

Interactions cellule/matrice et propriétés élastiques des gros troncs artériels

Jean-Marie
Daniel-Lamazière
Patrick Lacolley
Yvonnick Bézie
Pascal Challande
Stéphane Laurent

Les propriétés mécaniques des parois artérielles dépendent des cellules musculaires lisses, et des contenus en collagène et en élastine de la média. L'organisation spatiale de ces différents éléments est en partie réglée par les interactions entre les protéines d'adhérence de la matrice extracellulaire et les intégrines à la surface des cellules. La transmission des signaux mécaniques prend son origine au niveau des plaques denses ou héli-desmosomes, composées de protéines du cytosquelette liées aux protéines d'adhérence de la matrice extracellulaire par les intégrines. Chez le rat spontanément hypertendu la fibronectine en excès semble contribuer à protéger la paroi artérielle contre les dégâts mécaniques. Au cours de l'athérome, l'organisation initiale de la plaque s'accompagne de surproduction de la matrice extracellulaire, alors qu'aux stades ultérieurs la priorité revient à l'adhérence par l'intermédiaire des intégrines, prévenant la rupture de la plaque. Le rôle des intégrines dans le fonctionnement de la paroi artérielle semble majeur mais reste à ce jour encore mal connu.

ADRESSES

J.M. Daniel-Lamazière: chargé de recherche à l'Inserm. Inserm U. 441, avenue du Haut-Lévêque, 33600 Pessac. P. Lacolley: chargé de recherche à l'Inserm. Y. Bézie: pharmacien, doctorant. Inserm U. 337, 15, rue de l'École-de-Médecine, 75006 Paris, France. P. Challande: docteur en médecine, professeur de mécanique. Laboratoire de mécanique physique, Université Paris 6, Paris, France. S. Laurent: professeur des universités, praticien hospitalier. Service de pharmacologie et Inserm U. 337, hôpital Broussais, 96, rue Didot, 75014 Paris, France.

TIRÉS À PART

J.M. Daniel-Lamazière.

La principale fonction du système artériel est la distribution du flux sanguin vers les différents capillaires de l'organisme. Il est constitué d'un réseau capacitif proximal très distensible, l'aorte et ses branches principales, et d'un réseau terminal à niveau de résistance élevé, les petites artères et les artéioles. Les propriétés mécaniques des gros troncs artériels jouent un rôle capital dans la transformation du débit pulsatile à la sortie du cœur en un débit continu dans les capillaires. Une diminution de la distensibilité des gros troncs artériels entraîne le développement

d'une hypertrophie ventriculaire gauche et une augmentation de la pression pulsée (pression systolique moins pression diastolique) qui sont considérées toutes deux comme des facteurs de risque cardiovasculaires indépendants [1, 2].

L'hypertension artérielle et le vieillissement représentent deux exemples de modifications significatives de la rigidité des gros troncs artériels [3-5]. L'hypertension artérielle entraîne des changements structuraux importants sans modification des propriétés mécaniques intrinsèques de la paroi artérielle [6]. Seule, l'augmentation de la pression artérielle semble expli-

RÉFÉRENCES

1. Madhavan S, Ooi W, Cohen H, Alderman M. Relation of pulse pressure and blood pressure reduction to the incidence of myocardial infarction. *Hypertension* 1994; 23: 395-401.
2. Safar M, Frohlich E. The arterial system in hypertension: a prospective view. *Hypertension* 1995; 26: 10-4.
3. Laurent S. Arterial wall hypertrophy and stiffness in essential hypertensive patients. *Hypertension* 1995; 26: 355-62.
4. Levy B, Duriez M, Philippe M, Poitevin P, Michel JB. Effect of chronic dihydropyridine (isradipine) on the large arterial walls of spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 1994; 90: 3024-33.
5. Laurent S, Girerd X, Benetos A, Daniel-Lamazière JM, Lacolley P. Physiopathologie du remodelage artériel dans l'hypertension artérielle. *Med Sci* 1997; 13: 809-19.
6. Laurent S, Lacolley P, Girerd X, Boutouyrie P, Bezie Y, Safar M. Arterial stiffening: opposing effects of age- and hypertension-associated structural changes. *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74: 842-9.
7. Fung Y. Mechanical properties and active remodeling of blood vessels. In: Fung Y. ed. *Biomechanics, mechanical properties of living tissues*. New York: Springer Verlag, 1993; 321-91.
8. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 375-413.
9. Reinhardt DP, Sasaki T, Dzamba BJ, Keene DR, Chu M-L, Göhring W, Timpl R, Sakai LY. Fibrillin-1 and fibulin-2 interact and are colocalized in some tissues. *J Biol Chem* 1996; 271: 19489-96.
10. Collod G, Boileau C. Fibrillines et fibrilinoopathies. *Med Sci* 1996; 12: 1077-86.
11. Laurent S, Girerd X, Mourad J, Lacolley P, Beck L, Boutouyrie P, Mignot J, Safar M. Elastic modulus of the radial artery wall material is not increased in patients with essential hypertension. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 1223-31.
12. Lacolley P, Glaser E, Challande P, Boutouyrie P, Mignot J, Duriez M, Levy B, Safar M, Laurent S. Structural changes and in situ aortic pressure diameter relationship in long-term chemical sympathectomized rats. *Am J Physiol* 1995; 269: H407-16.

quer la diminution de la distensibilité artérielle de l'hypertendu. A l'inverse, le vieillissement produit des modifications structurales responsables d'une augmentation de la rigidité artérielle. Nous verrons que dans l'athérosclérose les modifications de la rigidité artérielle sont plus discutées.

Les propriétés mécaniques des gros troncs artériels dépendent des propriétés de chacun de leurs constituants majeurs que sont l'élastine, le collagène et les cellules musculaires lisses vasculaires, mais elles dépendent aussi fondamentalement de leur arrangement géométrique et des interactions mécaniques entre ces différents constituants [7]. A l'heure actuelle, les candidats à la médiation de ces interactions sont représentés par les protéines d'adhérence de la matrice extracellulaire, la plus étudiée étant la fibronectine, et leurs récepteurs membranaires, les intégrines [8]. Ces structures capables de modifier leur organisation en fonction des contraintes mécaniques sont considérées comme un facteur essentiel de la morphologie et du remodelage tissulaire.

Paroi des gros troncs artériels

D'un point de vue anatomique, la paroi artérielle est organisée en structures lamellaires concentriques. Chaque unité musculo-élastique se définit, entre deux lames élastiques, par un groupe de cellules musculaires lisses parallèles, entourées individuellement d'une membrane basale (figure 1). La cohésion de la paroi est assurée par des protéines de structure telles que les protéoglycannes, les héparan-sulfates mais aussi la fibronectine, la vitronectine et les fibrillines intimement associées à l'élastine. La synthèse des protéines extracellulaires est effectuée par les cellules musculaires lisses, mais leur maturation post-traductionnelle est réalisée dans le milieu extracellulaire. Des modifications des collagènes, particulièrement le collagène de type I, induisent des pertes graves de la cohésion du tissu conjonctif pariétal. Les fibrillines se trouvant à la jonction des microfibrilles de la membrane basale et des microfibrilles élastiques sont sujettes à des mutations à l'origine d'affections graves du tissu élastique telles que

des ruptures anévrismales et la maladie de Marfan [9, 10]. Il est donc essentiel de considérer comme de la première importance, les relations des protéines de la matrice extracellulaire avec les composants de la membrane basale.

Propriétés mécaniques des artères élastiques proximales

Elles résultent principalement du comportement mécanique de la média. Il faut dissocier les propriétés mécaniques actives, dues à la contractilité des cellules musculaires lisses, assurant un tonus musculaire permanent (vasoconstriction, relaxation), des propriétés passives, dues au maillage de la trame extracellulaire (réseau de collagène et d'élastine). Les fibres élastiques sont sollicitées à bas niveau de pression artérielle lorsque le vaisseau est compliant, tandis qu'un niveau élevé de pression sollicite principalement les fibres de collagène, très peu distensibles, ce qui rend le vaisseau plus rigide.

Habituellement, on caractérise le comportement mécanique d'un matériau par la relation contrainte/déformation. Ces deux grandeurs ne sont pas accessibles pour chacun des matériaux constitutifs de la paroi artérielle. L'approche ne peut donc être que globale: on considère que la paroi est constituée d'un seul matériau homogène et isotrope. Les propriétés de ce matériau équivalent dépendent, bien évidemment, des propriétés élastiques de chacun de ses constituants et de leurs proportions respectives au sein du tissu, mais également de leurs liaisons physiques.

L'élasticité artérielle est évaluée au travers de plusieurs paramètres: la compliance, la distensibilité volumique et le module élastique qui caractérisent chacun un aspect des propriétés élastiques. Les paramètres accessibles, tant sur le plan expérimental qu'en clinique, sont les variations de pression et de diamètre au cours du cycle cardiaque. Les progrès réalisés dans l'instrumentation au cours des dernières années permettent de mesurer également l'épaisseur intima-média. Ces mesures géométriques utilisent des techniques ultrasonores dérivées de l'échographie, complétées par des méthodes de poursuite d'échos (echo-

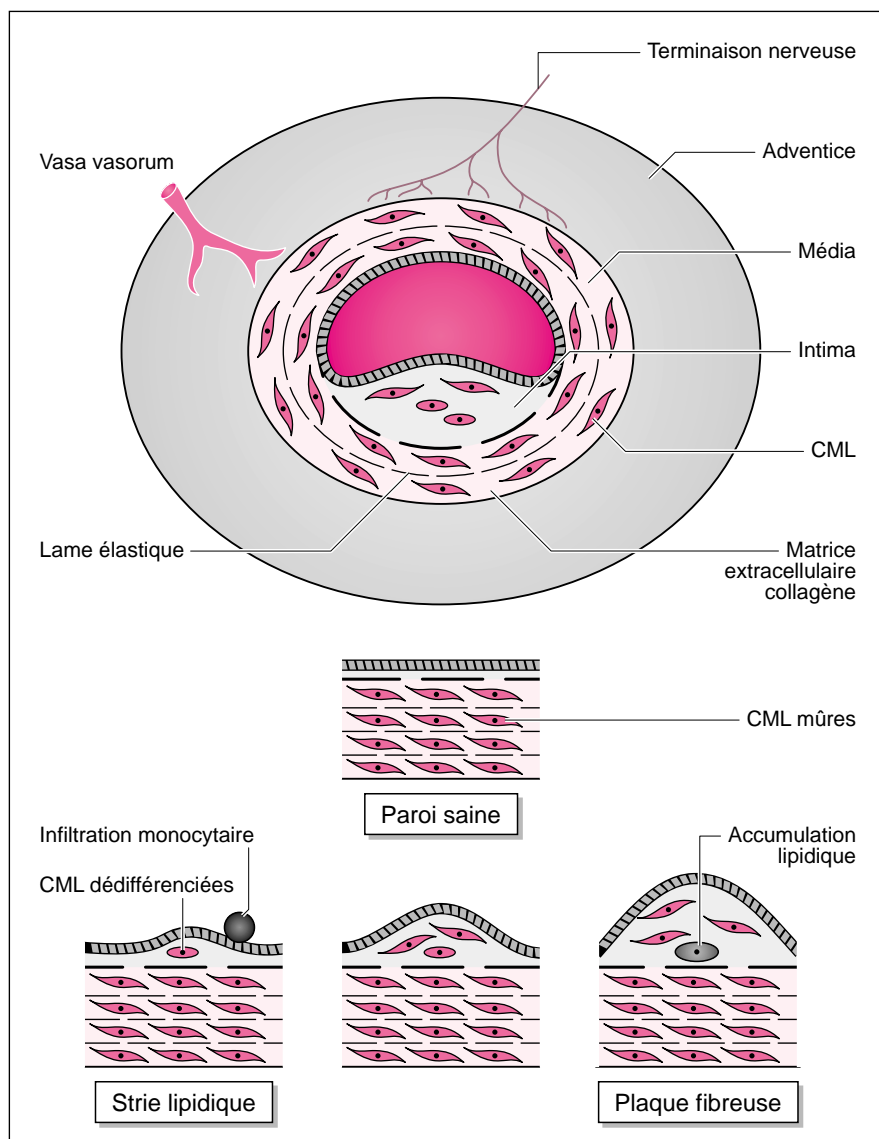


Figure 1. **Les cellules musculaires lisses artérielles (CML) peuvent modifier leur phénotype au cours d'un processus tel que le développement de la plaque d'athérosclérose.**

tracking) [11]. Chez le petit animal, la précision de la mesure de l'épaisseur reste insuffisante et celle-ci est obtenue par l'histomorphométrie [12]. La compliance circonférentielle est définie comme l'augmentation de la lumière artérielle en réponse à une augmentation donnée de pression. Elle diminue avec l'augmentation de pression, et la relation compliance/pression est négative. La distensibilité est le rapport de la compliance circonférentielle à la surface de la lumière (figure 2). Pour apprécier le comportement du matériau équivalent, il faut établir la relation entre la

contrainte subie et la déformation. Cela permet de calculer le module élastique (module de Young [7]) qui caractérise complètement le matériau. La déformation se calcule à partir d'un état de référence, généralement l'état à contrainte nulle. Ce dernier n'étant pas accessible à partir des mesures *in vivo*, l'élasticité du matériau est évaluée à partir des courbes reliant la contrainte circonférentielle au module élastique incrémentiel. Il se calcule à partir des valeurs de diamètre et d'épaisseur pour différents niveaux de pression. À même niveau de contrainte, une augmentation du

module élastique signe une plus grande rigidité du matériau. En pathologie vasculaire, les modifications mécaniques résultent à la fois des changements de la nature des protéines et de la réorganisation des unités musculo-élastiques. Au cours du vieillissement, par exemple, des processus de glycosylation non enzymatique conduisent à des altérations importantes des protéines matricielles et à une désorganisation des unités musculo-élastiques. Les conséquences mécaniques de ces modifications structurales sont une augmentation de la rigidité artérielle par transfert des efforts sur le réseau de collagène plus rigide.

État de différenciation cellulaire : aspects morphologiques et immunologiques

D'une façon très générale, il est possible d'opposer deux états phénotypiques des cellules musculaires lisses. Dans la paroi normale, elles sont dans un phénotype contractile, alors que dans l'aorte pathologique ces cellules peuvent s'infiltrer dans l'intima, sous l'endothélium, et former la plaque d'athérosclérose. Dans l'intima, les cellules musculaires lisses modifient leur phénotype pour acquérir un aspect qualifié de sécrétoire expliquant l'accumulation de protéines de la matrice extracellulaire. Les études histologiques dans différentes affections artérielles ont montré que les cellules musculaires lisses oscillent entre deux phénotypes. Classiquement, le phénotype mature, exempt de toute affection, est le phénotype contractile, alors qu'un phénotype sécrétoire est décrit pour les cellules musculaires lisses des artères atteintes d'athérosclérose ou exposées à l'hypertension artérielle (HTA). Cette dénomination vient de la fin des années 1970 où l'on ne disposait que d'une méthodologie descriptive. Aujourd'hui, on oppose encore communément prolifération et différenciation. Cette opposition simple n'est pas satisfaisante car des cellules matures peuvent se diviser pour contribuer à l'organisation tissulaire [13]. Cependant, il est clair que, dans une même région, toutes les cellules musculaires lisses ne sont pas dans un état de différenciation synchronisé. Il vaut mieux parler alors

RÉFÉRENCES

- Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 1995; 75: 487-517.
 - Aikawa M, Sivam PM, Kuro-o M, Kimura K, Nakahara K, Takewaki S, Ueda M, Yamaguchi H, Yasaki Y, Periasamy M, Nagai R. Human smooth muscle myosin heavy chain isoforms as molecular markers for vascular development and atherosclerosis. *Circ Res* 1993; 73: 1000-12.
 - Daniel Lamazière JM, Lavallée J, Zunino C, Larrue J. Semiquantitative study of the distribution of the two cellular antigens by computer-directed color analysis. *Lab Invest* 1993; 68: 248-52.
 - Duplâa C, Couffinhal T, Labat L, Moreau C, Daniel Lamazière JM, Bonnet J. Quantitative analysis of polymerase chain reaction products using biotinylated dUTP incorporation. *Anal Biochem* 1993; 212: 229-36.
 - Glukhova M, Koteliansky V. Integrins, cytoskeletal and extracellular matrix proteins in developing smooth muscle cells of human aorta. In: Mecham R. ed. *Vascular smooth muscle cell*. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1995: 37-79.
 - Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins-emerging paradigms of signal-transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 549-99.
 - Pfaff M, Tangemann K, Müller B, Gurath M, Müller G, Kessler H, Timpl R, Engel J. Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by α IIb β 3, and α 5 β 1 integrins. *J Biol Chem* 1994; 269: 20233-8.
 - Tawil N, Wilson P, Carbonetto S. Integrins in point contacts mediate cell spreading: factors that regulate integrin accumulation in point contacts vs. focal contacts. *J Cell Biol* 1993; 120: 261-71.
 - Juliano RL, Haskill S. Signal transduction from extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; 120: 577-85.
 - Lafrenie RM, Yamada KM. Integrin-dependent signal transduction. *J Cell Biochem* 1996; 61: 543-53.
 - Hynes R. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
 - Miyamoto S, Teramoto H, Coso O, Gutkind J, Burbelo P, Akiyama S, Yamada K. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 1995; 131: 791-805.
- d'une diversité de phénotypes au sein d'une même population cellulaire. Il est maintenant bien admis que les cellules musculaires lisses peuvent moduler leur phénotype entre deux états de différenciation. Il semble qu'elles oscillent entre un certain phénotype proche de celui qu'elles avaient à l'état embryonnaire et un phénotype mature bien différencié; le passage de l'un à l'autre étant possible tout au long de la vie (figure 1). Ces phénomènes de réversibilité peuvent être observés dans des états pathologiques, tels que des modifications intimes dans l'athérosclérose et une activation phénotypique médiale dans le cas de l'HTA. La caractérisation de l'état de différenciation est réalisée par le dénombrement de plusieurs protéines du cytosquelette, comme l' α -actine du muscle lisse, la chaîne lourde de la myosine du muscle lisse, la calponine (28 à 34 kDa) et la SM-22 qui lui est assez semblable, la caldesmone (la chaîne lourde 120 à 150 kDa et les chaînes légères 70 à 80 kDa), la vinculine (117 kDa) mais aussi la desmine, assez faiblement synthétisée dans les gros vaisseaux. Les cellules musculaires lisses produisent quatre isoformes de l'actine issues de gènes différents, l' α -actine du muscle lisse, la β -actine non musculaire, la γ -actine non musculaire et la γ -actine musculaire lisse. L' α -actine est de loin la protéine prépondérante et représente 40 % des protéines totales. Il n'est pas possible de distinguer parmi ces différentes isoformes laquelle est la plus efficace pour conférer à la cellule ses propriétés contractiles. Néanmoins, il est possible de mesurer des variations quantitatives dans l'expression de l' α -actine musculaire lisse au cours des différentes étapes de la modulation de la différenciation des cellules musculaires lisses. Il est difficile de caractériser un stade de différenciation précis par des mesures quantitatives, mais cet antigène reste très utile pour caractériser l'origine tissulaire des cellules de zones pathologiques. La synthèse des chaînes lourdes de la myosine représente certainement l'expression génique la plus caractéristique du muscle lisse. Il existe dans les cellules musculaires lisses au moins trois isoformes spécifiques du muscle lisse et deux variants non musculaires. Deux isoformes assez couramment étudiées, la SM-1 et la SM-2, sont en fait deux protéines issues d'un même gène mais produites par une maturation post-traductionnelle, par « coupure alternative ». Ainsi, la SM-2 apparaît plus tardivement dans le développement embryonnaire et caractérise un stade tout à fait mature des cellules musculaires lisses qui la produisent. Toutes ces isoformes de la myosine sont capables de conférer aux cellules qui les renferment une grande capacité de contractilité [14]. Le développement des anticorps monoclonaux a permis de produire une grande variété de marqueurs très spécifiques, capables de détecter des conformations antigéniques particulières. Les variations phénotypiques sont principalement d'ordre quantitatif. L'immunologie quantitative par des techniques telles que l'ELISA (qui mesure une intensité d'absorption d'un substrat coloré soluble), ou la cytométrie en flux (qui mesure une intensité de fluorescence) est difficilement utilisable pour étudier des cellules ancrées dans un tissu. Nous avons développé une technique d'analyse d'image en vraies couleurs, sans l'usage de filtres, qui permet de comparer la distribution de réactions immunohistochimiques révélées à l'aide de substrats colorés [15]. L'analyse des coupes histologiques en lumière transmise présente ainsi l'avantage de pouvoir faire des observations quantitatives multiples sans artifices. Comparée à la quantification en cytométrie de flux, cette technique permet une mesure sans modifier l'aspect *in situ*. Les variations d'expression des gènes sont souvent très minimes, mais plusieurs techniques fiables sont aujourd'hui disponibles, en particulier la PCR (*polymerase chain reaction*) quantitative [16].
- *Protéines d'adhérence : interface cellule/matrice*
- Les interactions des cellules musculaires lisses avec la matrice extracellulaire sont un facteur essentiel de l'organisation et de la cohésion tissulaire. La grande diversité des molécules de la matrice extracellulaire du muscle lisse est liée à la multiplicité des gènes impliqués et aux nombreux produits d'épissage différentiel [17]. La matrice du muscle lisse est constituée de deux compartiments,

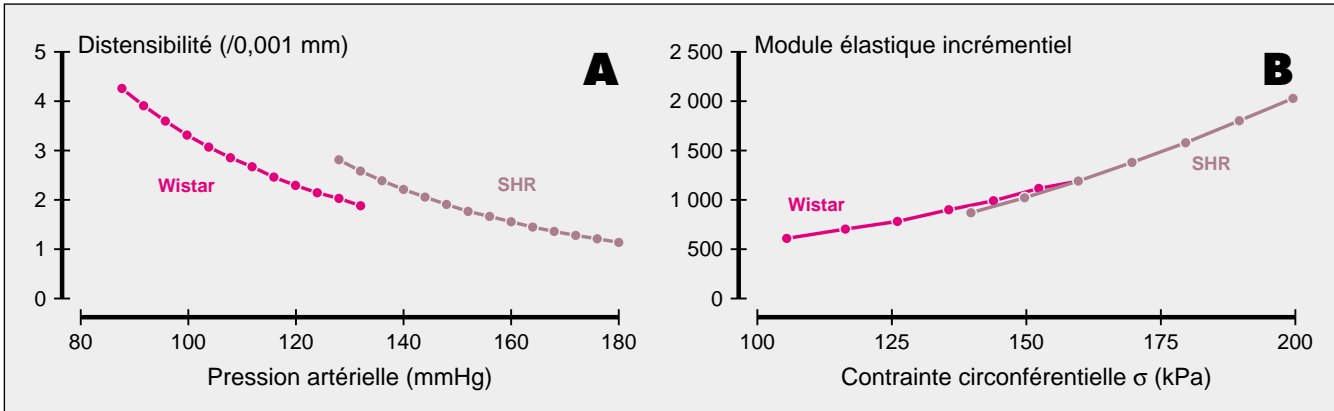


Figure 2. **Comportement mécanique des gros troncs artériels.** **A**: exemples de courbes distensibilité/pression de l'aorte abdominale obtenues in vivo chez un rat normotendu (Wistar) et un rat spontanément hypertendu (SHR) au cours du cycle cardiaque. La distensibilité, qui apprécie le comportement global de la paroi, diminue en systole. **B**: exemple de courbe module élastique incrémentiel/contrainte circonférentielle (σ) obtenue dans les mêmes conditions. Le module incrémentiel caractérise les propriétés mécaniques des constituants de la paroi, il augmente en systole. À même niveau de contrainte circonférentielle (140-160 kPa), le module élastique du SHR n'est pas différent de celui du rat Wistar, ce qui montre que la rigidité artérielle intrinsèque de l'animal hypertendu n'est pas augmentée, malgré le développement de l'hypertrophie artérielle.

la membrane basale et la matrice interstitielle. La membrane basale entourant les cellules musculaires lisses contient, entre autres, les laminines, le collagène IV, le nidogène, l'entactine et relativement peu de protéoglycanes. La matrice interstitielle contient, en particulier, les fibronectines, la vitronectine, la thrombospondine, l'élastine et les collagènes I, III et V. Les interactions de ces molécules avec les cellules

musculaires lisses et les autres molécules de la matrice sont assurées par des domaines fonctionnels spécifiques. La majorité des interactions entre cellules et molécules de la matrice extracellulaire sont relayées par les intégrines. Celles-ci constituent une famille de récepteurs transmembranaires capables de se lier à un grand nombre de molécules de la matrice. L'activation des intégrines par des

mécanismes très complexes, à la fois intra- et extracellulaires, peut aboutir à la formation de véritables structures d'attachements, appelées zones ou structures d'adhérence focale, entre les cellules et entre les cellules et la matrice extracellulaire (figure 3) [18].

• **Intégrines: définition et répertoire**
La cohésion des cellules au tissu conjonctif environnant est réalisée par l'intermédiaire de récepteurs

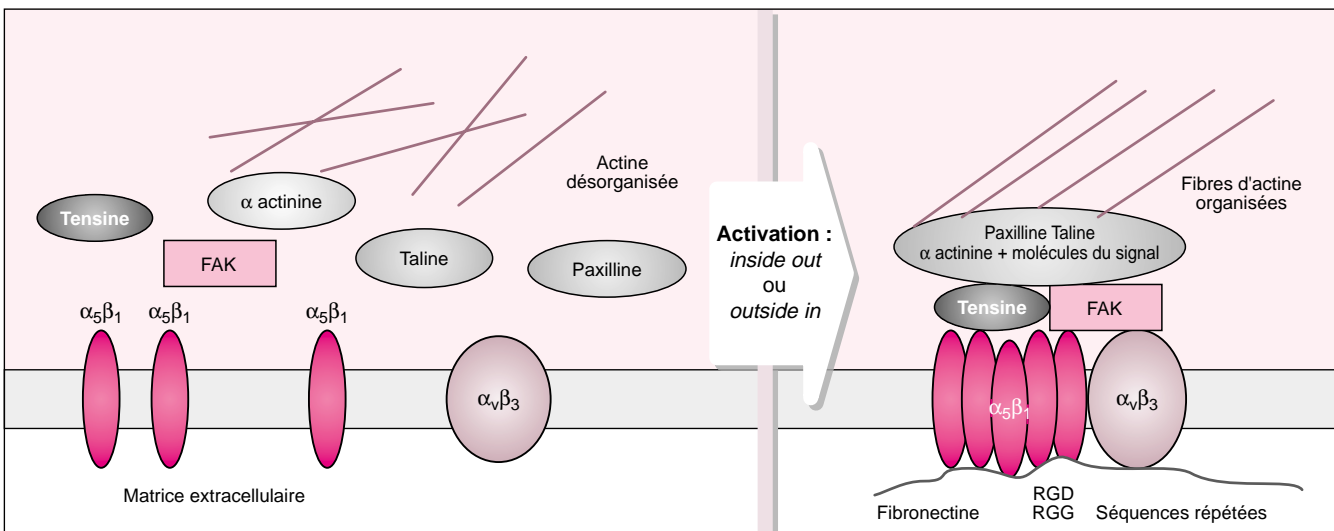


Figure 3. **Schéma d'activation cellulaire de réorganisation des intégrines dans la membrane plasmique qui conduit à la formation de plaques denses.** L'agrégation des intégrines avec leur ligand entraîne une série d'interactions moléculaires en cascade qui transmet le signal vers le noyau par l'intermédiaire d'autophosphorylations moléculaires. Inside out : transmission du signal de l'intérieur vers l'extérieur; outside in : transmission du signal de l'extérieur vers l'intérieur.

RÉFÉRENCES

25. Yamada K, Geiger B. Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 76-85.

26. Hoshiga M, Alpers CE, Smith LL, Giachelli CM, Schwartz SM. $\alpha_v\beta_3$ integrin expression in normal and atherosclerotic artery. *Circ Res* 1995; 77: 1129-35.

27. Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Tianhua H, Klier G, Cheresch DA. Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79: 1157-64.

28. Takasaki I, Chobanian A, Mamuya W, Brecher P. Hypertension induces alternatively spliced forms of fibronectin in rat aorta. *Hypertension* 1992; 20: 20-5.

29. Daniel Lamazière JM, Desmoulière A, Pascal M, Larrue J. Detection of atherosclerotic plaque with two monoclonal antibodies. *Atherosclerosis* 1988; 74: 115-26.

30. Hirai T, Ssayama S, Kawasaki T, Yagi S. Stiffness of systemic arteries in patients with myocardial infarction. A noninvasive method to predict severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1989; 80: 78-86.

31. Dart A, Lacombe F, Yeoh J, Cameron J, Jennings G, Laufer E, Esmore D. Aortic distensibility in patients with isolated hypercholesterolaemia, coronary artery disease, or cardiac transplant. *Lancet* 1991; 338: 270-3.

32. Loree H, Kamm R, Stringfellow R, Lee R. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ Res* 1992; 71: 850-8.

33. Gadeau A, Campan M, Millet D, Candresse T, Desgranges C. Osteopontin overexpression is associated with arterial smooth muscle proliferation *in vitro*. *Arteriosclerosis Thromb* 1993; 13: 120-5.

34. Couffinhal T, Duplâa C, Moreau C, Daniel Lamazière JM, Bonnet J. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994; 74: 225-34.

35. Daémi N, Vallet T, Jacquier M, Rémy L. Laminine, intégrines, organisation et comportement invasif des adénocarcinomes. *Med Sci* 1994; 10: 1275-81.

36. Clark E, Brugge J. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268: 233-9.

transmembranaires hétérodimériques, les intégrines (qui intègrent les cellules dans leur milieu). Chaque hétérodimère est constitué d'une chaîne α et d'une chaîne β . On connaît aujourd'hui une dizaine de chaînes β ; une chaîne α peut indifféremment se combiner à plusieurs familles de chaînes β . Pour compliquer encore cette classification, il faut souligner qu'un hétérodimère peut lier des ligands différents. C'est la sous-unité α qui est responsable de la spécificité de la liaison avec son ligand. Les intégrines présentes *in vivo* dans les cellules musculaires lisses adultes des gros troncs artériels sont $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$ et $\alpha_v\beta_3$, permettant des liaisons avec les collagènes, la fibronectine, les laminines, la vitronectine et la thrombospondine [17] (Tableau I).

Pour proposer une classification simplifiée, on distingue les intégrines impliquées dans les contacts cellule/cellule de celles impliquées dans les interactions avec les protéines de la membrane basale. Par exemple, l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ peut se lier indifféremment au VCAM-1 (*vascular cellular adhesion molecule*) ou à la fibronectine. Les relations avec la matrice extracellulaire sont complexes, concernant les relations avec la membrane basale et les contacts avec les protéines impliquées dans les processus inflammatoires ou le développement embryonnaire (fibronectine, fibrinogène, vitronectine, osteopontine, etc.). Une des principales caractéristiques, non exhaustive, des intégrines est de reconnaître l'enchaînement du tripeptide RGD (arginine-glycine-acide aspartique) (*m/s n° 6, vol. 2, p. 337*). Pour se lier à leur ligand, il est absolument nécessaire que les deux sous-unités de l'intégrine soient associées

selon des conformations très précises, de même que l'arrangement spatial de la séquence RGD est de la toute première importance [19]. En effet, la fabrication de peptides cycliques conférant à cette séquence des conformations très particulières a permis de montrer qu'il peut exister des liaisons jusqu'à 100 fois plus fortes que celles mesurées pour les protéines natives. Les contacts cellule-protéines extracellulaires peuvent être visualisés *in vitro* comme la formation de *clusters*, ou points de contact focaux [20].

Les intégrines jouent un rôle très important au cours du développement embryonnaire: elles participent à l'adhérence, à la migration des cellules vers leurs sites tissulaires, ainsi qu'aux différentes étapes de la différenciation. Dans les tissus organisés, les intégrines participent à la cohésion du tissu par l'intégration des cellules à la membrane basale, assurant la continuité entre le milieu extracellulaire et l'organisation cellulaire [21]. Au cours d'événements pathologiques nés au niveau tissulaire, ces interactions sont souvent modifiées, en particulier lors de la migration cellulaire.

Par leur position transmembranaire, les intégrines jouent un rôle aussi bien dans la transduction du signal de l'intérieur vers l'extérieur (*inside-out*) lors de l'activation cellulaire, par des cytokines par exemple, que lors de modifications des composants extracellulaire qui vont induire des changements phénotypiques des cellules (*outside-in*). Lors de ces deux phénomènes, il faut souligner la complexité des mécanismes mis en jeu, faisant appel à la coopération des intégrines entre elles et avec des protéines liées à l'activation du cytosquelette (phosphorylation des tyrosines impliquées dans les points focaux d'adhérence),

Tableau I

PROTÉINES D'ADHÉRENCE ET INTÉGRINES DANS LE MUSCLE LISSE VASCULAIRE

Ligands	Intégrines
collagènes	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$
laminine	$\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha_3\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$
fibronectine	$\alpha_3\beta_1$, $\alpha_4\beta_2$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$
vitronectine	$\alpha_8\beta_1$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$
ténascine	$\alpha_9\beta_1$, $\alpha_8\beta_1$
thrombospondine	$\alpha_v\beta_3$

de même qu'à la coopération avec la structure tridimensionnelle des protéines de la matrice extracellulaire [22]. Les intégrines sont bien le lien entre l'armature cellulaire constituée par le cytosquelette et la matrice extracellulaire.

La régulation de l'expression des intégrines est actuellement en cours d'investigation mais il est certain que, lors d'événements pathologiques, ces protéines qui sont le lien entre les cellules et leur environnement jouent un rôle primordial dans l'organisation des tissus et leurs propriétés fonctionnelles. Nous aborderons plus loin l'aspect pharmacologique d'agents anti-intégrines; mais nous pouvons entrevoir d'ores et déjà la difficulté d'obtenir des agents qui seraient sélectifs d'une conformation bien précise.

• Structures d'adhérence focales du muscle lisse

Le cytosquelette et l'appareil contractile sont réunis dans des structures particulières, bien visibles en microscopie électronique, appelées « corps denses » lorsqu'elles sont localisées dans le cytoplasme et « plaques denses » ou héli-desmosomes dans la membrane plasmique. Les corps denses constituent des sites d'attachement majeurs entre les filaments d' α -actinine du cytosquelette et les filaments d'actine de l'appareil contractile. Les héli-desmosomes assurent l'accrochage des filaments d'actine à la membrane cellulaire. Ils sont constitués d'une association de protéines qui sont la vinculine, la taline, la paxilline et la tensine. Ils sont caractérisés aussi par la présence d'intégrines qui relient les protéines du cytosquelette aux protéines d'adhérence de la matrice extracellulaire (figure 3) [17, 23]. La formation des plaques d'adhérence est réalisée par des phénomènes de coopérativité moléculaire comparables à la réaction allostérique. Les interactions moléculaires entre les différents constituants des plaques d'adhérence sont très complexes [24]. Elles dépendent du type d'intégrines présentes et de leur concentration sous forme d'agrégats, de la liaison entre l'intégrine et son ligand, qui peut être une molécule de la matrice ou appartenir à une cellule adjacente, et de l'état de phosphorylation de ces molécules intracellulaires par les tyrosine kinases [25]. Les

kinases, comme la p125 FAK (*focal adhesion kinase*), sont très largement impliquées dans les complexes d'adhérence, même si leurs interactions spécifiques avec les autres molécules sont encore mal connues (*m/s* n° 2, vol. 9, p. 228; n° 3, vol. 11, p. 491). Ce sont elles qui assurent la phosphorylation des domaines SH2 des protéines régulatrices Src et Grb2, considérée comme une étape-clé dans la formation des complexes d'adhérence. Leur inhibition par l'herbimycine, inhibiteur des tyrosine kinases, supprime la formation de ces complexes.

Interactions cellules-matrice et propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques de la paroi résultent de la composition des constituants majoritaires de la matrice (élastine et collagène), des cellules musculaires et des interactions entre ces différents constituants. L'augmentation des interactions cellule-matrice dépend du nombre de points d'attachements au sein de la média, la rigidité augmentant avec ce nombre. Le nombre de points d'attachements est réglé principalement par le degré d'activation des cellules musculaires lisses. La contraction de la cellule musculaire augmente le recrutement de ces zones d'adhérence, ce qui rigidifie la paroi.

Perte d'adhérence, motilité

Pour assurer la cohésion du tissu, les cellules ont besoin de s'intégrer dans leur environnement et, à l'inverse, la perte d'adhérence entraîne la mort cellulaire. Cela est particulièrement remarquable *in vitro*: si l'on empêche les cellules d'adhérer, on perd rapidement la population cellulaire. De petites variations dans l'intensité de l'adhérence peuvent entraîner des modifications importantes dans la cohésion tissulaire.

Dans les processus pathologiques (inflammation, tumeur avec métastase, athérosclérose), les cellules sont amenées à se déplacer pour migrer vers d'autres sites. Au cours de ces événements, on observe dans un premier temps une perte d'adhérence puis la synthèse de nouvelles molécules d'adhérence et d'intégrines qui vont permettre aux cel-

lules de s'ancrer dans un autre environnement. Au cours de ces processus migratoires, il semble aujourd'hui établi que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle essentiel [26]. Ici encore il n'est pas possible d'attribuer à une seule intégrine une fonction exclusive. En effet, l'étude *in vitro* de la migration cellulaire a montré qu'un déficit de l'intégrine $\alpha_v\beta_1$ diminue les capacités migratoires de ces cellules alors que la capacité d'adhérence par $\alpha_v\beta_3$ n'est en rien modifiée. Le rôle fondamental de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la migration cellulaire a été mis en évidence lors de l'établissement de processus d'angiogenèse dans les tumeurs. Mais sans doute faut-il garder à l'esprit les effets coopératifs des autres intégrines et des autres protéines, dont les protéases, impliquées dans la formation des agrégats en réponse à l'activation des intégrines. Il est possible aujourd'hui d'analyser les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire ou apoptose. La perte d'adhérence cellulaire et la perte des liens des cellules avec le milieu extracellulaire entraînent des mécanismes apoptotiques [27]. En outre, dans les cellules musculaires lisses, au moins deux mécanismes conduisent à l'apoptose, dont une voie dépendante de la protéine p53. Le lien entre l'adhérence cellulaire, le phénotype et maintenant la mort cellulaire reste à éclaircir.

Physiopathologie

HTA

Des résultats récents obtenus sur l'artère radiale montrent que la rigidité artérielle, étudiée à partir de la relation module élastique/contrainte, n'est pas augmentée chez l'homme hypertendu, malgré le développement de l'hypertrophie artérielle [3, 11]. De même, la distensibilité carotidienne du rat spontanément hypertendu est même significativement plus grande que celle du rat normotendu, comparée à même niveau de pression artérielle (figure 2). Ces résultats indiquent une réorganisation des interactions mécaniques entre les différents constituants de la paroi artérielle. Plusieurs études ont démontré que la synthèse de la fibronectine est augmentée dans la paroi aortique du rat spontanément hypertendu [28]. Une

étude en cours par immunohistochimie montre une augmentation marquée de la fibronectine et de l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ chez le rat spontanément hypertendu adulte par rapport au rat *Wistar* normotendu (figure 4). L'augmentation de la fibronectine pourrait entraîner la formation de nouveaux sites d'attachements cellule-cellule et cellule-matrice impliquant les intégrines. Puisque l'augmentation du nombre des attachements conduit logiquement à augmenter la rigidité passive du matériau constituant la paroi, il faut envisager chez le rat spontanément hypertendu d'autres

mécanismes impliquant les interactions cellule-matrice pour expliquer la conservation des propriétés mécaniques artérielles. La fibronectine est responsable de changements phénotypiques des cellules musculaires lisses, avec retour vers une forme embryonnaire dédifférenciée. L'augmentation de la fibronectine est compatible avec une réduction du tonus musculaire, connue pour diminuer la rigidité de la paroi artérielle.

Sur un plan strictement mécanique, l'augmentation des interactions cellule-matrice au sein de la média pourrait augmenter la résistance de la paroi

en augmentant le seuil de contrainte maximale admissible. Des mécanismes conduisant à une nouvelle organisation des différentes zones d'adhérence focales contribuerait alors à redistribuer les efforts au sein de la média et à délester le réseau de collagène d'une partie de sa charge.

Athérosclérose

• Rigidité artérielle et athérosclérose

La maladie athéroscléreuse est caractérisée par un envahissement de l'intima par plusieurs populations cellulaires, surtout des cellules musculaires lisses qui ont migré de la média, mais aussi des monocytes qui se différencient en macrophages et en lymphocytes T activés. Les cellules spumeuses peuvent provenir indifféremment des macrophages ou des cellules musculaires lisses, et ces deux types cellulaires peuvent synthétiser le récepteur «poubelle» (*scavenger*) capable d'internaliser les lipides et les protéines anormalement modifiés pour les accumuler dans les cellules et former les cellules «spumeuses», riches en corps lipidiques. Dans l'intima, divers phénotypes des cellules musculaires lisses peuvent être distingués. Dans le modèle du lapin athéroscléreuse, l'isoforme SM-1 de la myosine est synthétisée aussi bien dans l'intima que dans la média sous la plaque, alors que la SM-2 n'est synthétisée que dans la média. Nous avons pu recenser un antigène exclusivement exprimé par les membranes des cellules musculaires lisses présentes dans l'intima pathologique [29]. Les variations des phénotypes cellulaires suggèrent des modifications de la mécanique des vaisseaux contenant des plaques athéroscléreuses, puisque l'accumulation de substances collagéniques et de calcium s'accompagne d'une plus grande rigidité.

Une augmentation de la rigidité artérielle a en effet été rapportée dans quelques études [30]. Cependant, aux premiers stades de l'athérosclérose, elle n'est pas constamment observée chez l'homme, peut-être parce que les lésions précoces prédominent dans les embranchements artériels et éparpillent les segments superficiels rectilignes accessibles à l'investigation clinique non invasive. En effet, chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, la distensibilité aortique n'est pas diminuée et pourrait même

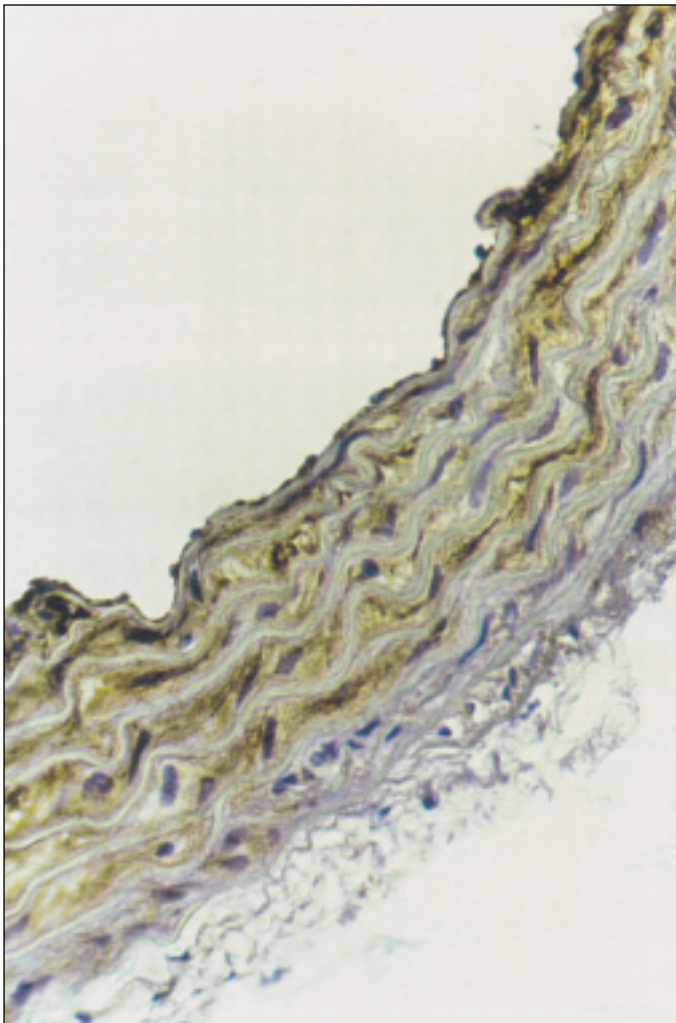


Figure 4. Exemple d'immunomarquage de la fibronectine dans l'aorte de rat spontanément hypertendu. La distribution de la fibronectine est étudiée par un anticorps monoclonal reconnaissant l'isoforme E111A. La réaction antigène/anticorps est révélée par le complexe streptavidine-peroxidase de couleur marron et détectée dans toute la média aortique; il est facile de distinguer des zones d'intense accumulation de fibronectine.

être plus élevée que celle des sujets témoins de même âge [31]. L'athérosclérose ne s'accompagne pas nécessairement d'une augmentation de la rigidité artérielle et l'attention doit davantage se porter sur les propriétés mécaniques locales de la plaque d'athérosclérose et sur les contraintes mécaniques auxquelles elle est soumise, favorisant ses complications: fissure, rupture et hémorragie, à l'origine d'une cascade d'événements conduisant à la thrombose artérielle et à l'ischémie viscérale [32]. Une approche privilégiée des facteurs physiques réglant l'évolution de la plaque doit tenir compte de l'hétérogénéité de sa structure et des interactions entre les matériaux les plus instables, comme la masse lipidique, et des régions plus rigides, comme la chape fibreuse.

• Modifications de l'adhérence dans l'évolution des plaques

Malheureusement, très peu de travaux ont été publiés concernant la modification des intégrines dans les parois normales ou pathologiques. On a récemment mis en évidence la présence de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, synthétisée par les cellules en migration, dans des artères normales et athéroscléreuses. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a deux ligands préférentiels, la vitronectine et l'ostéopontine. La vitronectine, faiblement synthétisée dans la média normale, est très présente dans les plaques. L'ostéopontine est synthétisée très précocement après l'activation des cellules musculaires lisses [33]. La réactivité des intégrines et de leurs ligands au cours de l'évolution pathologique n'est pas encore connue. L'étude de la mécanique artérielle pourrait servir à mettre à jour les facteurs de risque de rupture de plaque ou de dissection aortique. Des modifications d'adhérence permettent aux cellules musculaires lisses de migrer vers l'intima. Ces variations n'ont pas été directement décrites dans les tissus; néanmoins, outre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, il faut aussi citer la synthèse du VCAM-1 par les cellules musculaires lisses de la plaque [34]. Cette protéine transmembranaire de la famille des immunoglobulines, décrite originellement à la surface des cellules endothéliales activées, contribue à l'activation inflammatoire des cellules de la plaque.

• Autres maladies artérielles

Les contraintes qui s'exercent sur la paroi artérielle ne doivent pas être prises en compte seulement de façon systémique, mais doivent être envisagées à chaque niveau de l'arbre artériel en fonction des caractéristiques structurales de chaque segment artériel, aussi bien dans une approche physiopathologique que pharmacologique. Par exemple, les anomalies géométriques et élastiques de l'aorte abdominale anévrysmale sont telles que la pression pulsée enregistrée dans l'artère carotide commune est très augmentée, bien plus que ne le laisse prévoir son enregistrement périphérique huméral, et s'avère à la fois un facteur significatif de remodelage excentrique carotidien et un facteur d'hyperpulsatilité artérielle cérébrale, donc de risque d'accident vasculaire cérébral.

Le syndrome de Marfan est un autre exemple de maladie du tissu élastique, autosomique dominante, rapportée à une anomalie d'expression du gène *FBNI* de la fibrilline [10]. Les fibres élastiques apparaissent désorganisés et fragmentaires sur les prélèvements aortiques. Les anomalies cliniques majeures, de pronostic péjoratif, sont l'insuffisance valvulaire aortique et la dissection aortique.

Pharmacologie des molécules d'adhérence

Les progrès considérables concernant la physiopathologie des molécules d'adhérence ont conduit ces dernières années au développement de plusieurs antagonistes des intégrines dans des domaines aussi variés que la pathologie cardiovasculaire, l'inflammation, et la croissance tumorale [35]. En effet, les intégrines jouent un rôle majeur dans de nombreux processus: développement embryonnaire, croissance tumorale et métastase, apoptose, hémostasie, recrutement et activation leucocytaire, résorption osseuse, réponse cellulaire aux contraintes mécaniques [36]. C'est dans le domaine cardiovasculaire que le développement de ces antagonistes est le plus avancé: le premier médicament commercialisé (abciximab ou Reopro®) est un anticorps dirigé contre le complexe GpIIb/IIIa (intégrine α_{IIb}/β_3), voie

finale commune de l'agrégation plaquettaire, et utilisé comme anti-agrégant plaquettaire. D'autres indications potentielles sont la resténose après angioplastie, contre laquelle de nombreux traitements ont échoué, et l'athérosclérose. Le rôle de l'ostéopontine dans la prolifération, la migration et l'activation des cellules musculaires lisses et l'accélération de sa synthèse après angioplastie ont conduit à tester l'hypothèse que des antagonistes anti- $\alpha_v\beta_3$ (vitaxine, IXSYS; Reopro®, Centocor/Lilly; SB107260 SKF-Beecham) pourraient limiter la néoformation intimale, ce qui a été obtenu dans des modèles de resténose carotidienne chez le rat.

Conclusion

Nous avons vu que les interactions cellules/matrice jouent un rôle très important dans la différenciation des cellules musculaires lisses et dans la formation des structures d'adhérence focale grâce à une famille de récepteurs clés: les intégrines. Les intégrines et les protéines d'adhérence de la matrice participent à l'organisation du muscle lisse vasculaire et aux mécanismes directement liés à la transmission des forces mécaniques. Dans le futur, une meilleure connaissance de la structure tridimensionnelle des cellules musculaires lisses et des interactions moléculaires entre le cytosquelette, les intégrines et les protéines de la matrice sera possible grâce à l'utilisation de nouvelles méthodes, comme la microscopie confocale et l'utilisation d'agents anti-intégrine plus spécifiques. De nombreux travaux sont en cours pour préciser la contribution fonctionnelle exacte des interactions cellule/matrice dans le comportement mécanique des artères normales et pathologiques. La reconnaissance des différentes conformations précises des molécules d'adhérence impliquées dans la rigidité artérielle et ses complications permettrait d'envisager des applications pharmacologiques au cours de certaines maladies artérielles. Les variations phénotypiques souvent liées à des modifications conformationnelles sont difficiles à appréhender *in situ*; des méthodes d'investigation non invasives devraient permettre à l'avenir de détecter ces variations ■

Summary

Interactions between cells and extracellular matrix and elastic properties of large artery wall

The effects of increased large arteries stiffness are an elevation of pulse pressure and the development of left ventricular hypertrophy, both considered as cardiovascular risk factors independent of mean arterial pressure. The mechanical properties of the arterial wall depends not only on the smooth muscle cells, elastin and collagen contents but also on the way these components are spatially organized within the media, a process which may be regulated by extracellular matrix adhesion proteins and their cell surface integrin receptors. Interactions between vascular smooth muscle cell (VSM) and the extracellular matrix (ECM) play an important role on cell differentiation and signal transduction pathways induced by the ECM components. Mechanisms that link cytoskeletal and signalling molecules to integrins have been recently subject of intensive investigation. From a mechanical point of view, a central role could be attributed to the dense plaque which belongs to the cell-matrix adherent junctions. Dense plaques are composed of associated cytoskeletal proteins, vinculin, talin, paxilin and tensin linked to ECM proteins *via* integrin receptors. Molecular interactions in dense plaque are regulated by aggregation, conformational changes, phosphorylation and mechanical forces. Expression of integrins in normal and pathological vessels are relatively unexplored. In human hypertension, the hypertrophy of the arterial wall is accomplished without change in its intrinsic elastic properties assessed by the incremental elastic modulus. Aortic fibronectin expression is increased in spontaneously hypertensive rats (SHR). By increasing the cell-matrix attachments, fibronectin may contribute to protect the arterial wall components of SHRs against mechanical deterioration, for instance rupture of elastin fibers, through an increase in the maximum acceptable circumferential wall stress. In atherosclerotic vessels, matrix production might be seen in the earlier stages of atherosclerotic plaque formation, whereas the converse might be true of the latter stages when adhesion is vital in the prevention of plaque rupture. The integrin role is underestimated nevertheless it can play an important function in the stability of the plaque. Further studies using confocal microscopy, and specific anti-integrin monoclonal antibodies are needed to determine their precise role in the mechanical properties of large arteries. If we can better understand the role of integrins activation and conformational modifications with other adhesion molecules, it will be possible to modulate their function and thus intervene at the very basis of human vascular disease.

