Hess S, Ren XD, Renshaw MW, Schwartz MA. 1996. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev.* 17(3): 207-20.
- Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK, Yamada KM. 1995. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol.*131(3): 791-805.
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH. 1991. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.*10(5):1091-101.
- Morse, D.E., 1979. Embryology, Anatomy, and Histology of the Aorta. Dans Lindsay, J., Hurst, J.W., *The Aorta.* New-York, Grune & Stratton, Inc., pp. 15-37.
- Mould AP. 1996. Getting integrins into shape: recent insights into how integrin activity is regulated by conformational changes. *J Cell Sci.*109 (Pt 11):2613-8.
- Mould AP, Burrows L, Humphries MJ. 1998. Identification of amino acid residues that form part of the ligand-binding pocket of integrin alpha5 beta1. *J Biol Chem.* 273(40):25664-72.

Mould AP, Askari JA, Humphries MJ. 2000. Molecular basis of ligand recognition by integrin alpha 5beta 1. I. Specificity of ligand binding is determined by amino acid sequences in the second and third NH2-terminal repeats of the alpha subunit. *J Biol Chem.* 275(27):20324-36.

Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C-H. 2001. Smad regulation in TGF-B signal transduction. *J Cell Sci.*114:4359-4369.

Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, Baron JL, Munger JS, Kawakatsu H, Sheppard D, Broaddus VC, Nishimura SL. 2002. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol.*157(3):493-507.

Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. 1999. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 96(3):319-28.

Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, O'Connell J, Docherty A. 1994. Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann N Y Acad Sci.* 732:31-41.

Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, Yang ZY, San H, Shu HB, Liptay S, Gold L, Gordon D, Derynck R.1993. Direct transfer of transforming growth factor beta 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(22):10759-63.

Nagase H. 1997. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.* 378:151-160.

Nagase H, Woessner JF Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 274(31):21491-4.

Nakajima Y, Miyazono K, Kato M, Takase M, Yamagishi T, Nakamura H. 1997. Extracellular fibrillar structure of latent TGF beta binding protein-1: role in TGF beta-dependent endothelial-mesenchymal transformation during endocardial cushion tissue formation in mouse embryonic heart. *J Cell Biol.*136(1):193-204.

Nunes I, Shapiro RL, Rifkin DB. 1995. Characterization of latent TGF-beta activation by murine peritoneal macrophages. *J Immunol.*155(3):1450-9.

Ogawa E, Saito Y, Harada M, Kamitani S, Kuwahara K, Miyamoto Y, Ishikawa M, Hamanaka I, Kajiyama N, Takahashi N, Nakagawa O, Masuda I, Kishimoto I, Nakao K. 2000. Outside-in signalling of fibronectin stimulates cardiomyocyte hypertrophy in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 32(5): 765-76.

O'Neill S, Robinson A, Deering A, Ryan M, Fitzgerald DJ, Moran N. 2000. The platelet integrin alpha IIb beta 3 has an endogenous thiol isomerase activity. *J Biol Chem.*275(47):36984-90.

- Overall CM, Wrana JL, Sodek J. 1991. Transcriptional and post-transcriptional regulation of 72-kDa gelatinase/type IV collagenase by transforming growth factor-beta 1 in human fibroblasts. Comparisons with collagenase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase gene expression. *J Biol Chem.* 266(21):14064-71.
- Payne RM, Johnson MC, Grant JW, Strauss AW. 1995. Toward a molecular understanding of congenital heart disease. *Circulation.* 91(2): 494-504.
- Pei D, Weiss SJ. 1995. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature.*375(6528):244-7.
- Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. 1993. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem.* 129(2):101-20.
- Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. 1997.*Cytokine Growth Factor Rev* 8(1):21-43.
- Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. 2002. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension.* 39(2):258-63.
- Pham, C.G., Harpf, A.E., Keller, R.S., Vu, H.T., Shai, S.-Y. Loftus, J.C., Ross, R.S. 2000. Striated muscle-specific β_{1D} -integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279: H 2916-26.
- Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P. 1999. Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J.* 13(15):2105-24.
- Pircher R, Jullien P, Lawrence DA. 1986. Beta-transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex. *Biochem Biophys Res Commun.*136(1):30-7.
- Plopper GE, McNamee HP, Dike LE, Bojanowski K, Ingber DE. 1995. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol Biol Cell.*6(10): 1349-65.
- Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. 1999. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 274(19):13586-93.
- Robinson, T.F., Cohen-Gould, L., Factor, S.M. 1983. The skeletal framework of mammalian heart muscle: arrangement of inter- and pericellular connective tissue structures. *Lab. Invest.* 49: 482-7.
- Robinson TF, Factor SM, Sonnenblick EH. 1986. The heart as a suction pump. *Sci Am.*254(6):84-91.

- Rosales C, Juliano RL. 1995. Signal transduction by cell adhesion receptors. *Biochim Biophys Acta*.1242(1): 77-98.
- Ross RS, Borg TK. 2001. Integrins and the myocardium. *Circ Res*.88(11): 1112-9.
- Ross RS. 2002. The extracellular connections: the role of integrins in myocardial remodeling. *J Card Fail*.(6 Suppl): S326-31.
- Rout UK, Saed GM, Diamond MP. 2002.Transforming growth factor-beta1 modulates expression of adhesion and cytoskeletal proteins in human peritoneal fibroblasts. *Fertil Steril*. 78(1):154-61.
- Ruoslahti, E., Perschbacher, M.D. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 238: 491-7.
- Ruoslahti, E. 1991. Integrins. *J. Clin. Invest*. 87: 1-5.
- Ruoslahti E. 1996. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol*.12:697-715.
- Ruoslahti, E. 1997. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annual Review of Cell Development Biology*. 12: 697-715.
- Santala P, Heino J. 1991. Regulation of integrin-type cell adhesion receptors by cytokines. *J Biol Chem*. 266(34):23505-9.
- Sastry, S.K., Burridge, K. 2000. Focal adhesions: A nexus for intracellular signalling and cytoskeletal dynamics. *Exp. Cell. Res*. 261: 25-36.
- Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB. 1990. Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol*. 111(2):757-63.
- Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. 1995. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *J Cell Biol*.130(5):1181-7.
- Schiffer SG, Hemler ME, Lobb RR, Tizard R, Osborn L. 1995. Molecular mapping of functional antibody binding sites of alpha 4 integrin. *J Biol Chem*.270(24):14270-3.
- Schiffrin EL, Poissant L, Cantin M, Thibault G. 1986. Receptors for atrial natriuretic factor in cultured vascular smooth muscle cells. *Life Sci*. 38(9):817-26.
- Schnapp LM, Hatch N, Ramos DM, Klimanskaya IV, Sheppard D, Pytela R.1995. The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. *J Biol Chem*.270(39):23196-202.
- Schorr K. 1999. [Anti-integrins--new platelet function inhibitors for therapy and prevention of acute coronary syndrome] *Wien Klin Wochenschr*. 111(3):90-7.

- Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ Jr, Maki TM, Marsh JD, Colucci WS. 1994. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest.* 94(4):1470-6.
- Tamariz E, Grinnell F. 2002. Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. *Mol Biol Cell.* 13(11):3915-29.
- Thibault, G. 2000. Sodium dodecyl sulfate-stable complexes of echistatin and RGD-dependent integrins: a novel approach to study integrins. *Molecular Pharmacology.* 58: 1137-45.
- Thibault, G., Lacombe, M.-J., Schnapp, L.M., Lacasse, A., Bouzeghrane, F., Lapalme, G. 2001. Upregulation of $\alpha_8\beta_1$ -integrin in cardiac fibroblast by angiotensin II and transforming growth factor- β_1 . *Am J Physiol Cell Physiol.* 281: C1457-67.
- Thompson NL, Bazoberry F, Speir EH, Casscells W, Ferrans VJ, Flanders KC, Kondaiah P, Geiser AG, Sporn MB. 1988. Transforming growth factor beta-1 in acute myocardial infarction in rats. *Growth Factors.* 1(1):91-9.
- Tidswell M, Pachynski R, Wu SW, Qiu SQ, Dunham E, Cochran N, Briskin MJ, Kilshaw PJ, Lazarovits AI, Andrew DP, Butcher EC, Yednock TA, Erle DJ. 1997. Structure-function analysis of the integrin beta 7 subunit: identification of domains involved in adhesion to MAdCAM-1. *J Immunol.* 159(3):1497-505.
- Timpl R. 1996. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* 8(5):618-24.
- Tomasek, J.J., Hay, E.D. 1984. Analysis of the role of microfilaments and microtubules in acquisition of bipolarity and elongation of fibroblasts in hydrated collagen gels. *Journal of cell biology.* 99: 536-49.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. 2002. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(5):349-63.
- Tortora GJ, Grabowski SR. 1999. Le système cardiovasculaire : Le cœur. Dans *Principes d'anatomie et de physiologie.* Québec, CEC, pp.624-659.
- Tranquillo RT. 1999. Self-organization of tissue-equivalents the nature and role of contact guidance. *Biochem Soc Symp.* 65:27-42
- Tuckwell DS, Reid KB, Barnes MJ, Humphries MJ. 1996. The A-domain of integrin alpha 2 binds specifically to a range of collagens but is not a general receptor for the collagenous motif. *Eur J Biochem.* 241(3):732-9.
- Vaheri A, Salonen EM, Vartio T. 1985. Fibronectin in formation and degradation of the pericellular matrix. *Ciba Found Symp.* 114:111-26.
- van der Flier A, Sonnenberg A. 2001. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001 Sep;305(3):285-98.

Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. 2000. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp Cell Res.* 257(1):180-9.

Villarreal FJ, Dillmann WH. 1992. Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol.* 262(6 Pt 2):H1861-6.

Walker CA, Spinale FG. 1999. The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 118 (2): 375-82.

Weber KT, Janicki JS, Pick R, Abrahams C, Shroff SG, Bashey RI, Chen RM. 1987. Collagen in the hypertrophied, pressure-overloaded myocardium. *Circulation.* 75(1 Pt 2):I40-7.

Weber KT. 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 13(7):1637-52.

Weber KT, Brilla CG. 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 83(6):1849-65.

Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. 1994. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol.* 26(3):279-92.

Weber K. 1997. Cardiac interstitium. Dans Poole-Wilson P, Colucci W, Massie B, Chatterje K, Coats A, eds. *Heart Failure*, New York, NY: Churchill Livingstone:13-31.

Williams JA. 1992. Disintegrins: RGD-containing proteins which inhibit cell/matrix interactions (adhesion) and cell/cell interactions (aggregation) via the integrin receptors. *Pathol Biol (Paris)* 40(8):813-21.

Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, Massague J. 1992. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 71(6):1003-14.

Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J. 1994. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature.* 370(6488):341-7.

Xiang D, He J, Yang C, Gong Z, Lai H, Fu R, Yi S, Qiu J. 2002. Dynamic changes in type I collagen, MMP-1 and TIMP-1 after angioplasty. *Chin Med J (Engl).* 115(3):352-4.

Xiong JP, Stehle T, Zhang R, Joachimiak A, Frech M, Goodman SL, Arnaout MA. 2002. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science.* 296(5565):151-5.

- Yamamoto K, Yamamoto M. 1994. Cell adhesion receptors for native and denatured type I collagens and fibronectin in rabbit arterial smooth muscle cells in culture. *Exp Cell Res.*214(1):258-63.
- Yan B, Calderwood DA, Yaspan B, Ginsberg MH. 2001. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem.*276(30):28164-70.
- Ye Q, Zund G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakyama S, Hubbell JA, Turina M. 2000. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg.* 17(5):587-91.
- Yee KO, Rooney MM, Giachelli CM, Lord ST, Schwartz SM. 1998. Role of beta1 and beta3 integrins in human smooth muscle cell adhesion to and contraction of fibrin clots in vitro. *Circ Res.* 83(3):241-51.
- Ylanne J, Chen Y, O'Toole TE, Loftus JC, Takada Y, Ginsberg MH. 1993. Distinct functions of integrin alpha and beta subunit cytoplasmic domains in cell spreading and formation of focal adhesions. *J Cell Biol.* 122(1):223-33.
- Yu Q, Stamenkovic I. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14(2):163-76.
- Zamir, E., Geiger, B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.*114(Pt 20):3583-90.
- Zeydel M, Puglia K, Eghbali M, Fant J, Seifter S, Blumenfeld OO. 1991. Properties of heart fibroblasts of adult rats in culture. *Cell Tissue Res.*265(2):353-9.
- Zhang L, Plow EF. 1999. Amino acid sequences within the alpha subunit of integrin alpha M beta 2 (Mac-1) critical for specific recognition of C3bi. *Biochemistry.* 38(25):8064-71.