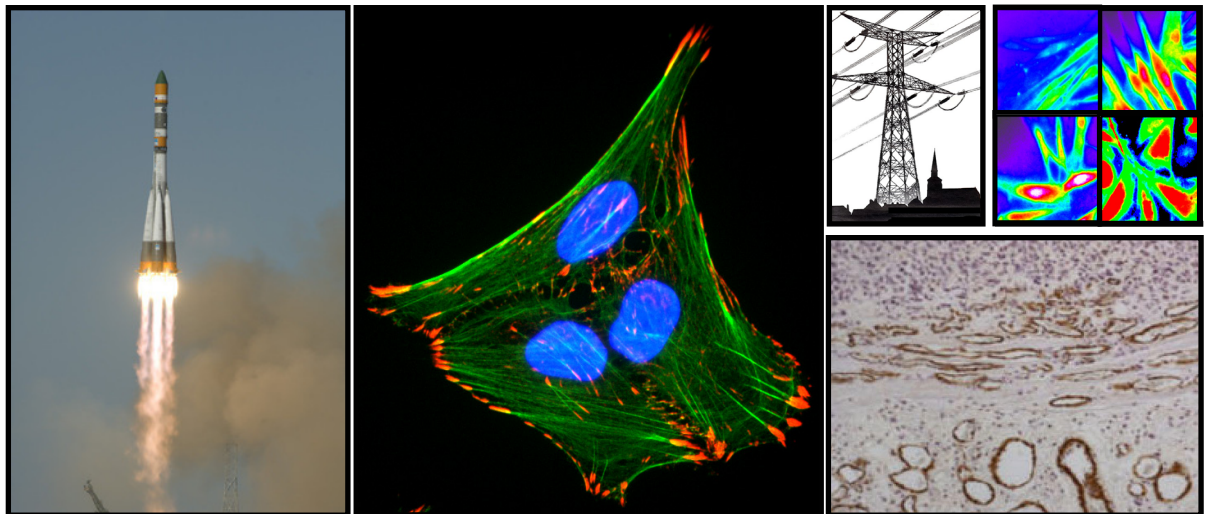


# Étude des effets biologiques de facteurs physiques environnementaux



Pierre Mineur

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de  
*Docteur en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques*



## **Table des matières**

<i>Remerciements</i>	4
<i>Abréviations</i>	6
<i>Préface</i>	8
<b><i>Partie I :</i></b>	10
<b><i>Mécanobiologie et Microgravité</i></b>	
<b><i>Introduction</i></b>	11
1. Les forces mécaniques jouent un rôle critique dans le développement et l'homéostasie tissulaire	12
2. La mécano-réception, la mécano-transduction et la mécano-réaction au niveau cellulaire et moléculaire	12
3. Le cytosquelette et son contrôle par les petites protéines G de la famille Rho	18
4. La microgravité, perte d'une force permanente unidirectionnelle	22
5. Impacts de la microgravité au niveau tissulaire et cellulaire	23
<b><i>Résultats</i></b>	26
1. Développement de modèles cellulaires	26
1.1 Création et caractérisation d'une lignée fibroblastique exprimant des RhoGTPases constitutivement actives	26
1.2 Inhibition des RhoGTPases par ARN interférentiel (siRNA)	28
2. Sélection de l'expérience CONNECT pour un vol spatial dans une capsule non-habitée lors de la mission FOTON-M3	30
2.1 Les unités de culture « Plunger Box Units » (PBU) et l'incubateur BIOBOX-6	30
2.2 Plan expérimental initial de l'expérience CONNECT	32
2.3 Stratégies expérimentales en réponse aux contraintes du vol	33
3. Expérience CONNECT dans le BIOBOX-6 au cours du vol Soyuz FOTON-M3	36
3.1 Plan expérimental	36
3.2 Problèmes survenus durant la préparation des échantillons et le vol	39
3.3 Analyses morphologiques des échantillons pertinents du vol	39
3.4 Discussion et conclusions	42
4. Alternative aux missions spatiales : les vols paraboliques	44
4.1 Développement d'un modèle expérimental compatible avec les vols paraboliques	45
4.2 Résumé des résultats de la publication n°1	46
4.3 <i>Publication n°1</i>	48
4.4 Conclusions	49
<b><i>Conclusions de la partie I</i></b>	50

<b>Partie II :</b>	52
<b><i>Champs électromagnétiques (EMF) et signalisation intracellulaire</i></b>	
<b><i>Introduction</i></b>	53
1. EMF d'origine naturelle et générés par l'activité humaine	53
2. Etudes épidémiologiques	54
3. Interactions des EMF avec les structures biologiques	54
4. Le calcium, cible potentielle des EMF	56
5. Stratégies expérimentales	58
5.1 Les systèmes d'expositions	58
5.2 Les modèles expérimentaux	59
<b><i>Résultats</i></b>	61
1. Effet des EMF sur le flux de calcium intracellulaire induit par RGDS et DGEA	61
2. Effet des EMF sur le flux de calcium intracellulaire induit par le sérum	63
2.1 Résumé des résultats de la publication n°2	63
2.2 <i>Publication n°2</i>	67
2.3 Conclusions	75
3. Modulation de l'effet des radiations UV-B par les EMF	76
3.1 Quelques éléments de physique	77
3.2 Effets toxiques et génotoxiques des radiations UV	78
3.3 Réponses biologiques aux UV-B et signalisation intracellulaire	79
3.4 Protocoles expérimentaux	81
3.5 Résultats	83
3.5.1 Modulation de l'expression de gènes marqueurs par les UV-B seuls	83
3.5.2 Modulation de l'expression des gènes cibles des UV-B par les EMF seuls	85
3.5.3 Modulation de l'expression des gènes marqueurs par les UV-B et les EMF	85
3.6 Conclusions	87
<b><i>Conclusions de la partie II</i></b>	88
<b>Partie III :</b>	89
<b><i>Effet des agents génotoxiques sur l'épissage alternatif du VEGF-A</i></b>	
<b><i>Introduction</i></b>	90
1. Observation fortuite	90
2. Le VEGF-A	91
<b><i>Résultats</i></b>	98
1. Induction de l'isoforme VEGF111 par les agents génotoxiques	98
1.1 Résumé des résultats des publications n°3 et 4	98



1.2	<i>Publication n°3</i>	102
1.3	<i>Publication n°4</i>	103
2.	Résultats supplémentaires : étude de la régulation de l'expression du VEGF111	104
2.1	Evaluation de l'induction de l'expression du VEGF111 dans diverses lignées cellulaires et par divers agents chimiothérapeutiques	104
2.2	Etude des mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant l'expression du VEGF111	105
2.2.1	Implication d'ATM/ATR dans l'induction du VEGF111 par les UV-B et la camptothécine	105
2.2.2	Implication de p53 dans l'induction du VEGF111 par les UV-B et la camptothécine	106
2.2.3	Implication des MAPK dans l'induction du VEGF111 par les UV-B et la camptothécine	107
	<b><i>Conclusions et perspectives de la partie III</i></b>	109
	<i>Bibliographie</i>	111
	<i>Liste des publications personnelles</i>	125

## *Remerciements*

*Au terme de cette thèse, je tiens tout d'abord à remercier profondément les professeurs Betty Nusgens et feu Charles Lapière de m'avoir accueilli au Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs et aidé à mener à bien ce travail dans les meilleures conditions possibles. Leur enthousiasme, leurs critiques constructives et leurs nombreux encouragements ont été de précieux soutiens. Au cours de ces années, j'ai pu également apprécier leurs grandes expériences et connaissances scientifiques ainsi que leurs qualités humaines. Je voudrais également remercier Betty pour le temps qu'elle a consacré tout au long de la réalisation de cette thèse.*

*Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Professeur Alain Colige, notre nouveau patron, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail. Ses précieux conseils et ses encouragements continus ont joué un rôle déterminant. Grâce à lui, les travaux relatifs au VEGF111 ont été initiés, puis se sont concrétisés par des publications et la mise en place d'un réseau de collaborations nationales et internationales.*

*J'ai eu la chance au cours de cette thèse d'être constamment soutenu par le docteur Charlie Lambert, qui m'a prodigué de nombreux conseils et suggestions scientifiques. Il a su m'encourager lors des moments de doute et de découragement. Il m'a adroitement canalisé pour déterminer avec rigueur les propriétés biologiques du VEGF111. Je l'en remercie.*

*Mes remerciements s'adresseront ensuite au LBTC. J'ai eu la chance de travailler dans un laboratoire dynamique avec une bonne ambiance de travail. Ainsi, je remercie Christophe qui m'a souvent consacré du temps pour réfléchir à mes résultats et pour l'apport de son raisonnement scientifique. Un grand merci également à toute l'équipe technique (Marie-Jeanne, Antoine, Georges, Yvette et la petite dernière : Cocotte ; ainsi que Christine, notre secrétaire) qui s'est toujours montrée extrêmement compétente, rigoureuse et professionnelle et m'a ainsi aidé à avancer dans mes recherches à un rythme soutenu. Enfin, je m'en voudrais de ne pas mentionner les autres collègues du labo : Johanne, Nancy, Eric, Romain, Victor, Audrey « C », Audrey « S », Alexia, Audrey « ON », Bissan et Zakia qui participent à la bonne ambiance générale.*

*Je voudrais tout particulièrement remercier mes compagons de bureau, Sandrine Servotte partie vers des cieux privés, Thi Thanh Giang Ho et Thibaut Neutelings, qui ont dû subir nombre de mes humeurs, chants et autres galimatias.*

*Je souhaite également saluer mon collègue et ami français de St-Etienne, Alain Guignandon, que j'ai connu au laboratoire lors de son Post-Doc. Son amitié et son expertise en analyse d'images m'ont beaucoup apporté.*

*Au cours de cette thèse, j'ai eu la chance de travailler avec des membres du LBTD (Professeurs Agnès Noël et Jean-Michel Foidart), ainsi qu'avec le Professeur Johannes Waltenberger et son assistant Stefan Vöö de l'Université de Maastricht. Je tiens également à saluer et à remercier René Demets (Directeur et Coordinateur scientifique de la mission spatiale FOTON-M3) ainsi que les différents membres de l'ESA que j'ai eu l'occasion de rencontrer.*

*Enfin, je remercie mon épouse Céline, mes deux enfants Martin et Antoine, ainsi que mes parents pour leur patience et la compréhension qu'ils m'ont accordée. Qu'ils trouvent dans la réalisation de cette thèse l'expression de ma reconnaissance affectueuse.*

*Ces travaux de recherche ont été supportés par Electrabel/Elia, par l'ESA, par BELSPO, par le Centre Anticancéreux près l'Université de Liège, le FNRS, les Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et la Fondation contre le Cancer.*

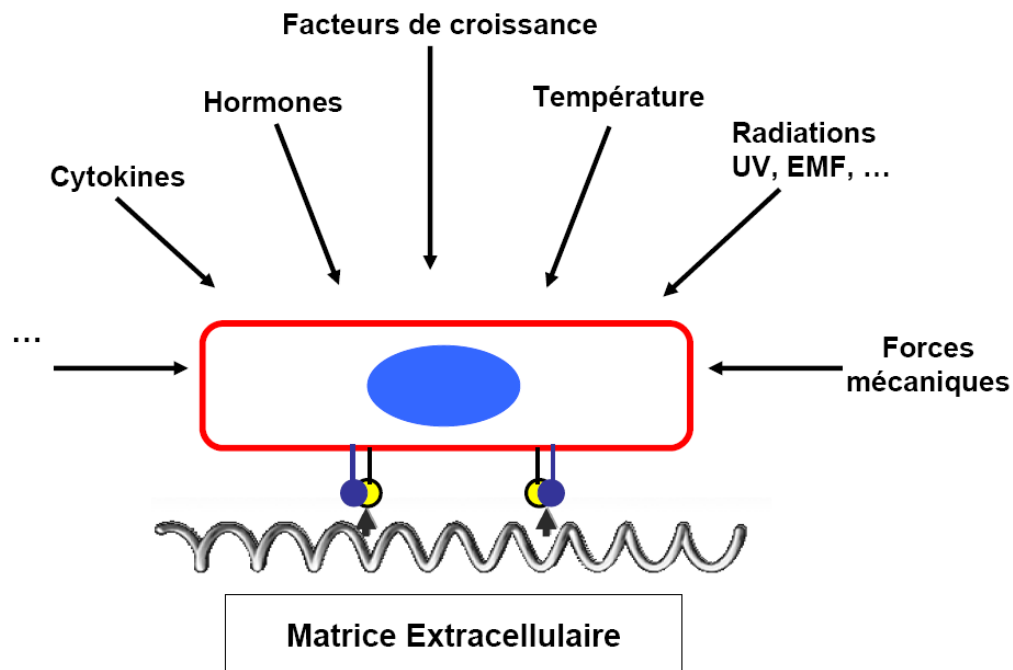
## *Abréviations*

<b>6-4</b>	Pyrimidone 6-4 pyrimidine
<b>AAAA</b>	Alanine-Alanine-Alanine-Alanine
<b>AP-1</b>	Activator protein 1
<b>Arp2/3</b>	Actin Related Protein 2/3
<b>ATM</b>	Ataxia Telangiectasia Mutated protein kinase
<b>ATR</b>	Ataxia Telangiectasia and Rad3 related protein
<b>CPD</b>	Cyclobutane Pyrimidique
<b>CTGF</b>	Connective Tissue Growth Factor
<b>DGEA</b>	Acide Aspartique-Glycine-Acide Glutamique-Alanine
<b>ECM</b>	Matrice Extracellulaire
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>EMF</b>	Champ Electromagnétique
<b>ER Ca<sup>2+</sup>-ATPase</b>	Pompe à calcium du réticulum endoplasmique ATPase-dépendante
<b>Erk1/2</b>	Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2
<b>FA</b>	Adhésion Focale
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>GAP</b>	GTPase Activating Protein
<b>GDP</b>	Guanine diphosphate
<b>GEF</b>	Guanine Exchange Factor
<b>GFOGER</b>	Glycine-Phénylalanine-Hydroxyproline-Glycine-Acide Glutamique-Arginine
<b>GPCR</b>	G-Proteins Coupled Receptors
<b>GTP</b>	Guanine triphosphate
<b>GTPase QL</b>	GTPase constitutivement active
<b>HIF</b>	Hypoxia Inducible Factor
<b>HRE</b>	Hypoxia Responsive Element
<b>HSP</b>	Heat Shock Protein
<b>HUVEC</b>	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer
<b>ICNIRP</b>	International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection
<b>IKK</b>	I Kappa B Kinase
<b>IL-</b>	Interleukine-
<b>ILK</b>	Integrin Linked Kinase
<b>IP3</b>	Inositol triphosphate
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminal Kinase
<b>L1 ou L1CAM</b>	L1 Cell Adhesion Molecule
<b>LARG</b>	Leukemia-Associated Rho Guanine nucleotide exchange factor
<b>LIMK</b>	LIM Kinase
<b>MAPK</b>	Mitogen Activated Protein Kinase

<b>MBS</b>	Myosin Binding Site
<b>MLC</b>	Myosine Light Chain II
<b>MMP</b>	Métalloprotéase matricielle
<b>NFκB</b>	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<b>NIEHS</b>	National Institute of Environmental Health Sciences
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé
<b>PAK</b>	p21 Activated Kinase
<b>PBU</b>	Plunger Box Unit
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PI3K</b>	phosphatidylinositol 3'-kinase
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
<b>PKC</b>	Protéine kinase C
<b>PLCγ</b>	Phospholipase C gamma
<b>RGD</b>	Arginine-Glycine-Acide Aspartique
<b>ROCK</b>	Rho associated coiled-coil-forming protein kinase
<b>ROS</b>	Radical Oxygen Species
<b>RPM</b>	Random Positioning Machine
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
<b>siGTPase</b>	Petit ARN interférentiel ciblant spécifiquement une GTPase
<b>siRNA</b>	Petit ARN interférentiel
<b>TGF-β</b>	Transforming Growth Factor-β
<b>TGF-βRII</b>	Récepteur II du TGF-β
<b>TK</b>	Tyrosine Kinase
<b>TNF-α</b>	Tumor Necrosis Factor-α
<b>UV (-A, -B ou -C)</b>	Ultraviolet (type A, B ou C)
<b>VEGF ou VEGF-A</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>VEGF-R1, -2 ou -3</b>	Récepteur 1, 2 ou 3 du VEGF
<b>VEGFxxx<sub>a</sub></b>	VEGF-A contenant l'exon 8a
<b>VEGFxxx<sub>b</sub></b>	VEGF-A contenant l'exon 8b
<b>WASP</b>	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
<b>Wave</b>	WASP family verprolin homologous

## Préface

Un organisme vivant, tout comme les cellules qui le composent, n'est pas un ensemble hermétiquement clos. Il est au contraire en intime relation avec son environnement et est constamment influencé par différents facteurs. Cette interaction est réciproque et dynamique. Les cellules sont soumises à une grande variété de stimuli extracellulaires tels que les facteurs diffusibles chimiques et biochimiques, des médiateurs biologiques et divers facteurs physiques endogènes ou environnementaux. Parmi les facteurs physiques présents dans notre environnement, les forces mécaniques telle la **gravité**, les radiations, dont les **ultraviolets**, et les **champs électromagnétiques** constituent les trois pôles principaux de nos travaux de doctorat.



Les cellules interagissent avec leur environnement en percevant les signaux chimiques et physiques. Ceux-ci sont transformés en messages biochimiques suivant diverses modalités et voies de signalisation.

La mécano-réception est un des plus anciens processus sensoriels développés par les cellules, en raison du caractère ubiquitaire des signaux mécaniques qui sont présents depuis l'apparition de la vie sur Terre. Tous les organismes vivants ont évolué sur notre planète sous la gouvernance omniprésente de la gravité. La perte du vecteur gravitationnel tel que l'expérimentent les astronautes est donc susceptible d'affecter profondément la physiologie cellulaire.

Lors du passage de la vie aquatique à la vie terrestre au Dévonien (-400 Ma), les organismes vivants ont été exposés aux radiations ultraviolettes (UV) qui sont davantage présentes dans l'atmosphère que dans l'eau de mer, les contraignant ainsi à développer des stratégies pour se protéger de leurs effets délétères.

Finalement, les champs électromagnétiques (EMF) alternatifs introduits et générés par la civilisation industrialisée du XX<sup>ème</sup> siècle pourraient avoir des effets nocifs sur la santé et préoccupent une frange de la population et de ses dirigeants.

Le fil rouge de l'exposé de ce travail n'est pas chronologique, mais suit un ordre dicté par le développement de technologies et modèles expérimentaux et leur mise en application dans les programmes de recherche poursuivis dans le laboratoire et auxquels nous avons participé. La première partie de ce travail aborde l'étude des effets biologiques de la perte du vecteur gravité au cours de vols spatiaux, suivie par la mise au point d'un système expérimental d'analyse de flux calciques adéquat pour l'étude des effets d'expositions brèves à la microgravité, telles que rencontrées au cours de vols paraboliques. Dans la deuxième partie de notre mémoire, ce même système d'analyse de mouvements calciques fut également mis à profit pour l'étude de cellules soumises à des champs électromagnétiques. Nous avons ensuite exploré l'impact potentiel des EMF sur les effets délétères des UV-B. Cette phase expérimentale nous a amené à une découverte inattendue qui fut alors approfondie et décrite dans la troisième et dernière partie du travail.

Bonne lecture.

## ***PARTIE I : MÉCANOBIOLOGIE ET MICROGRAVITÉ***



## ***Introduction***

La révolution génoprotéomique que viennent de connaître la biologie et la médecine a laissé peu de place à la mécanobiologie. Dès l'origine des recherches biomédicales modernes, les forces mécaniques ont pourtant été considérées comme des régulateurs déterminants dans le développement et la physiologie des organes, ainsi qu'en témoigne la fameuse loi de Wolff, publiée en 1892, décrivant la capacité de l'os à adapter sa taille et sa forme aux contraintes mécaniques auxquelles il est soumis. Ces trois dernières décades ont cependant vu ressurgir un intérêt pour la mécanorégulation, non seulement au niveau des organes et des tissus, mais également au niveau de la cellule et des interactions qu'elle entretient avec son environnement matriciel. Elle est reconnue aujourd'hui comme étant aussi puissante que la régulation opérée par les signaux diffusibles avec lesquels elle coopère. Les mécanismes mis en jeu dans ces processus font l'objet d'intenses recherches et sont de mieux en mieux compris au niveau cellulaire et moléculaire.

Le champ gravitationnel est une force vectorielle permanente qui a gouverné l'évolution de tous les organismes depuis l'apparition du Vivant. La réduction quasi totale de la gravité expérimentée par les spationautes au cours de vols orbitaux s'accompagne d'une série de problèmes médicaux dont les plus connus et étudiés sont une perte rapide de tissu osseux et de masse musculaire ainsi qu'une réduction des défenses immunitaires, mais dont les causes sont toujours hypothétiques.

Les programmes de biologie spatiale poursuivis par notre laboratoire depuis plus de quinze ans, et auxquels j'ai participé au cours de ces quatre dernières années, visent à identifier les processus cellulaires perturbés en microgravité, sur base des connaissances en mécanobiologie issues de travaux de nombreux laboratoires, dont le nôtre. Celles-ci sont résumées dans la suite de cette introduction.

## **1. Les forces mécaniques jouent un rôle critique dans le développement et l'homéostasie tissulaire**

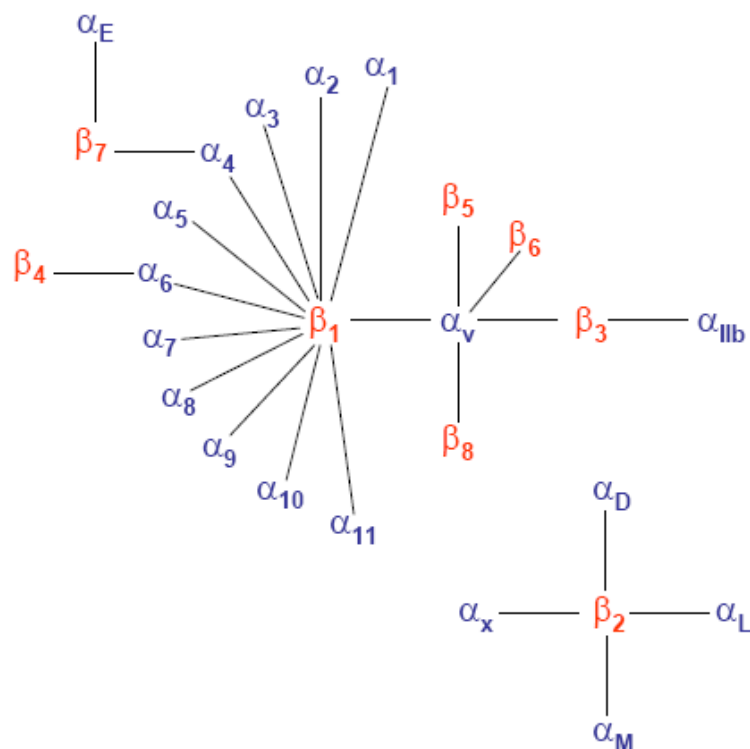
De nombreuses études ont montré que, durant le développement embryonnaire, la morphogenèse tissulaire était sous un strict contrôle mécanique au travers des interactions entre les cellules et leur environnement matriciel (1). Les forces mécaniques sont également largement impliquées dans la régulation d'une variété de fonctions physiologiques chez l'adulte. Dans le système vasculaire, la pression et les forces de cisaillement du flux sanguin influencent la morphologie et la fonction du cœur et des vaisseaux. L'ouïe et le toucher dépendent largement de neurones sensibles à la pression. L'os et le cartilage sont des tissus affectés directement par les forces mécaniques, tels que le poids, la tension des contractions musculaires ou les forces de compression. L'immobilisation prolongée chez l'Homme et l'animal conduit à une perte de masse osseuse et musculaire (2). De nombreuses pathologies susceptibles d'affecter pratiquement tous les organes et tissus ont des étiologies et/ou des manifestations cliniques en relation avec la biomécanique (3,4).

Les signaux mécaniques ont un rôle biologique significatif dans de nombreux processus cellulaires, tels que la mitose, la différenciation, la survie et l'expression génomique (5-8). Les cellules y répondent de façons très variées en fonction de leur type et de leur micro-environnement, mais aussi en fonction de l'amplitude, de la direction et de la distribution des forces mécaniques (9). Par exemple, la compression mécanique des chondrocytes est connue pour moduler la synthèse des protéoglycans (10,11). Les forces de cisaillement qui s'exercent sur des cellules endothéliales stimulent le relargage d'hormones, activent des canaux membranaires et induisent une vague de calcium intracellulaire ainsi qu'un renforcement du cytosquelette (12-14).

## **2. La mécano-réception, la mécano-transduction et la mécano-réaction au niveau cellulaire et moléculaire**

Il est connu de longue date que certaines cellules dites « spécialisées » ou « professionnelles » possèdent des mécanorécepteurs. C'est le cas des statolithes, structures denses présentes dans les cellules de la pointe racinaire et impliquées dans le gravitropisme des végétaux. Les otolithes sont des formations calcaires denses présentes dans l'appareil vestibulaire de l'oreille interne et responsables du maintien de la posture

orthostatique. Comme dans toute structure tri-dimensionnelle, les contraintes mécaniques sont transmises au travers d'éléments qui sont physiquement interconnectés. Il est maintenant bien admis également que des cellules « non-professionnelles » telles que les cellules des tissus conjonctifs (fibroblastes, ostéoblastes et ostéocytes, cellules musculaires lisses, cellules endothéliales, myofibroblastes) perçoivent les signaux mécaniques propagés par le réseau polymérique tri-dimensionnelle de la matrice extracellulaire (ECM). Cette perception est réalisée au niveau des sites d'interactions physiques par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires dont les plus ubiquitaires et les mieux caractérisés sont les intégrines. Les intégrines forment une grande famille de récepteurs impliqués dans l'adhésion cellulaire (15). Ce sont des molécules hétérodimériques formées d'une sous-unité alpha ( $\alpha$ ) et une sous-unité beta ( $\beta$ ) associées de façon non-covalentielle. Les deux sous-unités sont des protéines transmembranaires comprenant un large domaine extracellulaire et, pour la plupart, un court domaine cytoplasmique (16,17). Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont au nombre de 18 et de 8, respectivement, pouvant s'associer en 24 combinaisons différentes dont la moitié contient la sous-unité  $\beta_1$  (figure 1). Les intégrines se lient à des composants spécifiques de l'ECM par leur domaine extracellulaire et sont connectées par une courte séquence intra-cytoplasmique à des protéines de structure et de signalisation formant des complexes focaux dans lesquels sont ancrées les fibres d'actine. Ces structures forment un continuum physique entre l'ECM et le cytosquelette, et sont les sites privilégiés de transfert de signaux mécaniques provenant de l'environnement extracellulaire (« outside-in ») mais également de forces intrinsèques générées par le cytosquelette (« inside-out »). Elles sont particulièrement bien organisées dans les cellules en culture sur un support rigide, soulignant l'importance de la résistance mécanique du support dans le contrôle de la dynamique du cytosquelette. De telles structures adhésives existent également in vivo (18-20).



**Figure 1 : Organisation de la famille des intégrines (21).** Les intégrines sont formées de l'association hétérodimérique d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ . 18 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  ont été identifiées chez l'Homme, à partir desquelles 24 combinaisons effectives ont été répertoriées à ce jour.

Ainsi que l'illustre le tableau 1, une intégrine donnée est capable de se lier à plusieurs ligands et un ligand déterminé peut être reconnu par plusieurs intégrines (22,23). Initialement, les intégrines étaient uniquement décrites comme des récepteurs aux constituants de la matrice extracellulaire et aux protéines d'adhésion. Le répertoire des molécules qu'elles sont capables de fixer s'est largement étendu et inclut notamment des facteurs de croissance, des métalloprotéases membranaires et des facteurs de coagulation.

Parmi les séquences en acides aminés reconnues par les intégrines, la séquence « RGD » se retrouve dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, dont notamment la fibronectine. Cette séquence RGD se lie à toutes les intégrines impliquant  $\alpha_v$ , aux intégrines  $\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_8\beta_1$  et à l'intégrine plaquettaire  $\alpha_{IIb}\beta_3$ .

Un groupe distinct d'intégrines de la famille  $\beta_1$ , en association avec  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{10}$  ou  $\alpha_{11}$ , reconnaît la laminine et le collagène. Pour ce dernier ligand, la séquence de reconnaissance est GFOGER (24), le site de liaison de la laminine n'étant pas connu. Une autre séquence, présente dans le domaine  $\alpha 1(I)CB3$  du collagène I, à savoir DGEA, a été également décrite

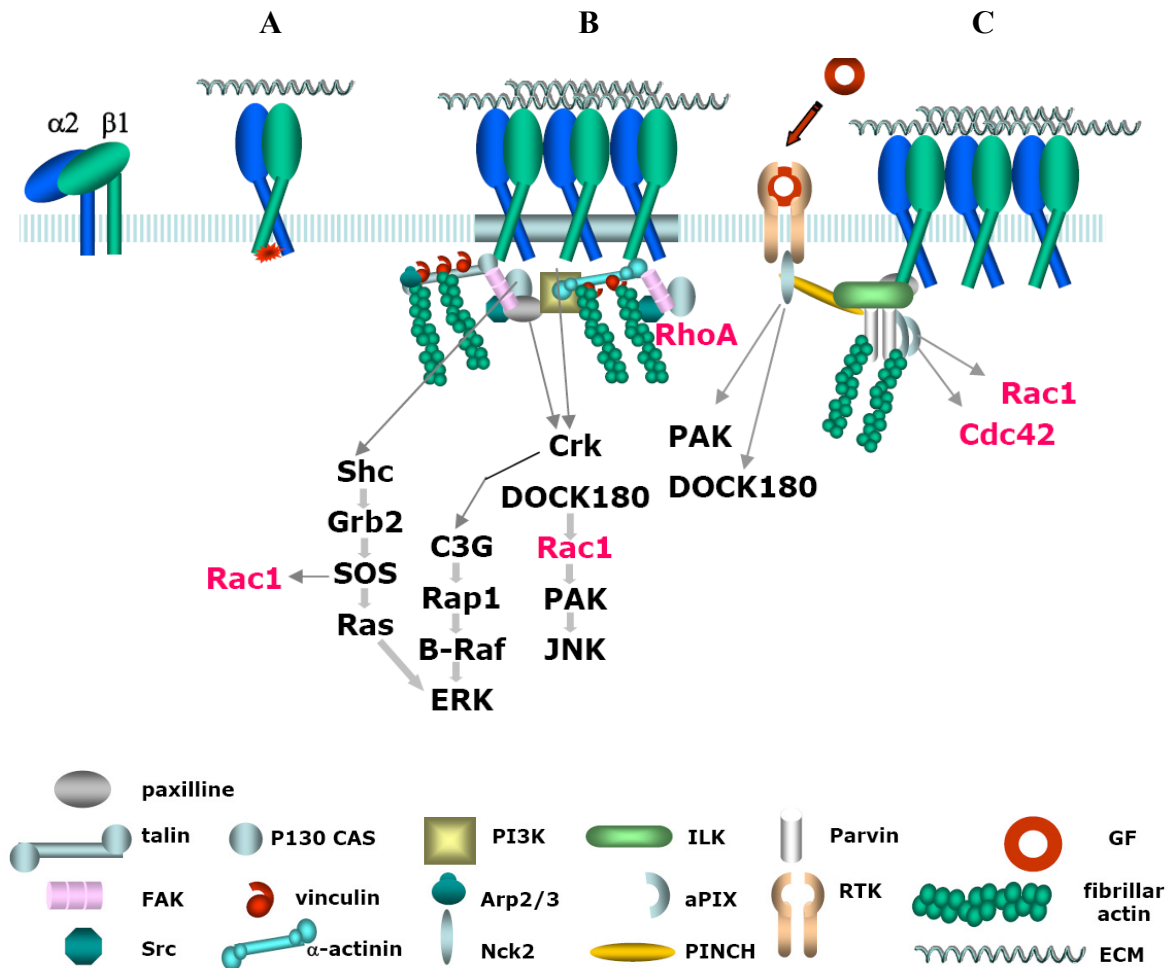
comme un site de reconnaissance pour  $\alpha_2\beta_1$ . Ce peptide utilisé sous forme soluble est capable d'inhiber l'adhésion des plaquettes au collagène de type I (25) et d'interférer avec la signalisation d' $\alpha_2\beta_1$  dans de nombreux types cellulaires.

Sous-unités		Ligands
$\beta_1$	$\alpha_1$	Laminine, collagène
	$\alpha_2$	Laminine, collagène, thrombospondine, E-cadhérine, tenascine
	$\alpha_3$	Laminine, collagène, fibronectine, entactine, thrombospondine, uPAR
	$\alpha_4$	Fibronectine, VCAM-I, ostéopontine, ADAM, ICAM, thrombospondine, CD14, uPAR
	$\alpha_5$	Fibronectine, L1, ostéopontine, fibrilline, thrombospondine, ADAM
	$\alpha_6$	Laminine, thrombospondine, ADAM, uPAR
	$\alpha_7$	Laminine
	$\alpha_8$	Fibronectine, tenascine, nephronectine, vitronectine, ostéopontine, TGF $\beta$ -LAP
	$\alpha_9$	Tenascine, VCAM-I, ostéopontine, uPAR, plasmine, angiostatine, ADAM, VEGF-C et -D
	$\alpha_{10}$	Laminine, collagène
	$\alpha_{11}$	Collagène
	$\alpha_v$	Fibronectine, ostéopontine, TGF $\beta$ -LAP, L1
$\beta_2$	$\alpha_L$	ICAM
	$\alpha_M$	Fibrinogène, facteur X, ICAM, héparine
	$\alpha_X$	Fibrinogène, facteur X, ICAM, héparine
	$\alpha_D$	ICAM, VCAM-I, fibrinogène, fibronectine, vitronectine, plasminogène
$\beta_3$	$\alpha_{IIb}$	Fibrinogène, fibronectine, facteur von Willebrand, vitronectine, thrombospondine, ostéopontine, ICAM, L1
	$\alpha_v$	Vitronectine, fibrinogène, fibronectine, facteur von Willebrand, thrombospondine, fibrilline, tenascine, PECAM-1, BSP, ADAM, ICAM, FGF-2, uPA, angiostatine, TGF $\beta$ -LAP, L1, MMP-2 et -14, ostéopontine, uPAR, plasmine
$\beta_4$	$\alpha_6$	Laminine
$\beta_5$	$\alpha_v$	Vitronectine, ostéopontine, fibronectine, TGF $\beta$ -LAP, BSP
$\beta_6$	$\alpha_v$	Fibronectine, tenascine, vitronectine, TGF $\beta$ -LAP, ostéopontine, ADAM
$\beta_7$	$\alpha_4$	Fibronectine, VCAM, ostéopontine
	$\alpha_E$	E-cadhérine
$\beta_8$	$\alpha_v$	Vitronectine, laminine, TGF $\beta$ -LAP

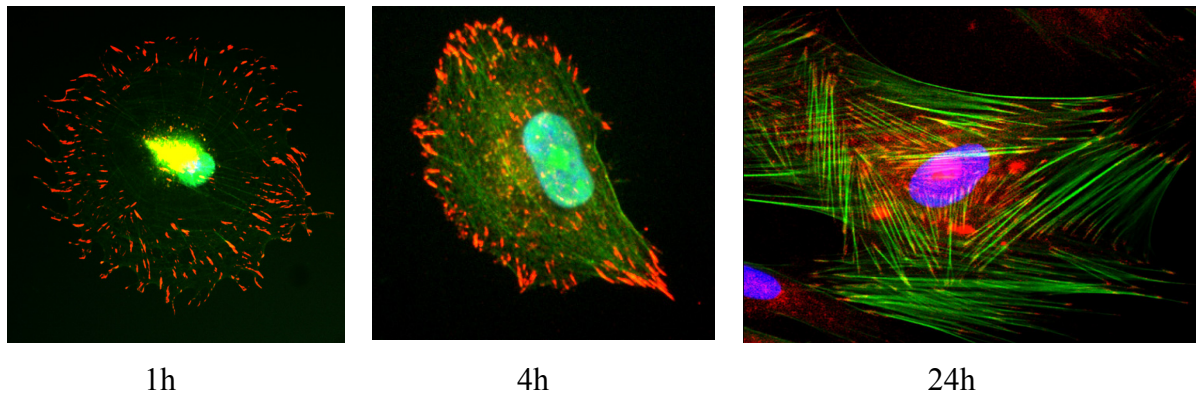
**Tableau 1 :** Tableau récapitulatif des ligands reconnus par les différentes intégrines(26). uPAR: urokinase-type plasminogen activator receptor ; VCAM: vascular cell adhesion molecule; ADAM: A Disintegrin And Metalloproteinase; ICAM: intercellular adhesion molecule; TGF  $\beta$ -LAP: transforming growth factor  $\beta$  latency associated peptide; VEGF: vascular endothelial growth factor; PECAM-1: platelet and endothelial cell adhesion molecule-1; BSP: bone sialoprotein; FGF-2: fibroblast growth factor 2; uPA: urokinase-type plasminogen activator; MMP: matrix metalloproteinase.

Comme illustré schématiquement dans la figure 2, la reconnaissance spécifique des protéines matricielles par les intégrines induit l'activation de ces dernières et leur

regroupement au niveau de microdomaines membranaires (27,28). Elles acquièrent alors la capacité de recruter des protéines de structure intracellulaires capables de se lier à l'actine et/ou de réguler sa polymérisation (29), mais aussi d'interagir avec des protéines de signalisation régulant une cascade d'activation de kinases et de phosphatases (30).



**Figure 2 : Représentation schématique de la signalisation par les intégrines (31).** Les intégrines sont activées par reconnaissance et liaison à leur ligand extracellulaire (A). Elles se regroupent ensuite sous l'effet du stimulus mécanique issu de la matrice et induisent l'association des molécules de structure et de signalisation des adhésions focales, la polymérisation des fibres d'actine et l'activation des voies de signalisation (B). Les intégrines activées sont également impliquées dans les mécanismes de signalisation issus des récepteurs aux ligands diffusibles (C).



**Figure 3 : Exemple de cinétique de formation des adhésions focales et du cytosquelette d'actine.** Marquage par immunofluorescence des adhésions focales (rouge : anti-vinculine), de l'actine fibrillaire (vert : FITC-phalloïdine) et des noyaux (bleu : bis-benzimide) de fibroblastes ensemencés pendant des temps croissants sur un support de collagène fibrillaire.

La FAK (Focal Adhesion Kinase) est une protéine tyrosine kinase recrutée au niveau des adhésions focales (32). Elle se fixe aux intégrines de manière directe ou via la taline et/ou la paxilline (33,34). Une fois phosphorylée par la Src kinase, elle peut alors fixer de nombreuses protéines de structure (32) qui ancrent davantage les adhésions focales au cytosquelette d'actine (27,35). Par ailleurs, FAK est capable de phosphoryler de nombreuses protéines de signalisation présentes dans les adhésions focales, comme la PI3K, la PLC $\gamma$ , p130Cas, ILK, ... (32). Les récepteurs aux facteurs de croissance peuvent être également localisés au niveau des adhésions focales et interagir avec les intégrines (36,37) via la voie ILK/PINCH/parvin (38). De même, des canaux ioniques et des protéines G ont été localisés dans les adhésions focales. Ces cascades de signalisation aboutissent *in fine* à la modulation de l'activité transcriptionnelle de la cellule.

La formation, la maturation et la maintenance des adhésions focales est un processus dynamique qui est sous l'étroite dépendance de deux types de force : d'une part les tensions endogènes générées par la contraction des microfilaments d'actomyosine sur les structures polymériques de l'ECM au travers des adhésions focales (39) et, d'autre part, les contraintes mécaniques issues de la matrice extracellulaire et contrebalancées par la mise sous tension du cytosquelette (28,40-42). Il est dès lors aisé de comprendre que les propriétés mécaniques de l'environnement péricellulaire, en déterminant l'organisation architecturale du cytosquelette, jouent un rôle crucial dans de nombreuses fonctions vitales de la cellule telles que prolifération, migration, polarisation, différenciation et survie.

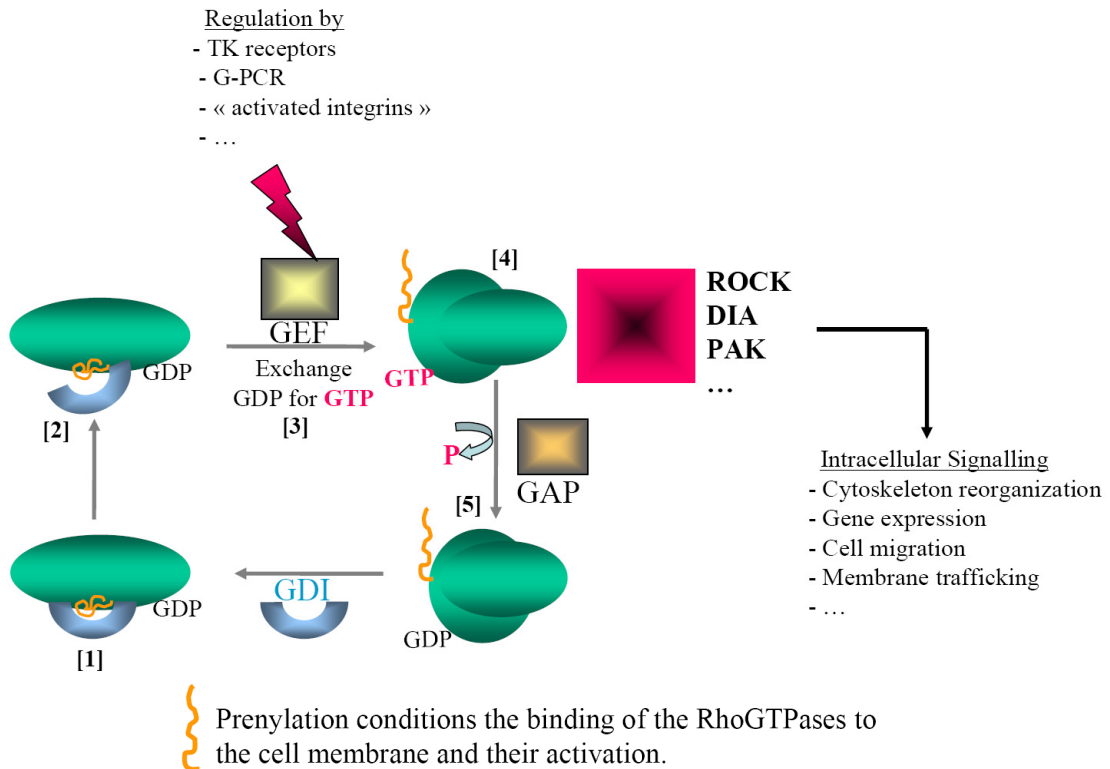
La réaction des cellules à la résistance mécanique de leur support implique que le cytosquelette soit sous un état de pré-stress médié à la fois par les fibres d'actomyosine, les microtubules et les filaments intermédiaires selon le modèle de « tensegrity » proposé par Ingber (43). Des fibroblastes cultivés sur un support rigide, tel un disque de culture, déploient un réseau bien charpenté de fibres de stress (figure 3), se multiplient et produisent des protéines matricielles alors que la production des enzymes de dégradation (MMPs) est largement réprimée. Dans un gel tri-dimensionnel de fibres de collagène flottant librement dans le milieu de culture, les fibroblastes rétractent progressivement le gel. En absence de résistance mécanique de la matrice extracellulaire, la tension interne du cytosquelette se dissipe, ce qui entraîne sa désorganisation. Dans ces conditions, les fibroblastes prolifèrent peu et produisent une grande quantité de MMPs via une boucle autocrine de cytokines pro-inflammatoires telles IL-1 $\beta$  (44) et IL-6 (45). Lorsque le gel de collagène est fixé et sa rétraction empêchée, des contraintes mécaniques s'y développent et offrent ainsi une résistance aux cellules qui acquièrent un phénotype similaire à celui observé sur un support rigide (46). Par ailleurs, si les cellules sont traitées par la cytochalasine D (un inhibiteur de la polymérisation de l'actine), le phénotype des fibroblastes est similaire à celui observé dans un gel librement rétracté (44). Ces données suggèrent que les signaux issus de la relaxation des tensions intracellulaires passent également par les adhésions focales et le cytosquelette d'actine (31). Le cytosquelette et la réciprocity dynamique entre la cellule et son support semblent donc bien être des acteurs majeurs jouant dans la mécano-transduction, c'est-à-dire la conversion d'un signal mécanique en un message biochimique.

### **3. Le cytosquelette et son contrôle par les petites protéines G de la famille Rho**

Le cytosquelette est un réseau composite formé de trois systèmes interconnectés : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ils conditionnent la forme des cellules et leurs fonctions mécaniques majeures telles que adhésion, polarisation, migration, prolifération, survie, apoptose, ou remodelage architectural de l'ECM. Outre leur implication dans les fibres contractiles d'actomyosine (ou fibres de stress), les microfilaments d'actine sont également impliqués dans la formation de protrusions membranaires, tels les lamellipodes et filopodes, et de vésicules d'endo- et d'exo-cytoses. Les microtubules constituent une part essentielle de la charpente mécanique



de la cellule mais sont aussi impliqués dans la formation du fuseau mitotique et dans le transport des organites cellulaires dans la cellule (47). Les filaments intermédiaires stabilisent la forme de la cellule et coordonnent la migration (48). La formation dynamique des fibres d'actomyosine, des réseaux d'actine fibrillaire et des microtubules est très largement régulée par les petites protéines G de la famille Rho, les RhoGTPases, dont les archétypes sont RhoA, Rac1 et Cdc42 (49,50).

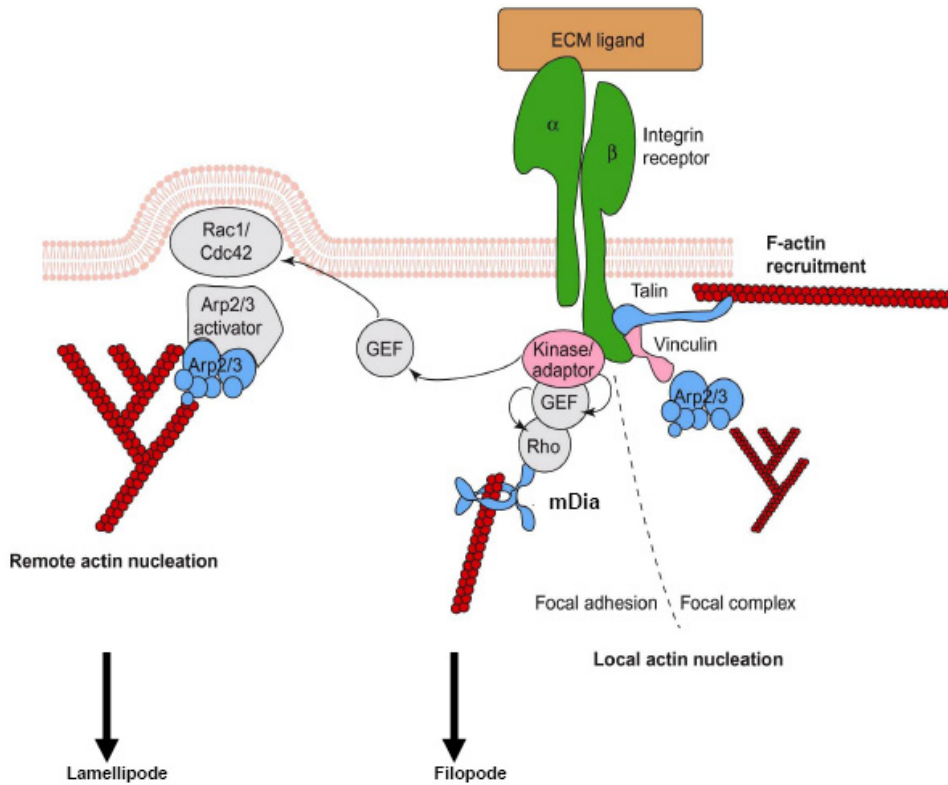


**Figure 4 : Cycle d'activation/inactivation des RhoGTPase (31).** La forme cytoplasmique liée au GDP est inactive et séquestrée dans le cytoplasme par un GDI [1]. La translocation de la RhoGTPase à la membrane [2] permet son activation par échange du GDP par un GTP grâce à un GEF [3]. La forme activée agit alors sur les effecteurs [4] impliqués dans la régulation du cytosquelette et de nombreuses autres voies de signalisation. L'inactivation du complexe s'opère par hydrolyse du GTP en GDP [5] grâce à l'activité GTPase intrinsèque catalysée par une protéine activatrice GAP.

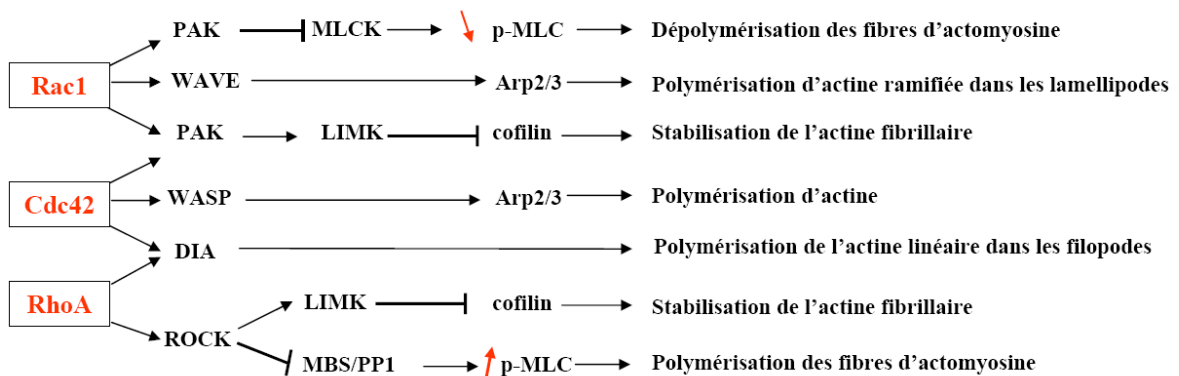
Les RhoGTPases sont des interrupteurs moléculaires binaires participant au relais des signaux induits par les intégrines et/ou les récepteurs aux facteurs solubles vers des voies effectrices de signalisation intracellulaire (figure 4). Sous leur forme inactive associée au GDP, elles sont séquestrées dans le cytoplasme par liaison avec un RhoGDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor). Sous l'effet d'un stimulus externe, elles sont transportées vers la membrane cytoplasmique dans laquelle elles peuvent s'ancrer grâce à

leur séquence C-terminale prénylée. Cette prénylation post-traductionnelle (farnésylation ou géranyl-géranylation) est un élément critique pour l'activation des RhoGTPases au niveau membranaire par l'échange du GDP par un GTP sous l'activité d'un facteur d'échange GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). La RhoGTPase liée au GTP est alors capable d'activer à son tour des effecteurs en aval qui sont des éléments régulateurs-clé de l'organisation et la dynamique du cytosquelette ainsi que des voies de signalisation contrôlant l'expression des gènes, la prolifération et la survie cellulaire. Le cycle est bouclé par désactivation de la RhoGTPase par hydrolyse du GTP en GDP grâce à son activité GTPase intrinsèque catalysée par un facteur d'activation GAP (GTPase Activating Protein).

Une série d'effecteurs contrôlant directement ou indirectement la polymérisation de l'actine sont activés par les RhoGTPases (figures 5 et 6). Le complexe Arp2/3 est activé par Rac1 et Cdc42 par l'intermédiaire des protéines de la famille WASP/Wave (Arp2/3 activator). Il initie la polymérisation de l'actine pour former un réseau ramifié de filaments d'actine notamment dans les lamellipodes au front de migration des cellules. Les formins mDia 1, 2 et 3 induisent l'extension de fibres d'actine linéaires dans les filopodes. Par l'intermédiaire de PAK ou de ROCK, RhoA, Rac1 et Cdc42 activent la LIMK (figure 6) qui inhibe l'activité déstabilisatrice de la cofiline, contribuant ainsi à la stabilisation de l'actine fibrillaire. Par ailleurs, ROCK active l'assemblage des filaments d'actomyosine en phosphorylant directement la myosin light chain (MLC) mais également en inhibant la myosine phosphatase, deux mécanismes conduisant à une phosphorylation accrue de la MLC et aboutissant à la formation des fibres de stress et à une contractilité accrue de la cellule (49) (figure 6). En plus de leur effet sur la dynamique du cytosquelette, les kinases effectrices de Rho participent également à la régulation de la transcription de nombreux gènes au travers des cascades de signalisation des MAPK. Leur implication dans les processus de survie et de mort cellulaire et durant la progression du cycle cellulaire est également bien établie (51).



**Figure 5 :** Différentes voies de polymérisation des fibres d'actine linéaires (filopode) et ramifiées (lamellipode) (29). Les RhoGTPases transmettent les signaux d'activation des intégrines pour réguler la polymérisation de l'actine par le biais des facteurs Arp2/3 et formins (mDia). Des protéines, dont la taline, peuvent connecter directement les filaments d'actine linéaire aux domaines intra-cytoplasmiques des intégrines. Les facteurs de nucléation peuvent aussi être recrutés directement aux complexes focaux via des protéines adaptatrices (vinculine) associées aux intégrines.



**Figure 6 :** Vue simplifiée des effecteurs des RhoGTPases et de leurs implications dans l'organisation du cytosquelette d'actine.

#### 4. La microgravité, perte d'une force permanente unidirectionnelle

L'exploration spatiale a permis pour la première fois à l'Homme de se trouver en conditions d'apesanteur, non pas en raison de son éloignement par rapport à la Terre comme souvent erronément évoqué, mais bien parce que la vitesse de rotation du vaisseau spatial autour de la Terre génère une force centrifuge compensant la force de gravité. Dans les conditions offertes par les navettes américaines, les vaisseaux Soyuz, les capsules non habitées et l'International Space Station (ISS), la gravité est de l'ordre de  $10^{-6}g$ . A côté de ces vaisseaux qui offrent la possibilité de réaliser des expériences de longue durée (jours, semaines, mois), les fusées de type Texius, Maser et Maxus assurent des périodes de faible gravité ( $10^{-4}g$ ) de 6 à 12 minutes. Les vols paraboliques et les « droptowers » offrent quelques dizaines de secondes ou quelques secondes de chute libre ( $10^{-2}g$ ).

Notre laboratoire participe depuis 1995 à des expériences de biologie spatiale (tableau 2) dont le concept a progressivement évolué avec l'état des connaissances et la disponibilité de nouvelles technologies.

Vol	Lanceur	Date	Incubateur	Acronyme de l'expérience
FOTON 10	Soyuz	Février 1995	Biobox 2	FIBRO 2
FOTON 11	Soyuz	Octobre 1997	Biobox 3	FIBRO 3
STS-95	Discovery	Novembre 1998	Biobox 4	HUDERM
ODISSEA	Soyuz	Octobre 2002	Aquarius	RHOSIG
STS-107	Columbia	Janvier 2003	Biopack	CONNECT1
FOTON 12	Soyuz M3	Septembre 2007	Biobox 6	CONNECT2

*Tableau 2 : Liste des missions spatiales organisées par l'ESA/NASA auxquelles a participé le laboratoire.*

La prochaine expérience sélectionnée par l'ESA/NASA est programmée vers 2012 pour être réalisée dans le module européen Columbus récemment envoyé sur l'ISS. Nous avons par ailleurs développé un protocole expérimental pouvant s'appliquer aux vols paraboliques (voir chapitre I.4).

Les opportunités de participation à des missions spatiales étant limitées, des instruments ont été conçus pour modéliser la microgravité sur Terre. Parmi ceux-ci, le clinostat permet une rotation continue lente d'un objet autour d'un axe perpendiculaire au vecteur g. Cet

objet serait donc soumis à une force de 1g dont la direction change constamment, ce qui « annulerait » ses effets. La « Random Positioning Machine » (RPM) est basée sur un changement continu aléatoire du vecteur g. Des informations plus détaillées peuvent être trouvées sur les sites : <http://www.spaceflight.esa.int/users/index.htm> et <http://www.descsite.nl/Frames.htm>.

## **5. Impacts de la microgravité au niveau tissulaire et cellulaire**

Les vols orbitaux induisent chez la plupart des spationautes une réduction significative de la masse osseuse. Celle-ci peut être comparée à l'ostéoporose qui se développe sur Terre, quoique beaucoup plus lentement, chez les personnes âgées ou atteintes de pathologies sédentaires. La réduction de densité osseuse en apesanteur atteint surtout les os porteurs (tibia, fémur, vertèbres, ...) et affecte préférentiellement l'os trabéculaire. Elle se développe rapidement. Après le retour sur Terre, la récupération de la masse osseuse s'effectue lentement (52). D'autres systèmes sont également affectés en microgravité. Une perte de masse musculaire, une dépression immunitaire et des altérations du système vasculaire ont été observées. Outre une redistribution des fluides de l'organisme due à l'apesanteur, d'autres éléments perturbateurs spécifiques aux conditions de vol (radiations cosmiques, stress psychologique, nutrition, ...) peuvent également contribuer aux problèmes de santé rencontrés aux cours de séjours prolongés dans l'espace.

Le poids d'une cellule dans le champ gravitationnel terrestre n'exerce qu'une force minime sur son support, de l'ordre de  $10^{-12}$ N, qui peut sembler négligeable par rapport à la force développée par son cytosquelette ( $10^{-8}$  à  $10^{-7}$ N) (53) ou à la force de tension de surface. L'absence de gravité a cependant des effets sur de nombreux types cellulaires in vitro (31). Outre des effets directs potentiels qui sont discutés plus loin, des effets « indirects » de la microgravité doivent être pris en considération. Parmi ceux-ci, relevons l'absence de sédimentation, de pression hydrostatique et de convection (54) ainsi que des raisons techniques liées à l'obligation d'une contention stricte des liquides. Ces considérations expliquent le développement d'unités de culture spécialement conçues pour éviter ou minimiser ces effets secondaires. Par ailleurs, des effets confondants liés aux délais d'attente, aux accélérations et vibrations subies au cours du lancement et à l'exposition aux radiations cosmiques durant le vol peuvent être minimisés et évalués par l'utilisation de

cultures contrôles soumises à des conditions identiques à bord du vaisseau spatial mais subissant une pesanteur constante de 1g obtenue par centrifugation.

Parmi les effets de la microgravité au niveau cellulaire, des altérations de l'architecture du réseau d'actine et des microtubules sont les mieux documentées. Il a été observé que la microgravité induit dans les ostéoblastes des modifications morphologiques du cytosquelette d'actine, un accroissement du taux d'apoptose, une réduction de la prolifération (31) ainsi qu'une diminution du nombre d'adhésions focales et du niveau de phosphorylation des protéines de signalisation qui y sont associées (55). Nos propres données obtenues au cours du vol STS-95 montrent les mêmes altérations morphologiques accompagnées d'un accroissement de l'expression de MMP-1 et d'IL-6 (56). Ces deux gènes font partie des marqueurs surexprimés dans des fibroblastes soumis à une relaxation mécanique dans un gel tri-dimensionnel de collagène ou par dislocation du cytosquelette d'actine par la cytochalasine (44,57). Il semblerait donc que les cellules interprètent la microgravité comme une relaxation mécanique. Par ailleurs, la désorganisation des microtubules en microgravité telle qu'elle a été décrite par Tabony (58) et l'équipe de Vassy (59) peut conduire à des altérations de ségrégation chromosomique et de cytokinèse durant la mitose. Dans des expériences de simulation de microgravité en clinostat sur des cellules de gliome, les réseaux d'actine, de filaments intermédiaires et de microtubules sont désorganisés, endéans les 30 premières minutes (60). On observe également des modifications de distribution des intégrines (61) et des contacts focaux (55,62) dans des lignées ostéoblastiques, ainsi qu'une accélération de l'étalement et de la migration des cellules endothéliales (63).

**Il est à l'heure actuelle admis que la perte du vecteur gravité modifie le cytosquelette ainsi que les voies de signalisation et les fonctions cellulaires qui en dépendent. Parmi les hypothèses pouvant expliquer ces altérations, notre laboratoire a proposé d'évaluer l'implication des RhoGTPases.** Ce projet de recherche (RHOCYT) a été sélectionné par des évaluateurs scientifiques internationaux pour être réalisé en 2012 dans le Biolab du module Columbus de l'ISS. Une mission spatiale supplémentaire nous a été accordée par l'ESA en compensation de la perte tragique de la navette Columbia. Il s'agit de la mission FOTON 12 dans le Soyuz M3 réalisée en septembre 2007 qui nous a permis de tester en partie cette hypothèse. Celle-ci a d'ailleurs été confortée par des observations plus récentes dans des expériences de simulation de microgravité en RPM au cours

desquelles des altérations du cytosquelette ont été mises en relation avec une réduction de l'activité de RhoA et pu être réversées par la transfection d'un variant de RhoA constitutivement actif (64). Des effets similaires ont été observés dans des cellules endothéliales bovines après trois jours de microgravité simulée, probablement en relation avec l'inhibition de l'expression de LARG, une GEF de RhoA (65).

Le rôle des RhoGTPases dans la réceptivité et la réactivité des cellules aux signaux mécaniques, y compris la microgravité, a fait l'objet d'une revue récente à laquelle nous avons activement participé : *Nusgens BV, Chometon G, Guignandon A, Ho G, Lambert ChA, Mineur P, Servotte S, Zhang Z, Deroanne C, Eckes B, Vico L, Krieg T, Aumailley M, Lapière ChM (2005) Role of the RhoGTPases in the cellular receptivity and reactivity to mechanical signals including microgravity. J. Gravitational Physiol. 12:P269-P270.*

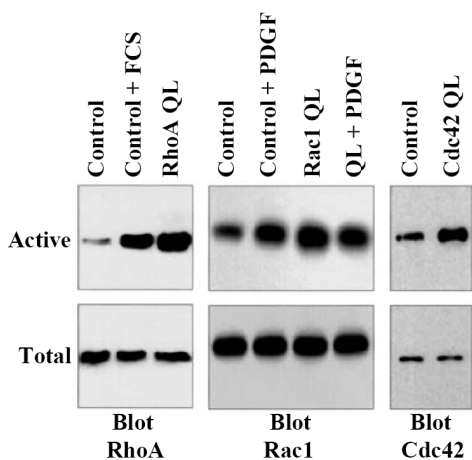
## Résultats

### 1. Développement des modèles cellulaires

Afin d'évaluer le rôle des RhoGTPases dans la mécano-perception et la mécano-réaction, une double stratégie a été mise en place : d'une part la transfection de cellules par un vecteur permettant l'expression de RhoGTPases rendues constitutivement actives par mutation dirigée et, d'autre part, l'inhibition de l'expression de GTPases endogènes par de petits ARN interférentiels (siRNA). Ces cellules ont fait l'objet d'études in vitro par plusieurs membres de notre laboratoire et par les collaborateurs européens participant au programme RHOCYT. Elles constituent un modèle expérimental pertinent pour évaluer le rôle des RhoGTPases dans les processus de réorganisation du cytosquelette observés en microgravité.

#### 1.1. Création et caractérisation d'une lignée fibroblastique exprimant des RhoGTPases constitutivement actives

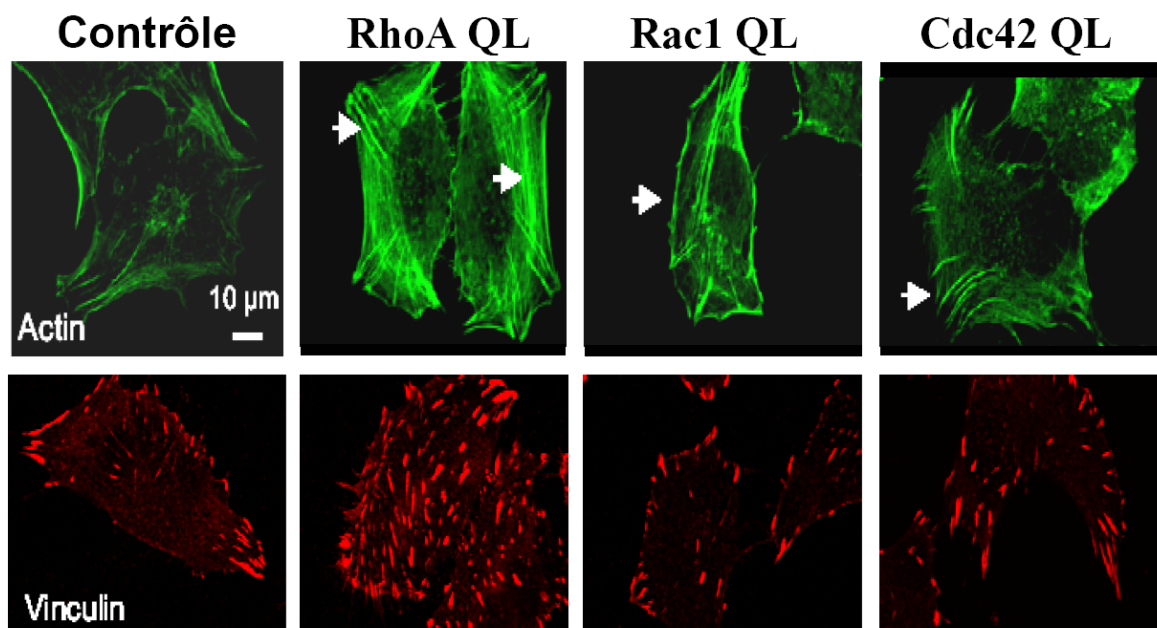
Les cellules fibroblastiques WI-26 ont été transfectées par un vecteur pIRESpuro permettant l'expression d'une forme constitutivement active des trois RhoGTPases étudiées. Cette activation permanente est obtenue en substituant un codon Glutamine (Q63 pour RhoA ou Q61 pour Rac1 et Cdc42) par un codon Leucine (L), ce qui abroge l'activité



**Figure 7 : Caractérisation des cellules WI-26 QL par pull-down (66).** Le clone sélectionné pour chacune des RhoGTPases exprime la forme active à un niveau égal ou supérieur à celui obtenu en stimulant les cellules de type sauvage (Control) par un activateur connu (sérum (FCS) ou PDGF).



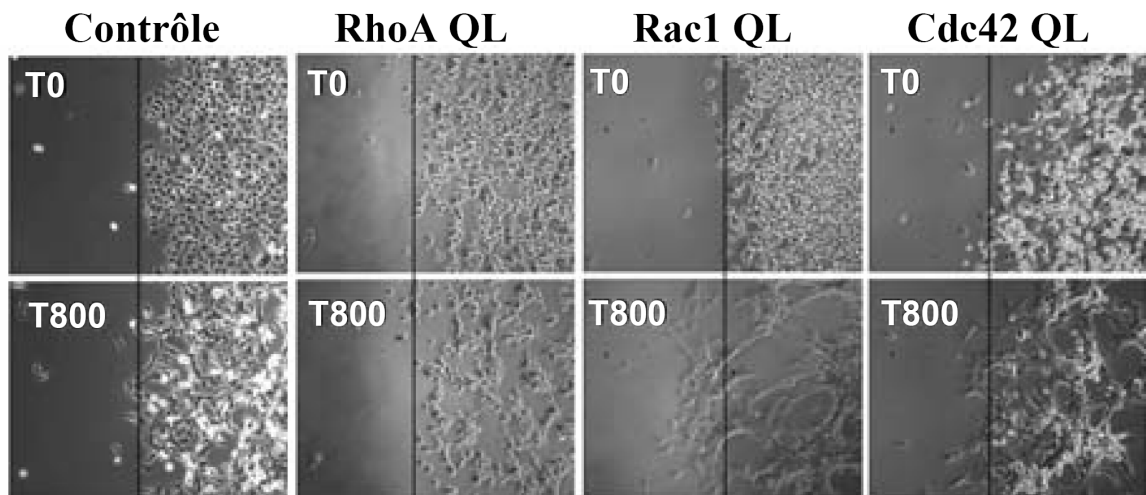
GTPase intrinsèque de l'enzyme (66) et la maintient donc dans un état actif associé au GTP. Les clones cellulaires les plus pertinents ont été choisis sur base notamment d'expérience de pull-down (figure 7) qui permettent d'évaluer le niveau d'activation des RhoGTPases. Ces clones ont été analysés au niveau morphologique (66,67) et en termes d'adhésion, de migration et de propriétés contractiles (67). L'expression de la forme active de type QL n'altère ni la viabilité ni la prolifération, mais affecte bien la morphologie des cellules (66). Une présence accrue de filopodes et de lamellipodes est observée dans les cellules exprimant respectivement Cdc42 QL et Rac1 QL, tandis que les RhoA QL présentent de nombreuses et robustes fibres de stress d'actine (figure 8). Le marquage par un anticorps anti-vinculine permet d'observer que les RhoA QL présentent de nombreuses plaques d'adhésions focales de grande taille et réparties de façon uniforme tandis que les adhésions focales des Rac1 QL et des Cdc42 QL se distribuent plus en périphérie cellulaire et sont moins nombreuses.



**Figure 8 :** Actine fibrillaire et adhésions focales dans les WI-26 de type sauvage (Contrôle) ou exprimant RhoA QL, Rac1 QL ou Cdc42 QL (67). Les cellules ont été ensemencées sur une lamelle de verre et cultivées durant 24h. Après fixation, les fibres d'actine sont colorées par la phalloïdine-FITC (vert) et les adhésions focales détectées par un marquage de la vinculine à la rhodamine (rouge). Les flèches indiquent les fibres de stress dans les RhoA QL, les lamellipodes dans les Rac1 QL et les filopodes dans les Cdc42 QL.

La cinétique d'adhésion sur différents supports matriciels est significativement plus rapide pour les WI-26 Cdc42 QL que pour les autres lignées modifiées qui se comportent comme les cellules sauvages. Le nombre accru de cellules WI-26 Cdc42 QL adhérentes aux temps

courts est probablement dû à leur propension à former des filopodes et à s'associer en grappes de cellules interconnectées. En terme de migration cellulaire (figure 9), il est manifeste que les WI-26 Rac1 QL sont plus mobiles que les cellules contrôles et les WI-26 Cdc42 QL, en accord avec la formation soutenue de lamellipodes, et que les WI-26 RhoA QL ne migrent quasiment pas, probablement en raison de la densité de fibres de stress d'actine.

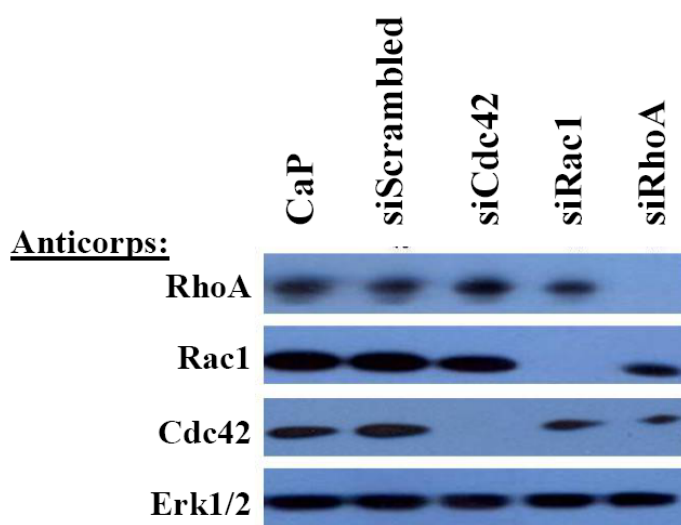


**Figure 9 : Migration des WI-26 RhoA QL, Rac1 QL et Cdc42 QL et des cellules sauvages (Contrôle) (67).** La migration est enregistrée durant 800 min par time-lapse vidéo (1 photo toute les 10 min). La première photographie (T0) ainsi que la dernière (T800) sont montrées.

Ces études préliminaires à l'utilisation de ces cellules dans des expériences de microgravité démontrent que la morphologie, les interactions cellule-matrice et la migration sont modulées de façon pertinente dans les cellules exprimant les formes activées (QL) de nos trois GTPases d'intérêt.

### **1.2. Inhibition des RhoGTPases par ARN interférentiel (siRNA)**

L'expertise acquise par un des membres de notre laboratoire (C. Deroanne) dans l'extinction de l'expression des RhoGTPases par ARN interférentiel (68-72) a été mise à profit dans le cadre de nos travaux. La transfection des siRNA spécifiques à chacune des trois RhoGTPases, par précipitation au phosphate calcique durant 18h, réprime de façon efficace et spécifique l'expression de la protéine ciblée (figure 10). Les cellules contrôles sont des WI-26 transfectées par un siRNA de séquence aléatoire (siScrambled) et ne ciblant aucun ARNm connu comme le prouvent les recherches bioinformatiques et les analyses par microarray réalisées dans notre laboratoire (70).



**Figure 10 :** Western blot représentatif de l'inhibition spécifique des RhoGTPases ciblées par les siRNA. Les blots sont révélés par un anticorps anti-RhoA, -Rac1 ou -Cdc42. Un anticorps anti-Erk1/2 est utilisé pour contrôler la quantité totale de protéines déposée sur le gel.

Dans nos conditions expérimentales, l'inhibition de l'expression d'une des trois GTPases étudiées n'induit pas de modification significative du niveau d'expression des deux autres GTPases (figure 10 et référence (71)). Nous avons également démontré que cette répression est maintenue jusqu'à 7 jours après transfection par les siRNA (Ho, *Role of small GTPase of the Rho family in the mechanical functions of human fibroblasts : evaluation using small interfering RNAs*, mémoire de DEA, 2004) et que les cellules transfectées peuvent être congelées dans l'azote liquide et remises en culture sans perte de viabilité et sans affecter ni la spécificité ni l'ampleur des inhibitions, conditions particulièrement favorables pour répondre aux contraintes des vols spatiaux (Lambert ChA, Deroanne C, Servotte S, Mineur P, Lapière ChM and Nusgens BV (2005) *Cell survival and preservation of siRNA-mediated protein knock-down upon serum-free cryopreservation (-80°C)*. *Gravitational and Space Biology* 18: 103-104).

La répression de l'expression de Rac1 et de Cdc42 induit une réduction significative de la proportion d'actine polymérique et des adhésions focales (immunohistochimie et western-blot après une extraction différentielle au NP-40) (Ho, communication personnelle). Aucune modification morphologique n'est induite par la suppression de RhoA. La migration des WI-26 est significativement réduite par l'inhibition de l'expression de Rac1 et Cdc42. La répression de l'expression de RhoA ne modifie pas la vitesse de migration par rapport aux cellules contrôles SiScrambled (Ho, DEA, 2004).

Il peut paraître étonnant que la suppression de l'expression de RhoA n'entraîne pas de modification significative du cytosquelette d'actine. Cette observation doit être mise en relation avec des études récentes issues du laboratoire visant à évaluer le rôle respectif des trois homologues RhoA, RhoB et RhoC dont l'effecteur commun est ROCK. Il ressort de ces études que la désorganisation complète du réseau de fibres de stress d'actine nécessite la suppression simultanée de RhoA, RhoB et RhoC et qu'il existe des mécanismes de compensation entre ces trois molécules homologues (70).

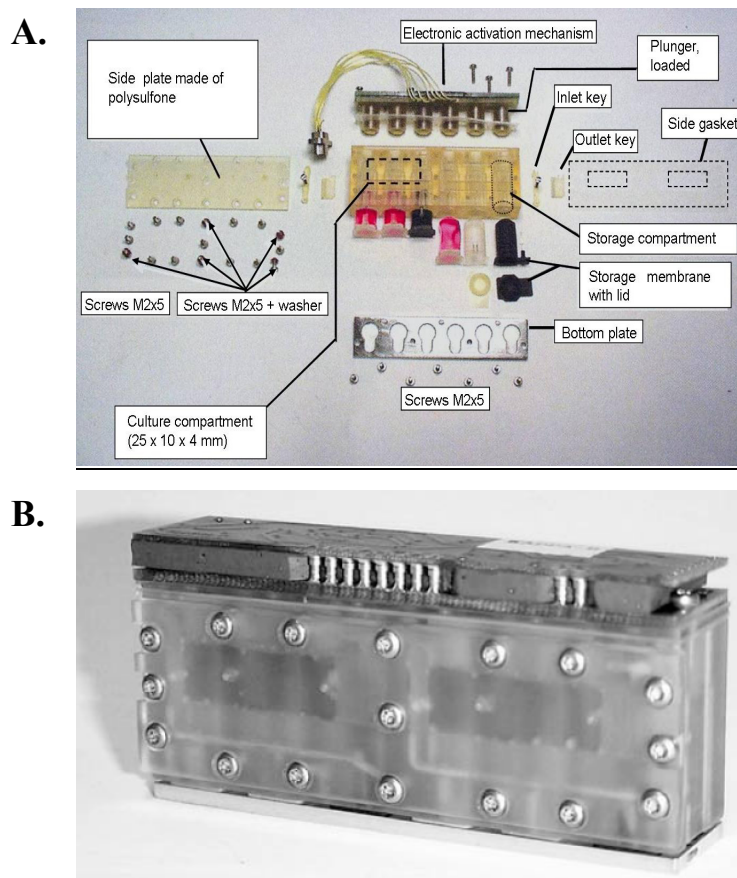
## **2. Sélection de l'expérience CONNECT pour un vol spatial dans une capsule non-habitée lors de la mission FOTON-M3**

En janvier 2003, notre équipe a participé au vol spatial STS-107 sur la navette Columbia dont le destin tragique n'est plus à rappeler. Cette expérience CONNECT<sup>1</sup> comportait notamment les différentes lignées WI-26 QL. L'ESA nous a proposé de répéter l'expérience CONNECT au cours d'un vol non habité d'une durée de 12 jours dans une capsule FOTON lancée par un Soyuz depuis Baïkonour. Alors que les conditions de préparation de l'expérience du STS-107 étaient optimales et nous garantissaient un délai très court entre la préparation des échantillons et le lancement de la navette, celles-ci étaient beaucoup moins favorables dans la mission FOTON-M3. Nous avons dès lors dû mettre au point des stratégies expérimentales en réponse à ces contraintes pour en minimiser l'impact sur les cellules. Des informations détaillées sur la mission FOTON-M3 peuvent être trouvées sur [http://esamultimedia.esa.int/docs/foton/foton-m3\\_brochure.pdf](http://esamultimedia.esa.int/docs/foton/foton-m3_brochure.pdf).

### **2.1. Les unités de culture « Plunger Box Units » (PBU) et l'incubateur BIOBOX-6**

Des unités de culture (figure 11) ont été spécialement conçues par une firme spécialisée (Center for Concepts in Mechanotronics, CCM, Nuenen, Pays-Bas) pour réaliser des expériences de biologie cellulaire en microgravité. Les PBUs comportent deux chambres de culture d'une surface de 2,5 cm<sup>2</sup> pour un volume d'1ml. Chaque chambre est reliée à trois réservoirs contenant des membranes souples de silicone ou de viton remplies de fluides (milieu de culture, solution de fixation ou de lavage). Les fluides sont expulsés de ces réservoirs souples vers les compartiments de culture par le déclenchement d'un ressort puissant maintenu sous tension par un fil de nylon. Celui-ci peut être brûlé par une impulsion électrique (mini pyrocutter), libérant ainsi le ressort selon une programmation

prédéterminée. Lorsque le fluide du réservoir arrive dans la chambre de culture, il propulse le milieu de culture au travers de capillaires vers le réservoir de stockage nouvellement libéré. L'assemblage et la fermeture de ces unités complètement étanches sont réalisés de façon stérile sous hotte, toutes les pièces des PBU's étant stérilisées individuellement au préalable par autoclavage. Les PBU's sont des systèmes complètement automatiques que nous avons utilisés à plusieurs reprises lors de missions précédentes. Ces PBU's sont insérés dans des boîtiers qui sont connectés au système d'activation préprogrammé contrôlé par des microprocesseurs.

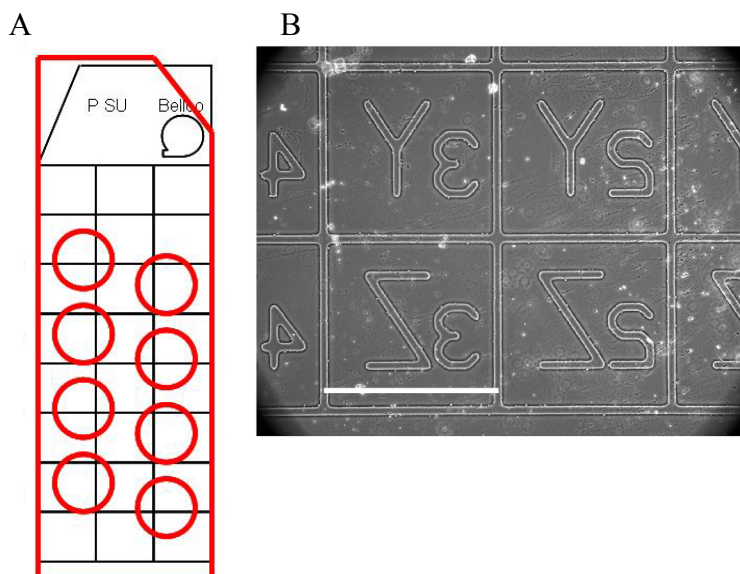


**Figure 11 : Les PBU's avant (A) et après (B) assemblage.** Chaque compartiment de culture est relié à trois réservoirs contenant les fluides. Le transfert des solutions s'effectue via le déclenchement d'un ressort à un temps d'activation préprogrammé sous le contrôle de microprocesseurs. Dimensions: 80 x 40 x 20 mm. Poids approximatif : 125g.

Le BIOBOX-6 est une nouvelle version d'un incubateur programmable développé pour la biologie cellulaire spatiale par Astrium. Cette nouvelle version contient, outre les supports statiques (échantillons en microgravité), une centrifugeuse à basse vitesse dans laquelle les cultures contrôles sont soumises à une accélération de 1g tout en subissant par ailleurs les mêmes événements de température, d'hypergravité et de vibrations que les échantillons en microgravité.

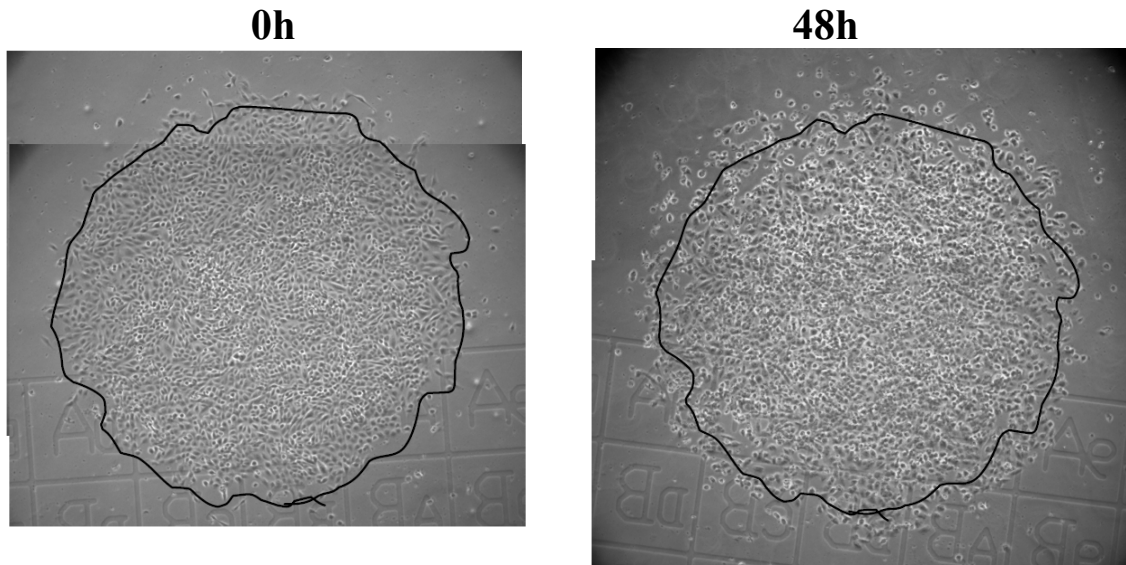
## 2.2. Plan expérimental initial de l'expérience CONNECT

L'espace attribué à notre expérience dans BIOBOX-6 permettait d'utiliser 14 PBUs (= 28 lames de culture) à 0g et 8 PBUs (= 16 lames de culture) à 1g sur la centrifugeuse. Etant donné que nous avons 8 types cellulaires différents à tester (3 QL + 1 type sauvage ainsi que 3 siRNA spécifiques + 1 siScrambled) et que nous souhaitons réaliser des analyses morphométriques et de migration ainsi que des études transcriptomiques, nous avons conçu un modèle expérimental de culture nous permettant de cultiver 8 types différents de cellules sur une seule lamelle grâce à un cache de silicone comportant 8 trous cylindriques de 2mm de diamètre dans lesquels sont ensemencées les cellules (figure 12). Une grille délimitant des carrés de 600 $\mu$ m de côté, identifiés par 2 lettres ou 1 lettre et 1 chiffre, est gravée sur la lamelle et permet de repérer très précisément les différents dépôts de cellules (figure 12B).



**Figure 12 :** A. Représentation schématique d'une lamelle gravée et découpée aux dimensions de la chambre de culture du PBU et d'un cache de silicone (rouge) permettant le dépôt de plusieurs lignes cellulaires sur une même lamelle. Le cache de silicone est retiré avant l'intégration de la lamelle dans les PBUs. B. Photographie d'une lamelle gravée qui permet de situer précisément l'emplacement de chaque lignée cellulaire. Barre = 600 $\mu$ m.



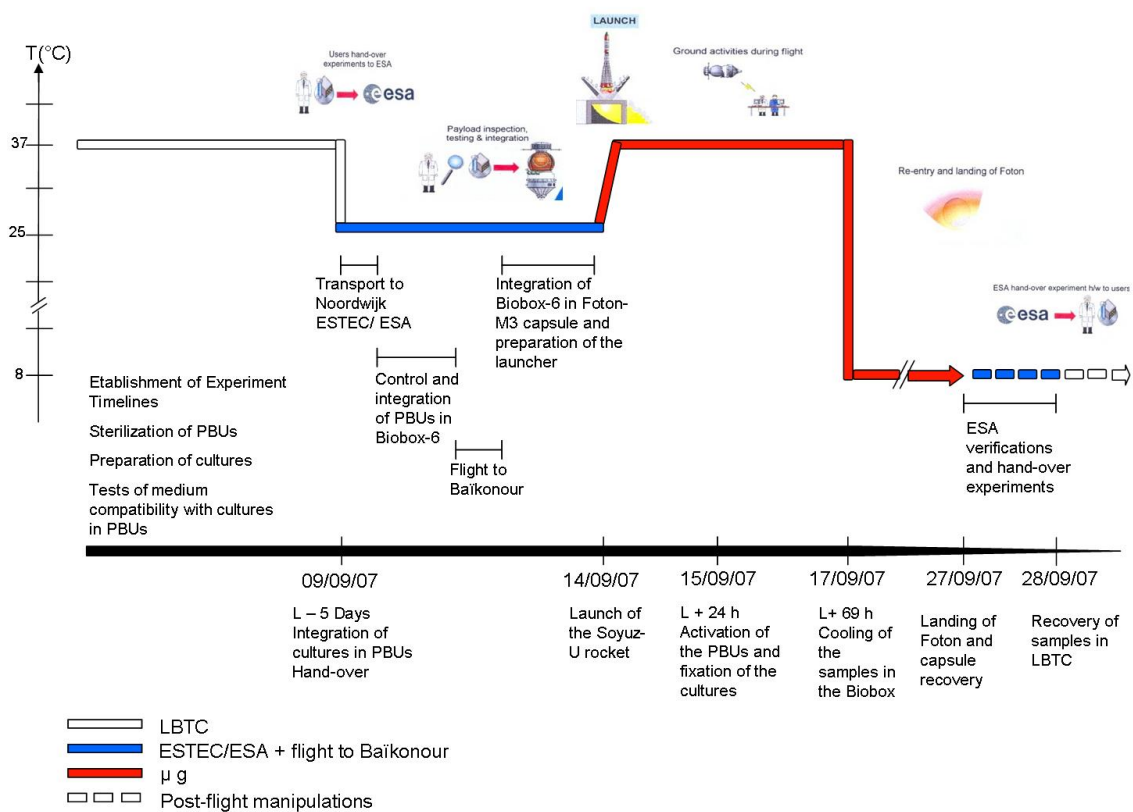


**Figure 13 : Illustration de la migration de WI-26 sauvage sur la lamelle gravée.** Les cellules sontensemencées dans un trou du cache de silicone. Après 24h d'adhésion, le cache est retiré et les cellules sont photographiées. La ligne noire délimite la surface occupée par les cellules dès le retrait du cache de silicone. Les cultures sont ensuite conservées durant 5 jours à 25°C. La température est alors portée à 37°C ce qui définit le temps 0h pour le test de migration. 48h plus tard, l'expérience est arrêtée et les différents dépôts cellulaires sont à nouveau photographiés. La migration des cellules est clairement observée et peut être quantifiée. Les analyses morphologiques sont ensuite réalisées.

Ce modèle expérimental optimisé devait nous permettre d'analyser l'organisation du cytosquelette et des adhésions focales dans les diverses lignées mais aussi d'évaluer l'effet de la microgravité sur leur migration (figure 13). En parallèle à ces analyses morphologiques, des analyses transcriptomiques avaient été également prévues à partir des différents types de cellulesensemencées cette fois sur l'ensemble de la surface de la lamelle afin d'accroître la quantité d'ARN disponible.

### **2.3. Stratégies expérimentales en réponse aux contraintes du vol FOTON-M3**

Ainsi que l'illustre la figure 14 représentant les différentes phases de la mission FOTON-M3, un délai de cinq jours était le temps requis entre l'intégration des cellules dans les PBUs, qui était réalisé à Liège, et le lancement effectué à Baïkonour. Ce délai était nécessaire au transport des PBUs de Liège à l'ESTEC (Noordwijk, Pays-Bas) afin d'y être contrôlées et qualifiées avant leur intégration dans l'incubateur BIOBOX-6, au trajet jusqu'à Baïkonour (Kazakhstan) avec passage à la douane russe à Samara (Russie), à l'intégration du BIOBOX-6 dans la capsule FOTON-M3 et à la préparation du lanceur



**Figure 14 : Calendrier de l'expérience CONNECT2 réalisée lors du vol spatial de septembre 2007.**

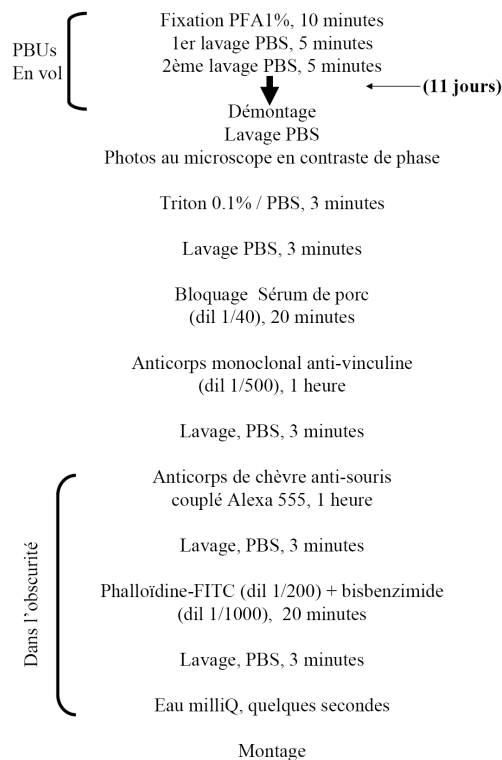
Soyuz. Une autre contrainte était le maintien des cultures à 25°C au cours de ces 5 jours de voyage et lors du lancement. A cette température, les fibroblastes sont dans un état quiescent, ne prolifèrent pas et ne sont que peu sensibles à la courte période d'hypergravité et aux vibrations liées au lancement. Dès la mise en orbite, la centrifugeuse devait être activée et la température de l'incubateur s'élever progressivement jusqu'à 37°C.

De nombreuses simulations des conditions expérimentales, notamment le maintien des cellules à 25°C durant 5 jours puis leur réchauffement progressif jusqu'à 37°C, ont été réalisées au laboratoire. Il est rapidement apparu que ces contraintes entraînaient une souffrance cellulaire se manifestant par une morphologie altérée, des signes d'apoptose et un détachement partiel des cellules. Afin d'y remédier, les milieux de culture ont été progressivement optimisés (faible concentration en glucose, tamponnage à l'HEPES, ...). La durée de l'expérience a également été modifiée et réduite à 24h pour la plupart des cultures au lieu des 72h initialement prévues, ce qui hélas ne permettait plus d'évaluer le processus de migration cellulaire. Il a également été décidé de procéder à des évaluations



au cours du temps afin d'examiner la morphologie des cellules avant (-30 min) et directement après (+15 min) le lancement, puis durant le vol en orbite.

Une autre différence majeure avec l'expérience CONNECT1 du vol STS-107 résultait du fait que BIOBOX-6 hébergeait une expérience complémentaire, d'une durée de 69h, réalisée sur des ostéoblastes (MG-63) transfectés par les siRNA ciblant RhoA, Rac1 et Cdc42 (collaboration avec l'équipe de L. Vico et A. Guignandon, Université de S<sup>t</sup>-Etienne). Nos échantillons devaient donc séjourner à 37°C dans le paraformaldéhyde (étude morphologique) ou le RNAlater (étude transcriptomique) avant que la température de l'incubateur ne soit abaissée à 8°C jusqu'à la récupération des PBU, 11 jours plus tard. Un protocole optimal de fixation a été établi (figure 15) tenant compte de ces multiples contraintes techniques. Il permet de détecter l'actine fibrillaire, la vinculine et les noyaux cellulaires. Il est par ailleurs pleinement compatible avec un procédé d'analyse d'images, mis au point par A. Guignandon (73), à partir duquel la surface cellulaire ainsi que le nombre, la taille et la surface moyenne des contacts focaux peuvent notamment être quantifiés.



**Figure 15 : Protocole expérimental optimisé permettant de détecter simultanément l'actine fibrillaire et la vinculine.**

*PFA : ParaFormAldéhyde ; PBS : Phosphate Buffered Saline ; dil : dilution.*

### 3. Expérience CONNECT dans le BIOBOX-6 au cours du vol Soyuz FOTON-M3 (14 au 26 septembre 2007)

#### 3.1. Plan expérimental

Le nombre de PBUs alloué par l'ESA était de 22, dont 14 en microgravité et 8 dans la centrifugeuse 1g. La lignée WI-26 Cdc42 QL n'a pu être utilisée en raison d'une altération importante de leur viabilité dans les conditions de l'expérience. Pour les autres lignées, le schéma expérimental suivant (tableaux 3 et 4) a été adopté car il permettait de prendre en compte les problèmes liés aux délais imposés (section 2.3) et d'évaluer de manière adéquate les effets potentiels des conditions de culture et de vol (25°C, hypergravité et vibrations lors du lancement).

Etude transcriptomique :

« Types » cellulaires	Arrêt de l'expérience au temps	1g terrestre (n=)	microgravité (n=)	1g centrifugeuse (n=)
sauvage	-30min	1		
	+6h		1	1
	+24h		3	2
siScrambled	+24h		3	2
RhoA QL	+24h		2	2
Rac1 QL	+24h		2	2
siRhoA	+24h		2	2
siRac1	+24h		2	2
siCdc42	+ 24h		2	2

**Tableau 3 : Schéma expérimental pour les études transcriptomiques** détaillant, pour chaque type cellulaire, le nombre de lamelles à 1g terrestre avant le lancement (-30 minutes), en microgravité et à 1g dans la centrifugeuse à bord. Aux différents temps indiqués, le milieu est remplacé par du RNAlater permettant de préserver les ARN jusqu'au moment de leur purification.

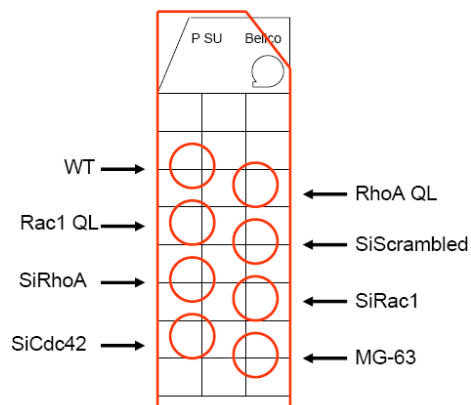
## Analyse Morphologique :

« Types » cellulaires	Temps	1g terrestre (n=)	microgravité (n=)	1g centrifugeuse (n=)
sauvage	-30min	1		
	+24h		1	1
Toutes les lignées	-30min	1		
	+15min		1	
	+3h		1	
	+6h		1	
	+12h		1	
	+24h		1	
	+36h		1	
	+48h		1	

**Tableau 4 : Schéma expérimental pour les études morphologiques** détaillant le type cellulaire (cellules de type sauvage uniquement ou toutes les lignées sous forme de « spots » multiples), et la cinétique de fixation (1g terrestre avant le lancement (-30 minutes), microgravité et 1g dans la centrifugeuse à bord).

### 3.1.1. L -6 (6 jours avant le Lancement)

40.000 cellules/cm<sup>2</sup> ont étéensemencées sur la totalité de la surface des lamelles ou dans les 8 mini-chambres délimitées par le cache de silicone selon une disposition toujours identique (figure 16). Les Cdc42 QL initialement prévues ont été remplacées par une lignée d'ostéoblastes (MG-63) utilisée dans l'expérience OBADIS conduite dans le même incubateur. Les cultures initiales sur lamelles ont été réalisées en double, voire en triple, afin de pouvoir sélectionner les meilleures pour le vol.



**Figure 16 : Disposition des différentes lignées cellulaires dans les 8 mini-chambres délimitées par le cache de silicone.**

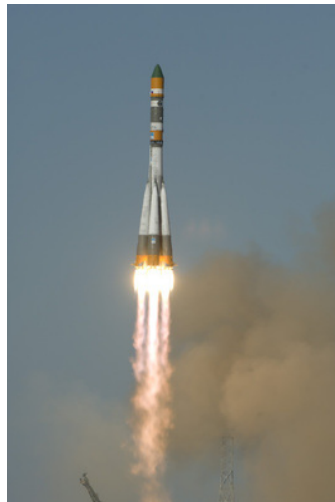
### **3.1.2. L -5.**

Les lamelles contenant les cultures uniques ou les 8 spots individuels sont sélectionnées et photographiées avant d'être intégrées dans les PBUs dont les réservoirs ont été préalablement remplis avec les solutions de fixation et de lavage pour les études morphologiques (respectivement et chronologiquement : PFA 1%, PBS, PBS) ou pour permettre la préservation des ARN pour les études transcriptomiques (RNAlater dans les 3 compartiments).

Neuf PBUs supplémentaires à activation manuelle et dédiées aux analyses transcriptomiques et morphologiques ont été gardées au laboratoire, constituant ainsi des contrôles au sol n'ayant subi ni transport, ni lancement, ni microgravité, mais soumis à des variations identiques de température.

### **3.1.3. L 0.**

La capsule FOTON-M3 a été lancée le 14 septembre 2007 à 11h00 (GMT) pour une mission de 12 jours (figure 17).



*Figure 17 : La capsule FOTON-M3 et lancement de la fusée Soyuz-U du cosmodrome de Baïkonour, le 14 septembre 2007.*

### **3.2. Problèmes survenus durant la préparation des échantillons et le vol spatial**

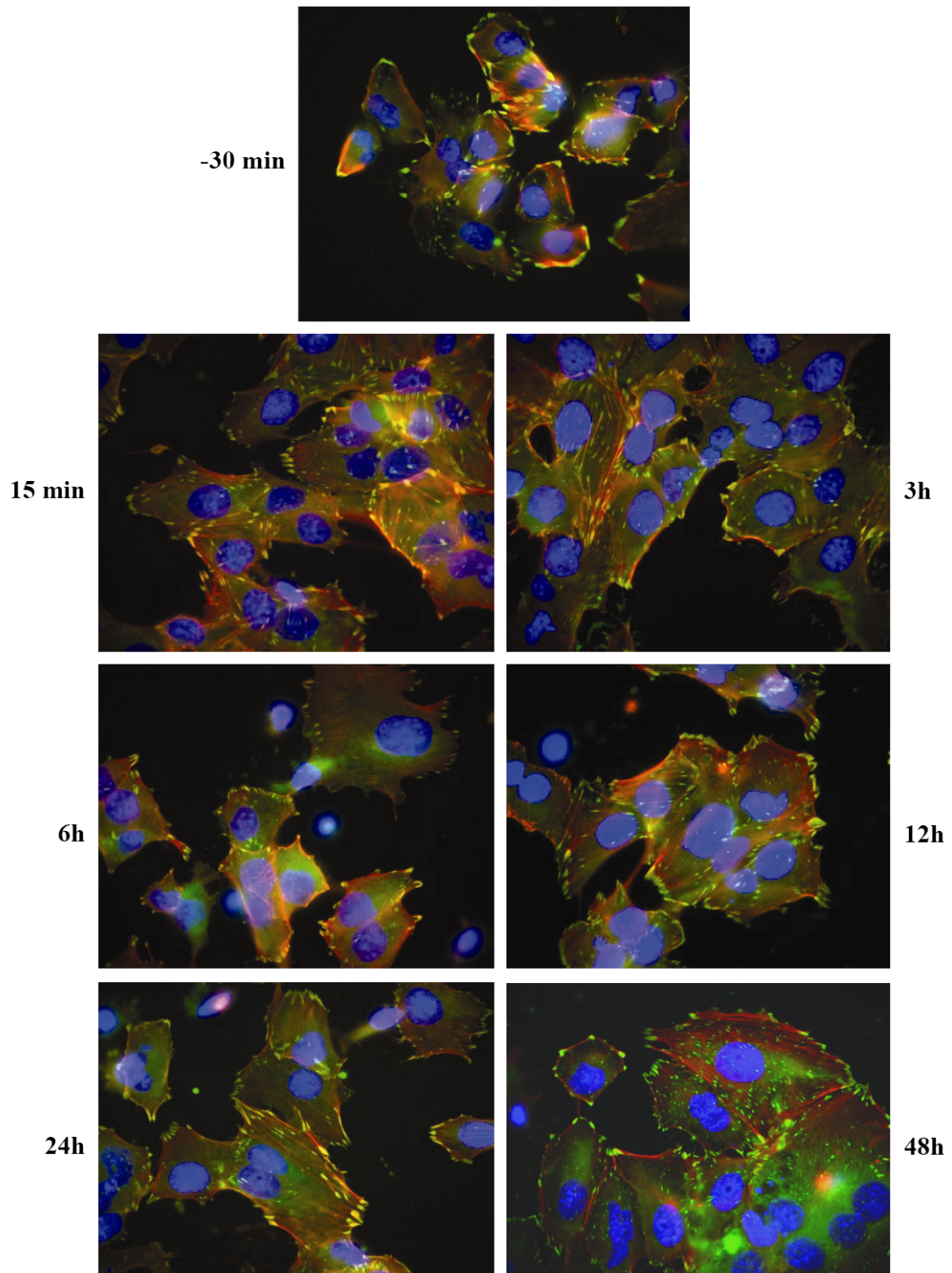
En raison d'une défaillance technique empêchant le fonctionnement de la centrifugeuse au sein du BIOBOX-6, tous les contrôles 1g à bord ont été « perdus », le nombre d'échantillons en microgravité s'en trouvant par conséquent augmenté.

Pour compenser la perte des échantillons à 1g, une expérience similaire à celle du vol spatial a été organisée en octobre 2008 par l'ESA. Les cellules ont étéensemencées et cultivées comme pour le vol spatial, pour être ensuite intégrées dans les PBUs et incorporées dans le BIOBOX-6. Celui-ci a été soumis à des vibrations similaires à celles enregistrées durant le lancement (Laboratoires de V2i S.A., Sart-Tilman) puis transféré dans notre laboratoire et maintenu dans des conditions de températures et de temps identiques à celles du vol spatial de 2007. Il faut toutefois tenir en compte que ces contrôles de remplacement sont loin d'être idéaux car les cellules utilisées au cours de cette expérience ne sont pas contemporaines de celles utilisées en septembre 2007, l'accélération lors du lancement n'y est pas reproduite et les radiations cosmiques sont absentes. Les analyses morphométriques et transcriptomiques de cette série d'échantillons sont en cours.

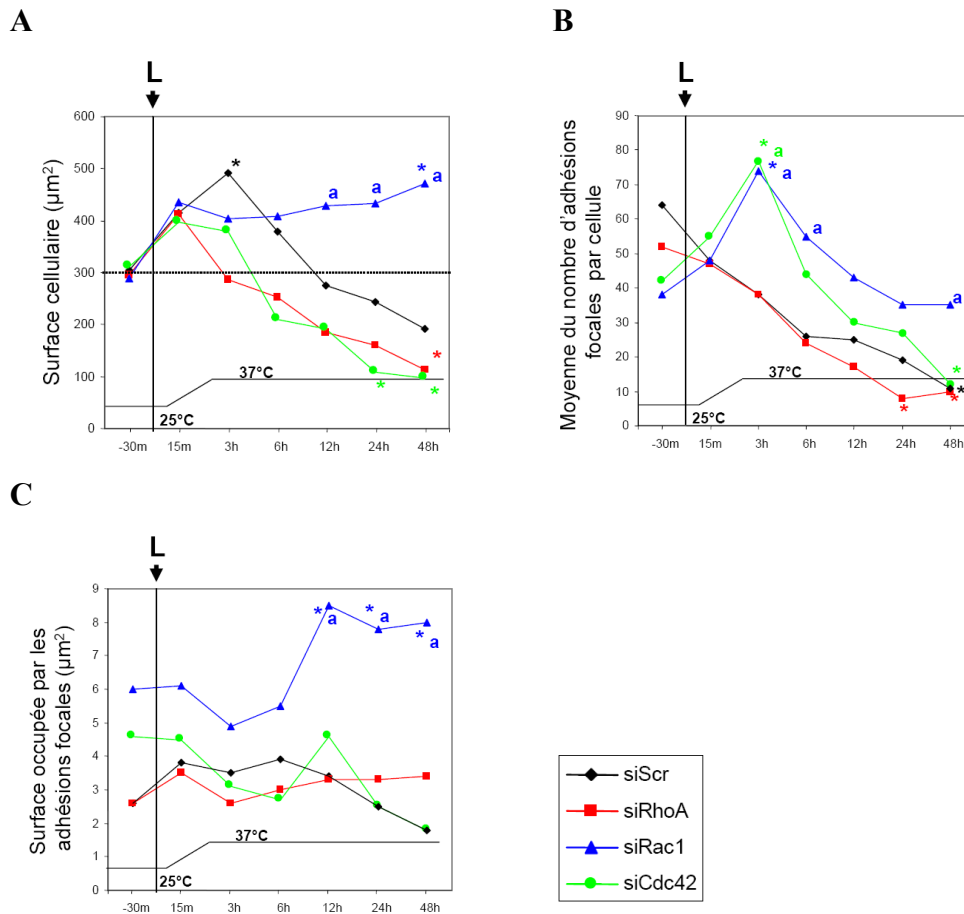
Les résultats actuellement disponibles concernent la comparaison des différentes lignées cellulaires entre elles après leur séjour en microgravité mais aussi l'évaluation de chaque lignée individuelle observée avant le lancement (-30 min) et au cours d'une cinétique de temps durant le vol orbital (+15 minutes à +48h). Les spots contenant les lignées RhoA QL, Rac1 QL et de type sauvage étaient de qualité insuffisante pour une analyse détaillée et informative.

### **3.3. Analyses morphologiques des échantillons pertinents du vol FOTON-M3**

Les paramètres cytologiques décrits précédemment ont été analysés sur la série des cellules transfectées par les siRNA après marquage des adhésions focales, de l'actine fibrillaire et des noyaux. Un échantillonnage représentatif des 700 photographies au microscope à fluorescence est illustré dans la figure 18. Un minimum de 35 cellules a été analysé pour chaque type cellulaire au cours de la cinétique (A. Guignandon, St-Etienne).



**Figure 18 :** Exemple de photographies de WI-26 siRac1 au cours du temps (de -30min à 48h) lors du vol spatial de septembre 2007 (actine fibrillaire en rouge ; vinculine en vert ; noyau en bleu).



**Figure 19 : Evolution de la surface cellulaire (A), du nombre d'adhésions focales (B) et de la surface totale occupée par les adhésions focales (C) avant le lancement (L) et en fonction du temps passé en microgravité. La transition de température de 25 à 37°C se fait entre les temps +10 min (mise en orbite) et 2h. Test statistique ANOVA ONE way suivi d'une comparaison multiple de Bonferroni. a :  $p < 0.01$  vs siScrambled ; \* :  $p < 0.01$  vs le temps -30 minutes de la même lignée cellulaire**

Ainsi que l'illustre la figure 19A, la surface cellulaire des WI-26 transfectées par un siScrambled ou par un siRNA ciblant respectivement RhoA, Rac1 et Cdc42 est très semblable, de l'ordre de  $300 \mu\text{m}^2$ , au temps -30 minutes avant le lancement (L), c'est-à-dire après 5 jours de transport à 25°C. Après la montée en température à 37°C (entre L+10 min et L+ 2h), la surface cellulaire a tendance à augmenter. Elle décroît ensuite rapidement au cours du temps passé en microgravité avec pour seule exception les WI-26 siRac1 dont la surface ne se modifie pas ou croît même légèrement après 48h de microgravité.

Le nombre moyen d'adhésions focales par cellule (figure 19B) décroît en fonction du temps passé en microgravité dans les cellules contrôles et les WI-26 siRhoA. Un accroissement significatif mais transitoire du nombre d'adhésions focales est observé pour les WI-26 siRac1 et siCdc42 sans qu'il ne soit possible de l'attribuer à l'augmentation de

température, aux évènements liés au lancement ou aux conditions de microgravité. Toutefois, seules les WI-26 siRac1 présentent, en fin d'expérimentation, un nombre d'adhésions focales similaire à celui observé à 1g avant le vol. La particularité de ces cellules privées d'expression de Rac1 se manifeste également en microgravité par une augmentation modérée mais significative de la surface totale occupée par les adhésions focales alors que ce paramètre reste inchangé pour les autres cellules (figure 19C). D'autres paramètres, tels la distribution spatiale de l'actine fibrillaire et des adhésions focales, le facteur d'étalement et la polarisation des cellules, sont en cours de quantification.

### ***3.4. Discussion et conclusions.***

Au cours de cette mission, la défaillance technique de la centrifugeuse à bord de la capsule spatiale nous a privé des échantillons contrôles les plus pertinents, notamment pour les études transcriptomiques. En effet, même si une expérience visant à pallier partiellement cette défaillance a été réalisée au sol, elle ne permet de simuler que les vibrations liées au lancement sans prendre en compte certains paramètres tels que l'hypergravité au moment du lancement et les rayonnements cosmiques. Cette expérience contrôlée réalisée a posteriori nous fournira malgré tout quelques éléments de comparaison pertinents pour l'interprétation des résultats et pour la mise au point de nos expérimentations futures. Ces analyses sont en cours.

Grâce au schéma expérimental initialement prévu, les études de cinétique concernant les cellules privées ou non de l'expression de RhoA, Cdc42 ou Rac1 se sont révélées informatives. Ainsi nous avons montré que les cellules contrôles (siScrambled) mais également les cellules privées de l'expression de RhoA et Cdc42 voient leur surface et leur nombre d'adhésions focales décroître en condition d'apesanteur. De façon a priori surprenante, les cellules n'exprimant plus Rac1 semblent échapper à ces altérations.



Parmi les nombreuses interrogations et hypothèses soulevées par nos résultats, deux ont plus particulièrement retenu notre attention.

### **1. Absence d'effet de la suppression de l'expression de RhoA.**

En raison de l'importance connue de RhoA pour l'établissement des adhésions focales et du cytosquelette d'actine, des altérations morphologiques étaient susceptibles d'être observées pour les WI-26 siRhoA. La conservation d'une morphologie inaltérée par rapport aux cellules contrôles trouve peut-être son explication dans l'existence de processus de compensation croisée existant entre RhoA, RhoB et RhoC, récemment mis en évidence dans notre laboratoire pour un certain nombre de types cellulaires (70). Il a ainsi été récemment confirmé que la suppression de RhoA dans les WI-26 induisait une surexpression de RhoB, et dans une moindre mesure, de RhoC (T. Neutelings, communication personnelle). Il est donc possible que la surexpression de RhoB et de RhoC soit capable de prévenir l'altération des adhésions focales et du cytosquelette d'actine en conditions de pesanteur terrestre mais soit insuffisante ou inappropriée pour empêcher leur désorganisation en apesanteur. Ces résultats préliminaires font l'objet d'investigations au sol et devront être prises en compte dans de futures missions spatiales.

### **2. Régulation par Rac1 des adhésions focales et du cytosquelette d'actine.**

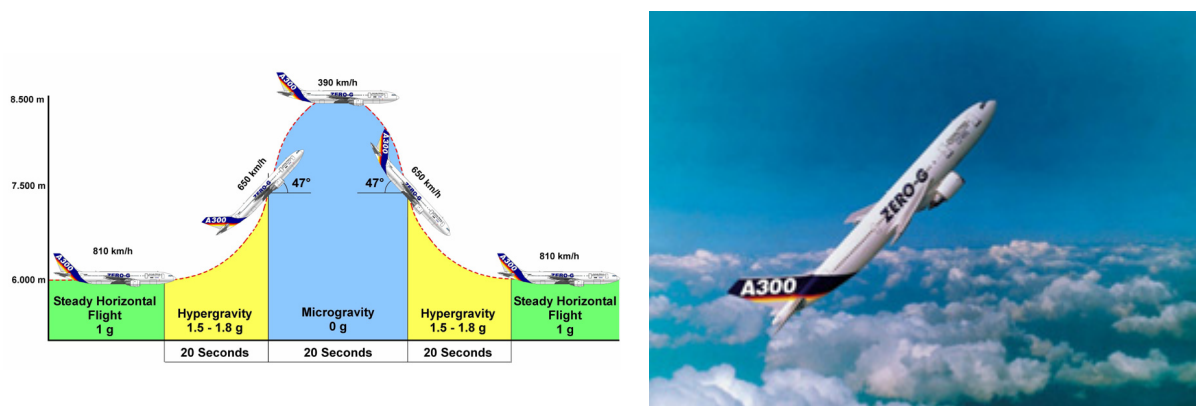
Le maintien des adhésions focales et du cytosquelette dans les seules cellules n'exprimant pas Rac1 était un résultat a priori inattendu sur base des connaissances actuelles. Une première explication tiendrait au fait qu'il existerait un effet antagoniste entre Rac1 et RhoA (74). Dans notre modèle cellulaire, il ne semble pas que l'inhibition de Rac1 soit capable de stimuler l'expression de RhoA (T. Neutelings, communication personnelle). Il nous reste cependant à évaluer la proportion de RhoA, de RhoB et de RhoC présents sous la forme active liée au GTP. Ces mesures par « pull-down », bien que complexes à réaliser, sont effectuées en routine au laboratoire. Il semble toutefois hautement improbable de les envisager au cours d'une mission spatiale. Un autre système d'analyse basée cette fois sur des observations par microscopie à fluorescence (FRET, ...) est une alternative que nous comptons développer et valider pour des missions futures.

Une autre explication à l'effet de la répression de l'expression de Rac1 sur la morphologie cellulaire en apesanteur serait plus indirecte et résulterait de son implication dans la génération de radicaux libres (ROS) en association avec la NADPH oxydase (75,76). Par

ailleurs, les ROS jouent un rôle multifacette dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette d'actine. C'est ainsi que leur production médiée par Rac1 est capable d'inactiver RhoA (77) et de réguler la polymérisation de l'actine (76). A l'inverse, la dépolymérisation de l'actine par relaxation mécanique du cytosquelette induit l'activation de Rac1 et la production de ROS (78). La suppression de Rac1 et de son activité pro-radicalaire au cours de notre expérience spatiale pourrait donc réduire la production de ROS ce qui entraînerait une suractivation de RhoA et la maintenance d'adhésions focales fonctionnelles. Des investigations supplémentaires de ces voies sont requises pour répondre à ces questions.

#### 4. Alternatives aux missions spatiales : les vols paraboliques

Alors que les vols spatiaux permettent de réaliser des expériences de longue durée en microgravité, ils sont cependant coûteux (2.000.000 € / 100 kg de charge), réclament une instrumentation également onéreuse, imposent des conditions expérimentales très contraignantes et leur fréquence est peu élevée. Il est possible d'avoir accès, au cours de vols paraboliques, à des périodes d'apesanteur dans des conditions expérimentales moins contraignantes. Ces périodes de microgravité sont très courtes (25-30 secondes), atteignent des valeurs de  $10^{-2}g$  et sont répétées une trentaine de fois par vol de l'A300 mis à la disposition des expérimentateurs par le CNES à Bordeaux (figure 20). Ces vols paraboliques permettent par ailleurs aux expérimentateurs de tester et de qualifier les instrumentations qui seront utilisées au cours des missions spatiales.



**Figure 20 : Caractéristiques techniques d'un vol parabolique à bord d'un avion Airbus du CNES (France).**

#### **4.1. Développement d'un modèle expérimental compatible avec les vols paraboliques**

La participation à de futures campagnes de vols paraboliques nécessite le développement d'un modèle expérimental faisant appel à des réponses cellulaires à déclenchement rapide. C'est dans ce cadre qu'ont été étudiées les voies de signalisation induites par certains activateurs solubles des intégrines.

La génération de flux calciques figure parmi les réponses cellulaires les plus précoces engendrées par l'interaction entre les intégrines et leur(s) ligand(s) matriciel(s) spécifique(s) (79,80). La séquence minimale de reconnaissance par différentes intégrines de la fibronectine ou d'autres protéines matricielles est le tripeptide RGD (81). Les intégrines  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$  et  $\alpha_{11}\beta_1$  sont les récepteurs principaux du collagène de type I reconnaissant la séquence GFOGER (82-84). Un site cryptique du collagène de type I, DGEA, est également capable de se lier à l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  et d'interférer avec l'adhésion (25) et la signalisation médiées par cette intégrine dans de nombreux types cellulaires (85-90). Les séquences RGD et DGEA sont également présentes dans certaines protéines de la surface cellulaire, telles que L1CAM, une glycoprotéine de la famille des CAMs impliquée dans la migration cellulaire, ou son homologue murin CHL1. Ces protéines membranaires sont capables, par leur association en cis avec la sous-unité  $\beta_1$ , de moduler certaines fonctions cellulaires dépendant des intégrines comme la migration (91). RGD et DGEA sont connus pour induire un flux calcique intracellulaire dans divers types de cellules (92-94). Ces peptides mimétiques de la matrice extracellulaire nous ont paru les plus adéquats pour développer un modèle d'activation des intégrines, suffisamment rapide et transitoire pour répondre aux conditions de vols paraboliques. L'identification des intégrines mises en jeu et des voies de signalisation activées a fait l'objet d'une publication.

Publication n°1

**RGDS and DGEA-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signalling in human dermal fibroblasts.**

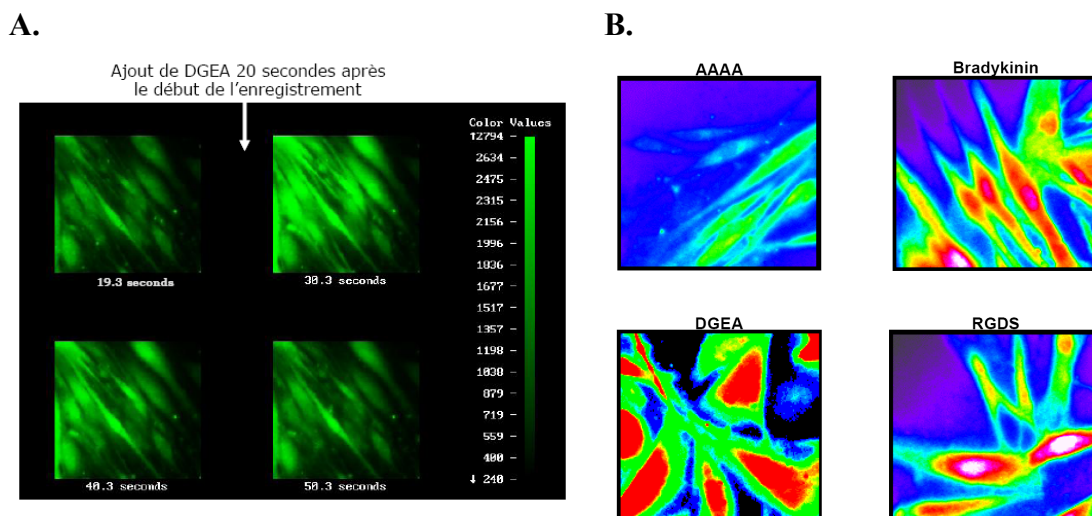
Mineur P, Guignandon A, Lambert ChA, Amblard M, Lapière ChM, Nusgens BV.

Biochim Biophys Acta, Mol Cell Res. 2005 Oct 30;1746(1):28-37.

## 4.2. Résumé des résultats de la publication n°1

Les principaux résultats détaillés dans cette publication sont exposés ci-dessous de façon succincte.

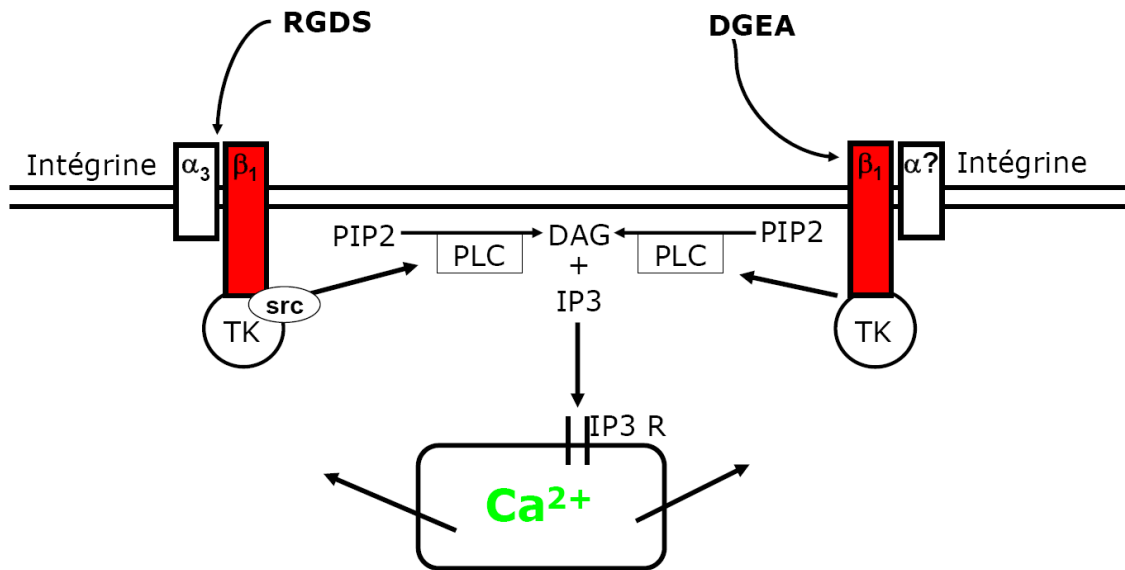
1. La concentration intracellulaire de calcium libre ( $[Ca^{2+}]_i$ ) a été mesurée en temps réel par microscopie confocale dans chacune des cellules du champ (fibroblastes humains ayant préalablement incorporé un fluorophore sensible aux ions calciques libres, le Fluo3-AM). L'addition d'une solution contenant les peptides RGDS et DGEA déclenche un flux calcique comme illustré dans la figure 21, alors que le peptide contrôle AAAA n'a pas d'effet. La bradykinine, un inducteur connu de flux calcique, est utilisée en fin d'expérience pour vérifier la réactivité des cellules analysées. GFOGER n'induit pas de flux calcique et n'interfère pas avec la réponse induite par RGDS, DGEA ou la bradykinine (non illustré).



**Figure 21 : Visualisation des flux calciques intracellulaires.** A. Cinétique d'induction de flux calciques engendrés par l'addition du peptide DGEA dans le milieu de culture cellulaire. L'intensité de la couleur verte est indicative de la concentration en  $[Ca^{2+}]_i$ . B. Flux de calcium induit par les différents peptides (fausses couleurs) 10 secondes après leur injection dans la culture.

2. Le pourcentage de cellules répondant à RGDS et DGEA s'accroît, jusqu'à un maximum de 90%, en fonction de la quantité de peptide ajoutée dans les cultures, selon une relation dose-réponse semi-logarithmique.

3. L'utilisation de divers chélateurs du calcium et d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de certaines voies de signalisation nous a permis de montrer que le pic de  $[Ca^{2+}]_i$  induit par RGDS et DGEA résulte d'une mobilisation des réserves intracellulaires, suite à l'ouverture des canaux calciques IP3-dépendant après activation de tyrosine-kinase(s) et de la phospholipase-C selon le schéma illustré dans la figure 22.



**Figure 22 : Voies de signalisation induites par les peptides RGDS et DGEA dans des fibroblastes de derme humain.**

4. L'utilisation d'anticorps bloquants a permis d'identifier  $\alpha_3\beta_1$  comme étant l'intégrine impliquée dans la vague calcique induite par RGDS. Le DGEA utilise la sous-unité  $\beta_1$  sans qu'aucune des sous-unités  $\alpha$  testées ( $\alpha_{1-6}$ ,  $\alpha_v$ ) ne semble participer de façon active à la signalisation calcique. Cette observation suggère la présence d'un site de fixation non-classique pour DGEA sur la sous-unité  $\beta_1$ .
5. Une période réfractaire à la réceptivité des cellules au RGDS est observée durant le processus d'adhésion des fibroblastes sur un support de fibronectine mais pas sur un support de collagène. Un résultat inverse est obtenu pour le peptide DGEA. Un substrat contrôle, la poly-L-lysine, ainsi que la laminine-5, un ligand d' $\alpha_3\beta_1$ , n'induisent pas de période réfractaire. La perte sélective et transitoire de réactivité aux peptides suggère un recrutement spécifique des intégrines par leur ligand matriciel respectif pour assurer l'adhésion des cellules.

### **4.3. Publication n°1**

## RGDS and DGEA-induced $[Ca^{2+}]_i$ signalling in human dermal fibroblasts

P. Mineur<sup>a,\*</sup>, A. Guignandon<sup>b,1</sup>, Ch.A. Lambert<sup>a</sup>, M. Amblard<sup>c</sup>, Ch.M. Lapière<sup>a</sup>, B.V. Nusgens<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Lab. Biologie des Tissus Conjonctifs, University of Liège, Belgium

<sup>b</sup> Lab. Biologie du Tissu Osseux, INSERM E366, University of Saint-Etienne, France

<sup>c</sup> Lab. des Aminoacides, Peptides et Protéines, University of Montpellier I et II, France

Received 19 July 2004; received in revised form 18 July 2005; accepted 19 July 2005

Available online 3 August 2005

### Abstract

A pulse of short peptides, RGDS and DGEA in the millimolar range, immediately elicits in normal human fibroblasts a transient increase of intracellular  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ). In the present study, we show that this  $[Ca^{2+}]_i$  occurs in an increasing number of cells as a function of peptide concentration. It is specific of each peptide and inhibited at saturating concentration of the peptide in the culture medium. The  $[Ca^{2+}]_i$  transient depends on signalling pathways slightly different for DGEA and RGDS involving tyrosine kinase(s) and phosphatase(s), phospholipase C, production of inositol-trisphosphate and release of  $Ca^{2+}$  from the cellular stores. GFOGER, the classical collagen binding peptide of  $\alpha1$ - $\alpha2$ - and  $\alpha11$ - $\beta1$  integrins, in triple helical or denatured form, does not produce any  $Ca^{2+}$  signal. The  $[Ca^{2+}]_i$  signalling induced by RGDS and DGEA is inhibited by antibodies against  $\beta1$  integrin subunit while that mediated by RGDS is also inhibited by antibodies against the  $\alpha3$  integrin. Delay in the acquisition of responsiveness is observed during cell adhesion and spreading on a coat of fibronectin for RGDS or collagen for DGEA or on a coat of the specific integrin-inhibiting antibodies but not by seeding cells on GFOGER or laminin-5. This delay is suppressed specifically by collagenase acting on the collagen coat or trypsin on the fibronectin coat. Our results suggest that free integrins and associated focal complexes generate a  $Ca^{2+}$  signal upon recognition of DGEA and RGDS by different cellular pathways.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Integrin;  $Ca^{2+}$  signalling; RGDS; DGEA; Fibroblast

### 1. Introduction

The engagement of integrins with their immobilized ligands generates a cascade of intracellular signals including activation of kinases, release of phosphatidylinositol by phospholipases and increased concentration of intracellular-free calcium [1,2]. The minimal recognition sequence of fibronectin and a number of other extracellular macromolecules is RGD (Arg–Gly–Asp) [3]. This sequence recognized by different integrins is able to block cell adhesion to diverse adhesive proteins [4]. RGD-containing short peptides are also known to increase cytosolic calcium ions in various types of cells [5]. The RGD sequence is also found in the  $\alpha1$  and  $\alpha2$  chains of type I collagen, although under a cryptic conformation [6] and the attachment of cells to

native collagen type I is not modified by RGD peptides. Integrins  $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$  and  $\alpha11\beta1$  are the major cell surface receptors of collagen type I [7–9] and recognize a distinct binding site containing the GFOGER sequence [10–12]. A DGEA (Asp–Gly–Glu–Ala) sequence present in the cyanogen bromide peptide  $\alpha1CB3$  of the type I collagen was reported to bind to  $\alpha2\beta1$  integrin and to inhibit the  $\alpha2\beta1$ -mediated adhesion of platelets to collagen and that of T47D to collagen and laminin [13] and to interfere in the  $\alpha2\beta1$  signalling in many cell types [14–19]. DGEA is also able to induce  $Ca^{2+}$  transients in the human osteoblastic SaOS-2 line [20,21]. RGD and DGEA are also present in cell surface proteins such as L1CAM that can associate through these sequences in *cis* with the  $\beta1$  integrin subunit. CHL1, a murine close homolog to L1, was recently shown to modulate neuronal cell migration and other integrin-dependent functions through these sequences [22,23].

In this work, we used RGDS and DGEA in the millimolar range to trigger an immediate rise of intracellular calcium in human fibroblasts. This  $[Ca^{2+}]_i$  transient of short duration

\* Corresponding author. Laboratory of Connective Tissues Biology, Tour de Pathologie B23/3, CHU Sart-Tilman, University of Liège, 4000 Liège, Belgium. Tel.: +32 4 366 24 59; fax: +32 4 366 24 57.

E-mail address: [Pierre.Mineur@ulg.ac.be](mailto:Pierre.Mineur@ulg.ac.be) (P. Mineur).

<sup>1</sup> The two first authors equally contributed to the work.



resulted of the release of the ions from the cellular stores by a phosphoinositide pathway triggered by protein kinase(s) and phospholipase(s). The goal of this study was to better understand the mechanism used by the cells to perceive the signal carried by the peptides and the implication of integrins in the process.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

RGDS, AAAA, bradykinin, ionomycin, calyculin A,  $\text{LaCl}_3$ , EGTA, BAPTA-AM, thapsigargin, herbimycin A, genistein, neomycin, poly-L-lysine, and bovine serum albumin were purchased from Sigma (St Louis, MI), xestospongine C, okadaic acid, PP2 and U73343 from Calbiochem (San Diego, CA), U73122 from ICN (Costa Mesa, CA), PP1 from Alexis Corporation (Lausen, Switzerland), trypsin from Life Technologies Inc. (Rockville, MD) and highly purified bacterial collagenase from Advance Biofactures Corporation (Lynbrook, NY). DGEA was from Research Genetics (Huntsville, AL) and KGDS from Bachem AG (Bubendorf, Switzerland).  $(\text{GPO})_n\text{GFOGER}(\text{GPO})_n$  was a generous gift of M. Hook, Houston, Texas [11]. Function blocking monoclonal antibodies anti-human integrin subunits  $\alpha 1$  (clone FB12),  $\alpha 2$  (clone P1E6),  $\alpha 4$  (clone P4G9) and  $\alpha 6$  (clone GoH3) were from Chemicon (Temecula, CA),  $\alpha 3$  (clone P1B5) and rabbit anti-mouse IgG from DAKO (Carpinteria, CA),  $\alpha 5$  (clone P1D6) and  $\beta 1$  (clone P4C10) from Life Technologies Inc. Anti-human  $\alpha v$  (clone 17E6) is a generous gift from S. L. Goodman [24]. Fetal calf serum and DMEM were from Life Technologies Inc., Fluo3-AM from Molecular Probes (Eugene, OR), borosilicate coverslip Lab-Tek® from Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Type I collagen was purified from bovine skin as described by Delvoye et al. [25] and fibronectin was purified from human plasma as described by Hayashi and Yamada [26]. Laminin-5 was kindly offered by M. Aumailley (Dpt. Biochemistry II, University of Koeln, Germany).

### 2.2. Cell culture

Normal human skin fibroblasts were grown from skin biopsies of a young healthy donor by the explant procedure described earlier [25] and used between passages 8 and 13. Human rhabdomyosarcoma RD cells were purchased from Biowhitaker (Walkersville, MD). All cells were mycoplasma-free and routinely cultured in DMEM in the presence of 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM glutamine, penicillin–streptomycin (100 IU/ml each) and ascorbic acid (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (=standard medium) at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ .

### 2.3. Fluo3-AM loading and fluorescence recording

For routine experiments, cells were plated in borosilicate culture chambers (Lab-Tek®) for 18 h in DMEM-10% FCS, rinsed with serum-free medium and incubated with the fluorophore Fluo3-AM (10  $\mu\text{M}$ ) in serum-free medium for 1 h. In short term adhesion experiments (up to 150 min), the trypsinized cells were plated in serum-free medium and the Fluo3-AM added for the last 20 min. After loading, cells were washed and immediately tested in serum-free medium. The observation of the fluorescence emitted by the Fluo3-labeled cells started 5 min after the last washing. Microscope fields taken at random in the culture were examined by a confocal microscope (Meridian, Akemos, MI). At a magnification of 63 $\times$  the microscope field contained 5–12 cells. The Fluo3-loaded cells were excited by an Argon LASER at 488 nm and the emitted fluorescence recorded at 530 nm in each cell of the field and in real time. Image processing and data computing were performed using the Meridian software. The intensity of the emitted fluorescence was recorded every second during at least 100 s. As the overall fluorescence intensity varied from cell to cell, the level of fluorescence of each cell at the beginning of the recording was normalised to one arbitrary unit. The baseline of resting cells spontaneously oscillated by  $\pm 5\%$  around the level of the first image acquisition. A 10% rise above the baseline was considered as a significant calcium rise and the cell

regarded as responsive. The results were expressed as the percentage of responding cells.

### 2.4. Stimulation by the peptides

After a 20 s period of baseline recording, 10  $\mu\text{l}$  of a solution in water or in phosphate-buffered saline (PBS) of the various peptides (DGEA, AAAA, RGDS, KGDS) of the indicated amount (in nanomoles) was gently added on top of the cells under microscopic examination. Ten  $\mu\text{l}$  of an aqueous solution of bradykinin (2 nmol) was similarly injected before completion of the recording to test the ability of the examined cell population to produce a  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise. The peptide GFOGER in triple helical conformation by renaturation at 4 °C overnight or denatured by heating at 70 °C 10 min. was similarly tested using an amount of 10 nmol.

### 2.5. Coating of culture surfaces

When indicated borosilicate culture chambers (Lab-Tek®) were coated with fibronectin (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS), native type I collagen (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS), poly-L-lysine (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or monoclonal anti-integrin subunits  $\beta 1$  (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $\alpha 3$  (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or  $\alpha 5$  (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). One ml of solutions was used per square centimeter. The fibronectin solution was incubated for 1 h at room temperature. The unoccupied reactive sites were blocked with 0.2% heat denatured bovine serum albumin (BSA), washed with PBS at room temperature and dried. Monomeric collagen coats were prepared by drying the collagen solution at 4 °C, washing and drying at room temperature. Poly-L-lysine solution was adsorbed overnight at 4 °C. Laminin-5 was coated overnight at 4 °C, blocked with 1% heat denatured BSA for 1 h at room temperature and washed with PBS. All the coated slides were stored at 4 °C. The anti-integrin coated surface were prepared as described by Schwartz [1]. The borosilicate slides were coated first with 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of rabbit anti-mouse IgG for 1 h at 37 °C, washed with PBS, blocked with 1% heat denatured BSA, washed again, incubated for 1 h with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the specific monoclonal antibodies (anti- $\beta 1$ , anti- $\alpha 3$  or anti- $\alpha 5$  integrins) in 1% heat denatured BSA, rinsed with PBS and immediately used. Coating with the GFOGER peptides was obtained by incubating the slides overnight at 4 °C with a 1 mM solution in phosphate-buffered saline (PBS) of the triple helical peptide, washed in PBS and blocked with 1% heat-denatured BSA. All reactions and testing were performed at maximum 25 °C.

### 2.6. Enzymatic digestion of coated substrates

Fibroblasts were plated in serum-free medium on fibronectin and native type I collagen coated coverslips for 60 min and loaded with Fluo3-AM (10  $\mu\text{M}$ ) during the last 20 min. After washing with PBS, the cultures were incubated for 3 min at 25 °C with trypsin (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in DMEM or with highly purified bacterial collagenase (50 U/ml) in 0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, 2 mM  $\text{CaCl}_2$  pH 7.5 before adding the peptide agonist DGEA or RGDS and recording the fluorescence.

### 2.7. Pharmacological investigations

The following pharmacological investigations were performed on fibroblasts plated on glass for 18 h before Fluo3-AM loading. Genistein (10  $\mu\text{M}$ ), thapsigargin (2  $\mu\text{M}$ ), BAPTA-AM (30  $\mu\text{M}$ ) neomycin (10  $\mu\text{M}$ ) were added 3 h before loading, PP1 and PP2 (20  $\mu\text{M}$ ) were added 90 min before use, herbimycin A (10  $\mu\text{M}$ ), xestospongine C (20  $\mu\text{M}$ ), calyculin A (500 pM) and okadaic acid (10  $\mu\text{M}$ ) at the time of loading, EGTA (2 mM),  $\text{La}^{3+}$  (80  $\mu\text{M}$ ), U73122 and U73343 (1  $\mu\text{M}$ ) just before fluorescence analysis. Anti- $\beta 1$  and anti- $\alpha$ -integrins subunit monoclonal antibodies were added at a final concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of culture medium 30 min before testing the effect of the peptides.

### 2.8. Cytotoxicity assays

The cytotoxicity of the various agents used in this study was tested by measuring the activity of the mitochondrial succinate dehydrogenase [27] as previously described [28].



### 2.9. Statistical analysis

Comparisons between groups were based on parameters using the one-way analysis of variance (ANOVA). When the ANOVA test was significant, the Tukey–Kramer multiple comparisons test was used to compare the groups versus control.

## 3. Results

### 3.1. DGEA and RGDS induce an intracellular free calcium $[Ca^{2+}]_i$ transient in fibroblasts

Single-cell, real-time fluorescence recording was performed by confocal microscopy on human skin fibroblasts attached for 18 h to glass coverslips in Lab-Tek® chambers and loaded with Fluo3-AM. Typically, the fluorescence in resting fibroblasts was diffuse within the cytoplasm with

scattered spots of higher intensity and accentuated in the perinuclear area (not illustrated). The variability in fluorescence intensity before normalisation to 1.0 was between 1000 and 2000 fluorescence units for a scale of 0 to 4095. The subcellular localisation of the fluorescence in resting cells remained similar for the total duration of data acquisition (at least 100 s) while the overall fluorescence intensity only slightly decreased with time (Fig. 1A), likely due to bleaching. The compartmentalization of the dye was suppressed by ionomycin (1  $\mu$ M) that produced an uniform fluorescent signal in the cell. The calculated mean intracellular free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) was  $120 \pm 30$  nM, a value in close agreement to that reported in the literature [29]. To assess the ability of the cells to respond by a rise in  $[Ca^{2+}]_i$ , the fibroblasts were always stimulated with bradykinin (2 nmol) at the end of each experiment. It induced a rise

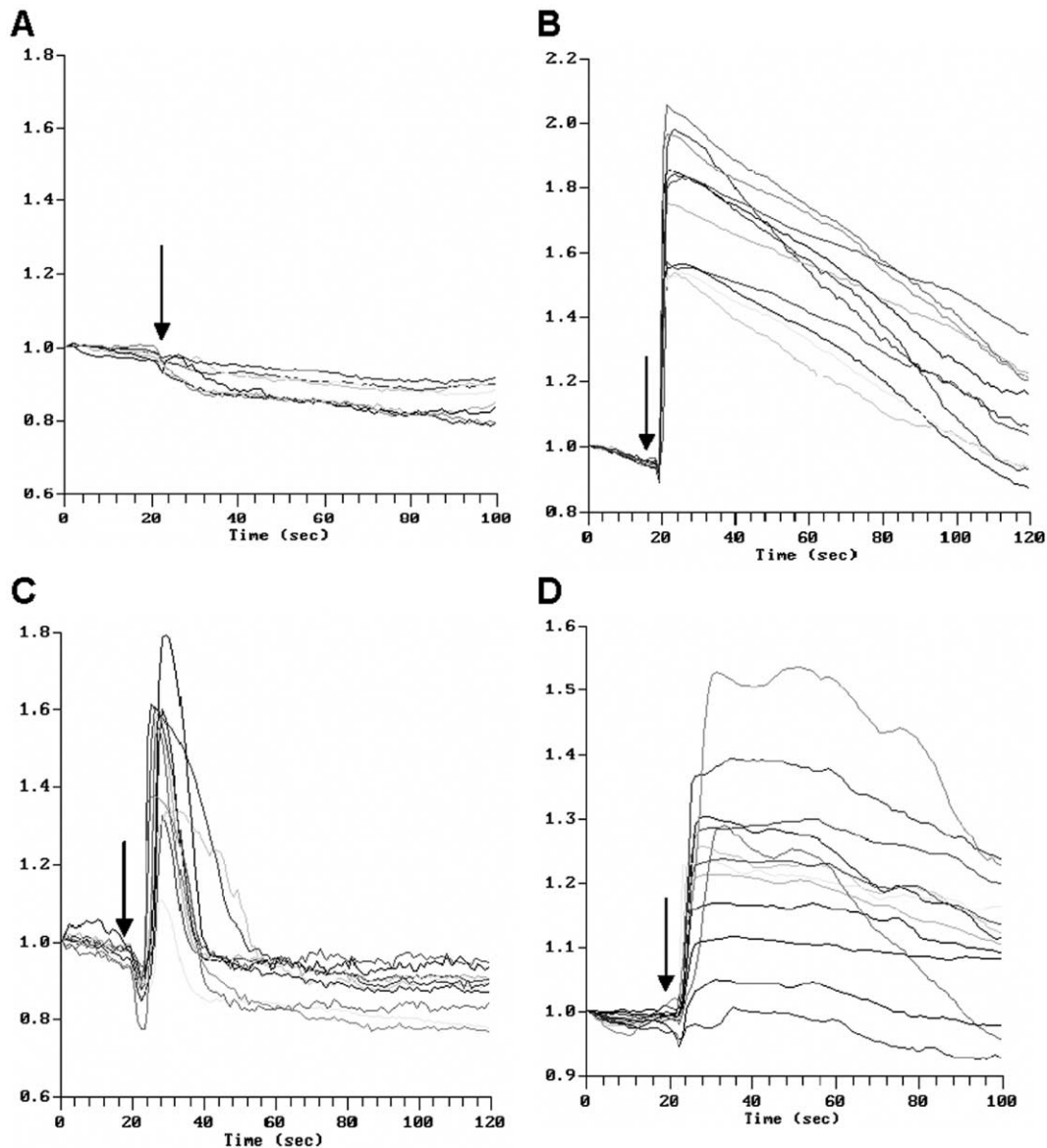


Fig. 1. Time-course variation (in s) of the fluorescence in glass-plated fibroblasts treated with (A) AAAA (10 nmol), (B) bradykinin (2 nmol), (C) DGEA (10 nmol) and (D) RGDS (10 nmol). Fluo3-AM loaded cells were treated with the various peptides at the indicated time (arrow) during the recording of the fluorescence. The fluorescence intensity of the individual cells was normalised to 1 at the beginning of the recording.

of fluorescence mainly localised in and around the nucleus. A similar burst of fluorescence was observed in fibroblasts excited by 10 nmol DGEA or RGDS in water or phosphate-buffered saline. The recording of fluorescence intensity as a function of time in the individual cells of the microscope field is illustrated in Fig. 1. No significant increase of the fluorescence was induced by AAAA (Fig. 1A) or by the solvents alone (not shown). Bradykinin induced a rise of fluorescence in every cell within a few seconds (Fig. 1B) and its intensity peaked at 150 to 200% of the initial value before slowly and progressively returning to the baseline. A similar increased fluorescence was induced by DGEA (Fig. 1C) within  $\pm 10$  s to reach a peak at  $\pm 150\%$  and a rapid return to the baseline value. RGDS also rapidly induced a significant rise ( $\pm 130\%$ ) of fluorescence followed by a slower decline to the baseline values (Fig. 1D) while KGDS, at the same concentration, had no effect (not shown). Prolonged acquisition of data up to 5 min failed to detect cells responding later by a significant peak. The peptide-induced  $\text{Ca}^{2+}$  rise could be repeated several times. To assess that the peak of fluorescence was actually due to an increased  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , the cells were loaded with the membrane-permeant calcium chelator BAPTA-AM for 3 h prior to addition of the peptides. This resulted in a total suppression of the  $\text{Ca}^{2+}$  transients in response to the active peptides (Table 1). The peak of fluorescence induced by both peptides was similar in the fibroblasts attached for 18 h on a glass support uncoated or coated with monomeric collagen, fibronectin, laminin-5 or poly-L-lysine.

The calcium response of the human dermal skin fibroblasts was further analyzed by varying the concentration of DGEA and RGDS. The number of responsive cells increased according to a semi-log dose–response relationship (Fig. 2) up to a maximum of 90% of the cell population upon stimulation by 10 nmol of peptide, the half-maximal response being observed at

0.1 nmol. By contrast, the size of the fluorescence peak, i.e., the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the responding cells, was independent of the concentration of the stimulating peptide. A pulse of 10 nmol of peptide was selected for the following experiments.

The peptide GFOGER, the known collagen I binding site of the  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - and  $\alpha 11$ - $\beta 1$  integrins, in the triple helical configuration or denatured, added at the same amount (10 nmol) did not induce any  $\text{Ca}^{2+}$  transient. This addition did not interfere with the production of the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient produced by DGEA or RGDS or the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  signal produced by bradykinin.

### 3.2. DGEA- and RGDS-induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ transients involve calcium mobilization from internal stores by a slightly different mechanism

The origin of the calcium ions participating in the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient in response to both DGEA and RGDS peptides was investigated by using a variety of agents known to interfere with calcium movements (Table 1). Addition of EGTA to chelate calcium in the extracellular space or of  $\text{La}^{3+}$  ions, known to block the plasma membrane calcium channels, 10 min prior to addition of DGEA, RGDS or bradykinin, did not affect the calcium responses. Treatment of the cells for 3 h with thapsigargin, an inhibitor of the endoplasmic reticulum ATPases-dependent calcium pump [30], suppressed the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients induced by both peptides and by bradykinin. Xestospongine C, known as an inhibitor of inositol-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) receptor [31], reduced the DGEA- and RGDS-induced signals. These data indicate that the rise in  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induced by DGEA and RGDS depends upon an IP<sub>3</sub>-mediated mobilization of the ion from the internal stores and not by a significant influx of the ion from the extracellular space. Xestospongine C did not inhibit the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transient induced by

Table 1

Effect of inhibition of various signalling pathways on the  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  transients induced by DGEA (10 nmol), RGDS (10 nmol) and bradykinin (2 nmol) in fibroblasts plated on glass for 18 h

Agents	Target	Percentage of cells responding to				Number of cells/experiments	
		DGEA	RGDS	Bradykinin after		DGEA	RGDS
				DGEA	RGDS		
None		89 $\pm$ 7	90 $\pm$ 7	97 $\pm$ 5	100	97/10	115/10
BAPTA-AM	Intracellular $\text{Ca}^{2+}$	0*	0*	0	0	16/2	12/2
EGTA	Extracellular $\text{Ca}^{2+}$	90 $\pm$ 9	87 $\pm$ 11	100	100	30/3	17/3
$\text{La}^{3+}$	Plasma membrane $\text{Ca}^{2+}$ channels	96 $\pm$ 6	72 $\pm$ 13	100	100	26/3	27/3
Thapsigargin	ER $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase	0*	0*	0	0	18/2	16/2
Xestospongine C	IP <sub>3</sub> -mediated $\text{Ca}^{2+}$ Release	22 $\pm$ 32*	15 $\pm$ 21*	100	100	17/2	18/2
Genistein	Tyrosine kinases	0 $\pm$ 0*	5 $\pm$ 7*	100	90 $\pm$ 0	16/2	20/2
Herbimycin A	Tyrosine kinases	70 $\pm$ 23	20 $\pm$ 13*	100	100	60/8	19/2
PP1	Src tyrosine kinases	100 $\pm$ 0	82 $\pm$ 16	92 $\pm$ 12	100	22/2	24/2
PP2	Src tyrosine kinases	100 $\pm$ 0	80 $\pm$ 28	100	96 $\pm$ 6	21/2	22/2
Okadaic acid	Phosphatases	94 $\pm$ 5	15 $\pm$ 19*	100	98 $\pm$ 4	35/3	56/4
Calyculin A	Phosphatases 1 and 2A	100 $\pm$ 0	17 $\pm$ 15*	100	100	22/3	29/3
Neomycin	Phospholipase C	6 $\pm$ 7*	11 $\pm$ 10*	8 $\pm$ 1	0	36/5	27/3
U73122	Phospholipase C	6 $\pm$ 10*	3 $\pm$ 5*	0	0	24/3	24/3
U73343	Inactive analog of U73122	95 $\pm$ 7	80 $\pm$ 18	100	100	21/2	25/2

ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; IP<sub>3</sub>: Inositol (1, 4, 5) trisphosphate.

\*  $P < 0.001$  versus control sample.

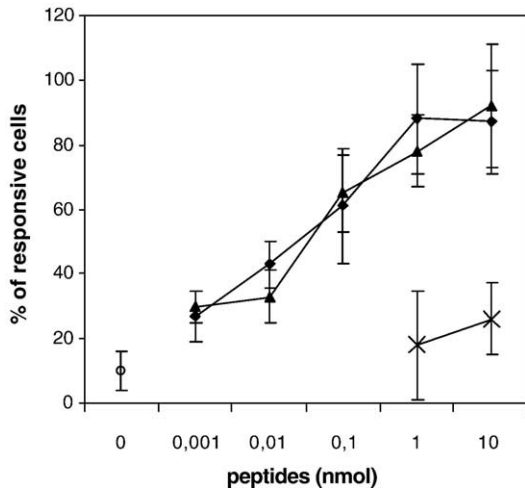


Fig. 2. Dose–response relationship of glass-plated fibroblasts to DGEA (◆), RGDS (▲), AAAAA (×) and solvent alone (10  $\mu$ l) (○). The calcium signal was monitored as described in Materials and methods on a total of 22 to 38 cells in 4 separate experiments. The percentage ( $\pm$ SD) of responding cells is plotted against the amount of added peptide or solvent alone.

bradykinin after pulsing with DGEA or RGDS. This absence of inhibition is related to the short half-life of xestospongins C after replacing the medium before pulsing with the peptides [32].

To further analyze the signalling triggered by DGEA, RGDS and bradykinin, cells were treated with a panel of agents known to inhibit different pathways originating from membrane receptors. Genistein, a broad spectrum inhibitor of tyrosine kinases, abrogated the cell response to both peptides while herbimycin A, but not PP1 and PP2, inhibitors more selective of the src-family tyrosine kinases, strongly reduced the effect of RGDS and barely affected the response to DGEA. Calyculin A and okadaic acid, phosphatases 1 and 2A inhibitors, reduced the activity of RGDS but not that of DGEA. No effect was observed with tyrphostin A23, an inhibitor of growth factor receptor tyrosine kinase activity (data not shown). The PLC inhibitors, U73122 but not its inactive analog (U73343) and neomycin, extensively reduced the  $Ca^{2+}$  signalling by both DGEA and RGDS as well as by bradykinin. The toxicity of the inhibitors was tested by the MTT test as

previously described [28]. All were devoid of toxicity at the concentrations and for the delay of application used here except BAPTA-AM, that reduced the mitochondrial activity of 50% after 6 h.

### 3.3. RGDS and DGEA target different binding molecules

To assess whether DGEA and RGDS target different receptors, DGEA- and RGDS-induced calcium responses were analyzed in cells incubated with high concentration (1 mM) of the peptides added in the medium 30 min before the assay. Cells maintained in 1 mM DGEA fully responded to RGDS and bradykinin while the response elicited by DGEA dropped to 35% (Table 2). Conversely, cells maintained in 1 mM RGDS fully responded to DGEA and bradykinin while the proportion of RGDS-responding cells decreased to 50%. These results suggest that distinct membrane receptors are used by each of the peptides.

To assess the role of integrins in the peptide-induced calcium transients, fibroblasts plated on glass in presence of 10% FCS for 18 h were treated with function blocking monoclonal antibodies against human  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha v$  and  $\beta 1$  integrin subunits (10  $\mu$ g/ml), alone or in combination, 30 min prior to challenging with the peptides. The anti- $\beta 1$  integrin antibodies blocked the  $Ca^{2+}$  transients induced by both DGEA and RGDS (Table 2). Irrelevant monoclonal anti-mouse IgG or heat-denatured bovine serum albumin, used at the same concentration, did not affect the calcium signals. Blocking anti- $\alpha 1$ , - $\alpha 2$ , - $\alpha 4$ , - $\alpha 5$ , - $\alpha 6$  and - $\alpha v$  subunit integrin monoclonal antibodies, alone or in combination, were unable to inhibit the response to RGDS while it was completely suppressed by anti- $\alpha 3$  subunit antibodies, alone or in combination with the four other anti- $\alpha$  subunits. None of these seven anti- $\alpha$  subunit antibodies, alone or in combination, was able to block the response to DGEA. Addition of bradykinin induced a rise of  $[Ca^{2+}]_i$  in more than 95% of the cells after treatment with each of the antibodies, alone or combined. The inhibitory activity of anti- $\beta 1$  towards RGDS and DGEA and of anti- $\alpha 3$  towards RGDS was similar in cells plated on coated matrices, collagen or fibronectin or poly-L-lysine (not illustrated).

Table 2  
Effects of DGEA, RGDS and soluble anti-integrins antibodies on the  $[Ca^{2+}]_i$  transients induced by DGEA (10 nmol), RGDS (10 nmol) and bradykinin (2 nmol) in fibroblasts plated on glass for 18 h

Treatment	Percentage of cells responding to				Number of cells/experiments	
	DGEA	RGDS	Bradykinin after		DGEA	RGDS
			DGEA	RGDS		
None	84 $\pm$ 4	89 $\pm$ 2	100	100	39/3	35/3
DGEA (1 mM)	33 $\pm$ 11*	95 $\pm$ 6	100	100	24/2	25/2
RGDS (1 mM)	88 $\pm$ 6	48 $\pm$ 8*	100	96 $\pm$ 6	25/2	25/2
Anti- $\beta 1$	21 $\pm$ 6*	8 $\pm$ 13*	100	100	28/3	28/3
Anti- $\alpha 1$ , - $\alpha 2$ , - $\alpha 4$ , - $\alpha 5$	74 $\pm$ 12	86 $\pm$ 9	100	100	43/3	38/3
Anti- $\alpha 3$	90 $\pm$ 9	0 $\pm$ 0*	98 $\pm$ 3	98 $\pm$ 3	56/4	57/4
Anti- $\alpha 1$ , - $\alpha 2$ , - $\alpha 3$ , - $\alpha 4$ , - $\alpha 5$	100 $\pm$ 0	13 $\pm$ 9*	100	96 $\pm$ 6	22/2	23/3
Anti- $\alpha 6$	74 $\pm$ 1	100 $\pm$ 0	100	100	19/2	15/2
Anti- $\alpha v$	100 $\pm$ 0	94 $\pm$ 9	100	100	25/2	22/2

\*  $P < 0.001$  versus control sample.

3.4. Adhesion of fibroblasts on fibronectin or type I collagen transiently and specifically represses the  $[Ca^{2+}]_i$  response to, respectively, RGDS and DGEA, while laminin-5 has no effect

Fibroblasts were seeded on native monomeric type I collagen, fibronectin, laminin-5 or poly-L-lysine and the peptide-induced calcium signalling was analyzed as a function of time after plating. The first observation was performed 45 min after seeding. When plated on collagen, fibronectin or laminin-5, the cells rapidly attached and progressively spread after 150 min (not shown), while on poly-L-lysine the fibroblasts were rapidly

immobilized but remained rounded. On native type I collagen, the number of cells displaying a  $[Ca^{2+}]_i$  response to RGDS was maximal at all tested times (Fig. 3A) while the reactivity to DGEA was very low at 45 min and progressively increased to reach maximal values at 100–120 min. Conversely, on fibronectin the RGDS-induced  $[Ca^{2+}]_i$  signalling was low at 45 min and progressively increased with time up to 150 min (Fig. 3B). A significantly reduced reactivity to DGEA was also observed in this condition during the first 60 min. No lag period was noted for both peptides in cells plated on poly-L-lysine (Fig. 3C) or on laminin-5 (not shown). When the fibroblasts were

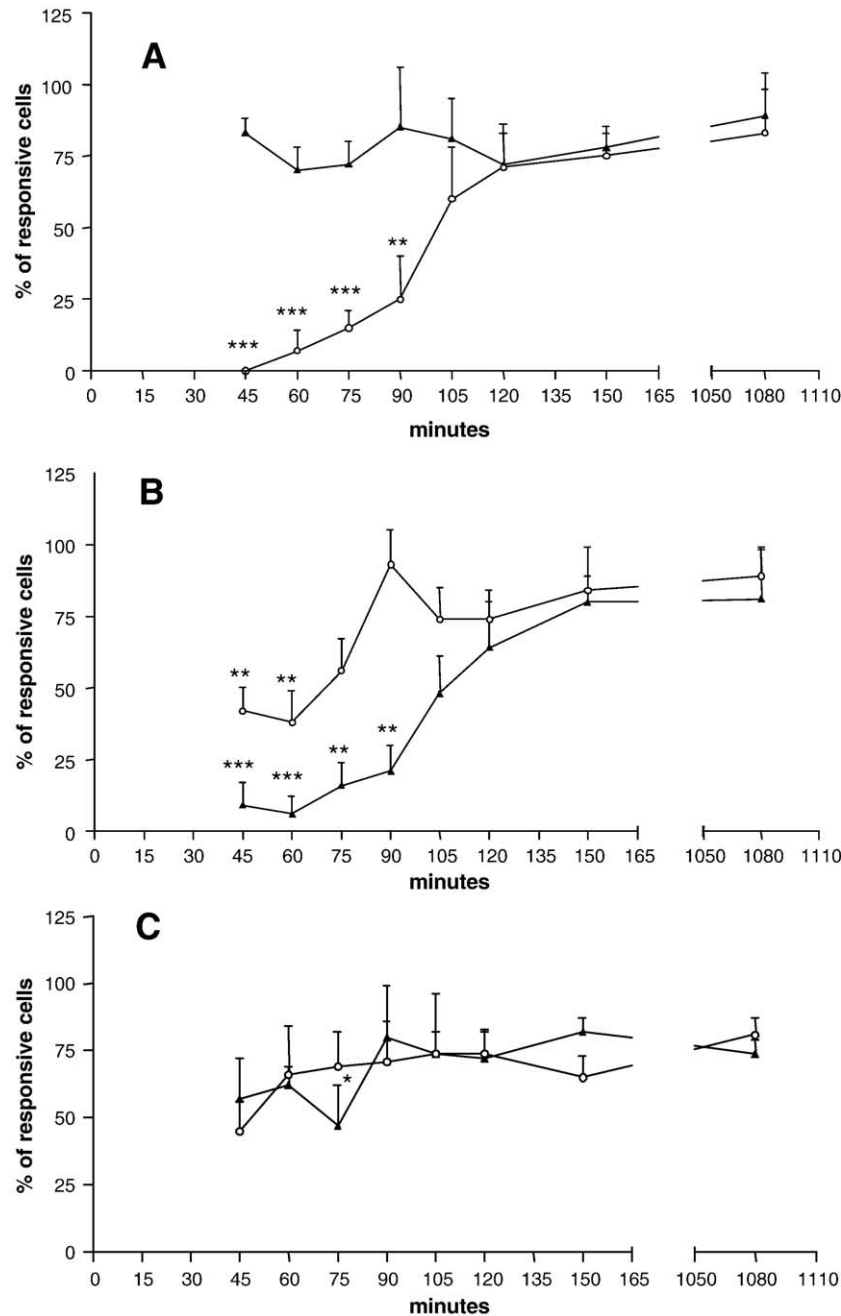


Fig. 3. Modulation of the calcium response to DGEA and RGDS by the substrate. Cells plated on (A) native type I collagen, (B) fibronectin or (C) poly-L-lysine were loaded with Fluo3-AM during the last 20 min preceding the stimulation by the peptides. The percentage of responding cells to DGEA (○) and RGDS (▲) was recorded at increasing time after plating starting at 45 min on a total of 17 to 52 cells in 3 to 4 separate experiments for each time point. The significance of the differences versus the values at 150 min are \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$  by the Tukey–Kramer test.



plated, adhered and spread on GFOGER, no lag period was observed upon stimulation by DGEA, RGDS or bradykinin. The  $[Ca^{2+}]_i$  signal in response to bradykinin was close to 100% at all time points tested on each of the substrates (not shown). These results suggest that the recognition site specific to each peptide is temporarily unavailable during cell adhesion.

To further assess the role of the extracellular support, cells plated for 60 min, i.e., in the middle of the refractory period, on type I collagen or on fibronectin were treated either with highly purified bacterial collagenase or trypsin, washed and stimulated within 5 min by DGEA or RGDS. More than 50% of the cells seeded on collagen and treated with collagenase became responsive to DGEA (Fig. 4) while most cells in the untreated cultures or incubated with trypsin failed to respond. RGDS and bradykinin induced the expected positive response (not illustrated). Conversely, treating the cultures on a fibronectin coat by trypsin restored a significant response to RGDS (Fig. 4) while collagenase treatment was ineffective. DGEA and bradykinin induced the expected strong response (not illustrated). These observations suggest that the signalling complex for the peptides is made available by specific proteolysis of the coated proteins during the period of spreading.

To further ascertain the role of integrin-based transduction of the peptides signalling, cells were seeded on coats of anti- $\beta 1$ ,  $\alpha 3$  and  $\alpha 5$  antibodies. On a coat of anti- $\beta 1$  integrin bound to anti-mouse IgG, the cells attached and the  $[Ca^{2+}]_i$  signal induced by both DGEA and RGDS was reduced at 60 min, and remained low at 150 min, i.e., beyond the period of non-responsiveness on ECM coats, to reach a full responsiveness only after 240 min. (Table 3). When anti- $\alpha 3$  integrin was used as a coat the lag period only concerned the  $[Ca^{2+}]_i$  signal triggered by RGDS. Cells seeded on a coat of anti- $\alpha 5$  subunit fully responded with no delay to both peptides. The  $[Ca^{2+}]_i$  signalling by bradykinin was not affected at any time under any of the experimental conditions.

#### 4. Discussion

In this study, short synthetic peptides contained in the sequence of extracellular matrix proteins were used to induce intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  transients in normal human fibroblasts. Addition of DGEA or RGDS in the millimolar range to attached normal human fibroblasts rapidly triggered a short-lived rise in intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  shown by an increased fluorescence of Fluo3. It was most visible in and around the nucleus as reported in other types of cells [33]. This distribution agrees with the description of the perinuclear location of agonist-stimulated elementary  $Ca^{2+}$  signals acting as initiator of calcium movements [34] and the release of nuclear and perinuclear  $Ca^{2+}$  by mechanical stress [35], an integrin mediated process. RGD-containing proteins or peptides are known to trigger  $[Ca^{2+}]_i$  signals in a number of cell types among which endothelial cells [36], fibroblasts [37], osteoclasts [33,38], epithelial cells [39], smooth muscle cells [40] and lymphocytes [41]. DGEA has been less investigated. It was shown to induce  $[Ca^{2+}]_i$  transients in the osteoblast-like cell line SaOS-2 [20,21]. Here, we show that fibroblasts

respond to RGDS as well as to DGEA but not to GFOGER by calcium transients. These cells reacted to the active peptides by a concentration-dependent number of responsive cells up to a maximum of 90% and a lack of relationship between the amount of added peptide and the level of fluorescence. Such an all-or-none effect might depend on two different mechanisms, the all or none reaction and the graded response [42]. Additional work is needed to answer this question. The reason why some cells are unresponsive to the peptides while they are all responsive to bradykinin is not clear. It is not related to the basal level of fluorescence, i.e., the intracellular concentration of calcium and/or the amount of loaded fluorescent indicator, neither to the cell cycle state since mitomycin-growth arrested fibroblasts were similarly responsive (data not shown). Cell attached to poly-L-lysine that remain rounded also produced a signal of a size similar to that observed in spread cells.

While the  $[Ca^{2+}]_i$  rise induced by DGEA rapidly returned to the baseline values, the signals induced by RGDS were more persistent suggesting that the peptides target different receptors or trigger different signalling pathways. This is further supported by the positive response to one peptide in the presence of a saturating concentration of the other, the non-responsiveness to the peptides during adhesion only on a specific support, distinct effects of some inhibitors of the signalling pathways and the sensitivity to specific anti-integrin antibodies.

In our experimental model,  $[Ca^{2+}]_i$  mobilization by RGDS or DGEA did not require calcium entry from the extracellular medium since  $La^{3+}$  or EGTA in the culture medium did not affect the response. This independence on extracellular calcium has already been observed in fibroblasts [43]. It is in sharp contrast with data published for osteoblast-like cells [21]. The difference may be explained by the low number of calcium channels in the human fibroblasts. By using a panel of pharmacological agents at non-toxic concentrations [28], we suggest that the calcium mobilized by DGEA and RGDS originates from intracellular stores and requires tyrosine-kinase(s), the release of phosphoinositides by phospholipase C and opening of the IP<sub>3</sub>-sensitive calcium channels of the

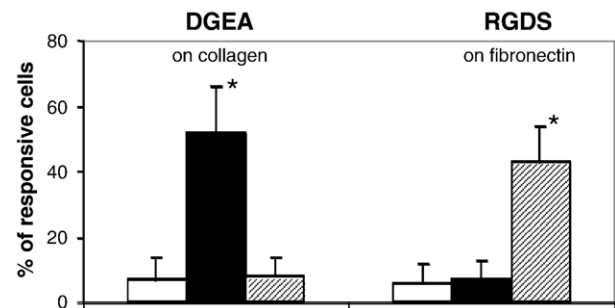


Fig. 4. Effect of enzymatic digestion of the substrates on the calcium response to DGEA and RGDS during the refractory period. Fibroblasts were plated on native type I collagen or fibronectin for 60 min and loaded with Fluo3-AM during the last 25 min. After washing, the cultures were treated with trypsin or bacterial collagenase for 5 min at room temperature and the calcium response to RGDS or DGEA was monitored on a total of 27 to 41 cells in 3 different experiments for each condition. □ no enzyme treatment; ■ collagenase; ▨ trypsin. \* $P < 0.01$ , enzyme treated versus control.

Table 3  
 $[Ca^{2+}]_i$  induced by DGEA (10 nmol) and RGDS (10 nmol) in fibroblasts plated on coated subunit integrin monoclonal antibodies

	Percentage of responding cells				Number of cells/ experiments	
	DGEA	RGDS	Bradykinin(2 nmol) after		DGEA	RGDS
			DGEA	RGDS		
<i>Anti-<math>\alpha 5</math></i>						
60 min	89±6	93±10	100	100	29/2	28/2
150 min	85±11	100±0	100	100	23/2	30/2
240 min	92±11	100±0	100	100	31/2	23/2
<i>Anti-<math>\beta 1</math></i>						
60 min	32±27*	31±17*	100	100	26/3	51/4
150 min	17±10**	32±33*	95±6	100	38/3	26/3
240 min	96±6	80±2	100	100	21/2	25/2
<i>Anti-<math>\alpha 3</math></i>						
60 min	87±3	34±16*	95±7	95±6	38/4	61/5
150 min	68±11	91±5	100	94±1	30/2	32/2
240 min	96±6	75±15	100	100	21/2	27/2

\*  $P < 0.05$ .

\*\*  $P < 0.01$  versus the anti- $\alpha 5$  samples.

intracellular stores. Furthermore, a phosphatase activity seems required for RGDS signalling as suggested by suppression of the  $Ca^{2+}$  signal by okadaic acid and calyculin A. Several kinases are found in vicinity of the cytoplasmic tail of the integrins in the focal adhesions, including FAK<sup>125</sup> and members of the src family [44]. The broad spectrum inhibitor genistein suppresses the  $Ca^{2+}$  signalling of both peptides. The greater sensitivity of the RGDS-induced  $[Ca^{2+}]_i$  signalling to herbimycin A suggests a role of one or several defined members of these kinases family in the RGDS- but not in the DGEA-induced signalling. The src-kinases do not seem to be involved since the more specific inhibitors PP1 and PP2 are inactive. The proposed pathways are partly similar to those used in signalling by growth factor receptors and integrins [45]. Interactions between cells and the extracellular matrix are regulated by small GTPases of the Rho family. These Rho GTPases are key signalling molecules regulating the architecture of the cytoskeleton [46] and the assembly of proteins into focal adhesions [47]. In preliminary experiments, RhoA, Rac1 and Cdc42 were knocked-down by the si-RNA technology that we previously described [48]. Si-Rac1 extensively repressed the  $Ca^{2+}$  signal-induced by RGDS while the signal produced by DGEA was not affected by any of these siRNAs (personal unpublished results). As opposed to DGEA, RGDS is a recognized ligand for a large family of integrins [4], among which  $\alpha 3\beta 1$ . Our data support a classical signalling for RGDS but do not exclude an alternate mechanism as discussed later.

Using blocking antibodies indicated that  $\alpha 3\beta 1$  is involved in the RGDS-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transient. The integrin  $\alpha 3\beta 1$  is very versatile and involved in adhesion, migration and signalling and may negatively cooperate with  $\alpha 2\beta 1$  [49]. Although the preferential ligand of  $\alpha 3\beta 1$  integrin has been identified as laminin-5 [50], this integrin may function as a subsidiary receptor of broad specificity. It can also bind to collagens and fibronectin [7], entactin [51] and thrombospon-

in [52]. Recently, Akula et al. [53] demonstrated that the human herpes virus-8 (HHV-8) interacts with  $\alpha 3\beta 1$  integrin by an RGD sequence. In our study, the absence of lag period in fibroblasts plated on laminin-5 during adhesion indicates that the signalling complex is directly available on that support as opposed to what is observed when the cells are plated on fibronectin, a more physiological support.

Activation of integrins leads to a mobilization of intracellular calcium, an ubiquitous cell signalling involved in adhesion, migration and many other functions including gene expression and apoptosis [54]. In our fibroblasts, suppression of the DGEA-induced  $[Ca^{2+}]_i$  rise by monoclonal antibodies suggests the involvement of integrin(s) of the  $\beta 1$  family in the process. The blocking antibodies against the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  integrin subunit failed to suppress the response to DGEA suggesting that neither the integrin  $\alpha 1\beta 1$  nor  $\alpha 2\beta 1$  is the transducing receptor. A similar observation was made in the SaOS-2 cells treated with a panel of different monoclonal anti- $\alpha 2$  antibodies which also failed to block the DGEA-induced  $[Ca^{2+}]_i$  transients [20]. Furthermore, the efficient induction of  $[Ca^{2+}]_i$  signalling by DGEA in rhabdomyosarcoma cells (personal results) which lack the  $\alpha 2$  integrin [55] supports the existence of another pathway for the reception of the message. Antibodies against the  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  and  $\alpha v$  integrin subunits, alone or in combination, also failed to inhibit the  $[Ca^{2+}]_i$  signalling induced by DGEA. The  $\alpha 11\beta 1$  integrin also recognize type I collagen [9]. The lack of function blocking antibodies for  $\alpha 11$  precluded testing its participation in the peptide-induced  $Ca^{2+}$  signalling at the present time. GFOGER is the recognized ligand of the integrin  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - and  $\alpha 11$ -I domain [56,12]. As this peptide GFOGER in triple helical or denatured form does not induce a  $Ca^{2+}$  transient, an alternative recognition site on the  $\beta 1$  integrins has to be considered for the  $Ca^{2+}$  signalling induced by DGEA.

The existence of a non-classical receptive site for DGEA on (a)  $\beta 1$  integrin (s) can be postulated on the basis of the observations of Buhusi et al. [22]. Indeed, the haptotactic migration of neuronal and glial cells is potentiated by CHL1, a close homolog of the L1 cell adhesion molecules associated with  $\alpha 1\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins. This stimulation is suppressed by mutation of the DGEA motif of CHL1 suggesting therefore the existence of a receptor site in cis on  $\beta 1$  integrins. CHL1 has not been detected in murine fibroblasts using the antibody offered by Schachner [22] (unpublished information). Other membrane proteins might display the same role. A mechanism similar to that suggested for DGEA could also apply for RGDS. Indeed, the L1CAM operates in neural cells a function similar to CHL1 and contains an intrinsic RGD sequence critical for promoting migration on fibronectin [23]. An operational mechanism can be hypothesized on the basis of the above mentioned observations. Further work is planned to identify these integrins-associated proteins and their participation in the regulation of  $Ca^{2+}$  signalling induced by DGEA and RGDS.

The lack of responsiveness towards the peptides during adhesion and spreading on collagen for DGEA and fibronectin for RGDS may coincide with the ligand-specific recruitment of the integrins and the associated protein(s) [57]. A similar lag period during spreading was observed in fibroblasts plated on

the specific anti-integrin antibodies (i.e., anti- $\alpha 3$  and  $\beta 1$  for RGDS and anti- $\beta 1$  for DGEA). These observations are complemented by the recovery of responsiveness during spreading by specific proteolysis of the substrate, collagenase suppressing the lag period of DGEA on the collagen coat while trypsin does the same to RGDS on fibronectin. Degradation of the substrate is indeed known to allow some integrins to be freed from their ligand and recycle to the cell surface [58]. The hypothesis that the integrins are not available for signalling during adhesion and spreading has been further considered. As observed by immunostaining and confocal microscopy using anti- $\beta 1$  antibody, the distribution of these integrins is very similar during the lag period at 45 min of attachment and at 150 min when the cells are fully spread and reactive. On fibronectin, but to some extent also on collagen, the  $\beta 1$  integrins are more clustered along the spreading membrane at 45 min but also present on both the ventral and dorsal faces of the cells. At 150 min, they are more evenly distributed on the total surface, ventral and dorsal. As seen by Western blotting, the sub-cellular distribution (detergent soluble and insoluble fractions) of  $\beta 1$  integrins and vinculin are similar whatever the coat (collagen, fibronectin or poly-L-lysine) and the time after seeding (data not shown). It demonstrates that the availability of the  $\beta 1$  integrins and their associated focal adhesions does not explain the lag period related to spreading. This observation is, however, of limited significance since all  $\beta 1$  integrins might not behave similarly. The absence of lag period for DGEA in cells seeded on GFOGER, the known integrin recognition site of native collagen, needs further investigations. Although this peptide in triple helical configuration is a recognized ligand of  $\alpha 1$ - $\alpha 2$ - and  $\alpha 11\beta 1$  integrins, and allows attachment and spreading of the fibroblasts, it does not however represent the only recognition site of these integrins for collagen [11].

RGDS and DGEA, two peptides contained in the sequence of extracellular matrix proteins and their breakdown products, trigger in fibroblasts a calcium transient by acting on two different integrins of the  $\beta 1$  family. The calcium is released from intracellular stores by a similar pathway using tyrosine kinase(s), PLC and IP<sub>3</sub> for both peptides and requires phosphatase activity for RGDS alone. The present work adds support to the participation of a non classical recognition of the peptides by  $\beta 1$  integrins.

### Acknowledgements

We thank M. Aumailley for giving us laminin-5 and providing comments on the manuscript and M. Schachner for the polyclonal antibodies against CHL1. The kind gift of GFOGER by M. Hook is gratefully acknowledged. This work is supported by a grant (Prodex PEA 90099-CN1) and the European Space Agency programme, (ILSRA 2001-074).

### References

[1] M.A. Schwartz, Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 1003–1020.

[2] K. Ahlen, A. Berg, F. Stiger, A. Tengholm, A. Siegbahn, E. Gylfe, R.K. Reed, K. Rubin, Cell interactions with collagen matrices in vivo and in vitro depend on phosphatidylinositol 3-kinase and free cytoplasmic calcium, *Cell Adhes. Commun.* 5 (1998) 461–473.

[3] M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, *Nature* 309 (1984) 30–33.

[4] E. Ruoslahti, RGD and other recognition sequences for integrins, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12 (1996) 697–715.

[5] M.D. Sjaastad, W.J. Nelson, Integrin-mediated calcium signalling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium, *BioEssays* 19 (1997) 47–55.

[6] D. Gullberg, K.R. Gehlen, D.C. Turner, K. Ahlen, L.S. Zijenah, M.J. Barnes, K. Rubin, Analysis of  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 3\beta 1$  integrins in cell–collagen interactions: identification of conformation dependent  $\alpha 1\beta 1$  binding sites in collagen type I, *EMBO J.* 11 (1992) 3865–3873.

[7] E.A. Wayner, W.G. Carter, Identification of multiple cell adhesion receptors for collagen and fibronectin in human fibrosarcoma cells possessing unique alpha and common beta subunits, *J. Cell Biol.* 105 (1987) 1873–1884.

[8] R.H. Kramer, N. Marks, Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 4684–4688.

[9] T. Velling, M. Kusche-Gulberg, T. Sejersen, D. Gullberg, cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding I domain-containing beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 25735–25742.

[10] C.G. Knight, L.F. Morton, A.R. Peachey, D.S. Tuckwell, R.W. Farndale, M.J. Barnes, The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 35–40.

[11] Y. Xu, S. Gurusiddappa, R.L. Rich, R.T. Owens, D.R. Keene, R. Mayne, A. Hook, M. Hook, Multiple binding sites in collagen type I for the integrins alpha1 beta1 and alpha2 beta1, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 38981–38989.

[12] W.M. Zhang, J. Kapyla, J.S. Puranen, C.G. Knight, C.F. Tiger, O.T. Penttinen, M.S. Johnson, R.W. Farndale, J. Heino, D. Gullberg, alpha11 beta1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7270–7277.

[13] W.D. Staatz, K.F. Fok, M.M. Zutter, S.P. Adams, B.A. Rodriguez, S.A. Santoro, Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 7363–7367.

[14] Y. Takeuchi, K. Nakayama, T. Matsumoto, Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor- $\beta$  receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 3938–3944.

[15] M. Sato, N. Kojima, M. Miura, K. Imai, H. Senoo, Induction of cellular processes containing collagenase and retinoid by integrin-binding to interstitial collagen in hepatic stellate cell culture, *Cell Biol. Int.* 22 (1998) 115–125.

[16] G. Xiao, D. Wang, M.D. Benson, G. Karsenty, R.T. Franceschi, Role of the  $\alpha 2$ -integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the *Osf2* transcription factor, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 32988–32994.

[17] M. Mizuno, R. Fujisawa, Y. Kuboki, Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen  $\alpha 2\beta 1$  integrin interaction, *J. Cell. Phys.* 184 (2000) 207–213.

[18] K. Yamaguchi, H. Ura, T. Yasoshima, T. Shishido, R. Denno, K. Hirata, Establishment and characterization of a human gastric carcinoma cell line that is highly metastatic to lymph nodes, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 19 (2000) 113–120.

[19] M. Mizuno, Y. Kuboki, Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen, *J. Biochem.* 129 (2001) 133–138.

[20] T.J. McCann, W.T. Mason, M.C. Meikle, F. McDonald, A collagen peptide motif activates tyrosine kinase-dependent calcium signalling pathways in human osteoblast-like cells, *Matrix Biol.* 16 (1997) 273–283.



- [21] T.J. McCann, G. Terranova, J.W. Keyte, S.S. Papaioannou, W.T. Mason, M.C. Meikle, F. McDonald, An analysis of  $\text{Ca}^{2+}$  release by DGEA: mobilization of two functionally distinct internal stores in SaOs-2 cells, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) C33–C41.
- [22] M. Buhusi, B.R. Midkiff, A.M. Gates, M. Richter, M. Schachner, P.F. Maness, Close homolog of L1 (CHL1) is an enhancer of integrin-mediated cell migration, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 25024–25031.
- [23] K. Thelen, V. Kedar, A.K. Panicker, R.S. Schmid, B.R. Midkiff, P.F. Maness, The neural cell adhesion molecule L1 potentiates integrin-dependent cell migration to extracellular matrix proteins, *J. Neurosci.* 22 (2002) 4918–4931.
- [24] F. Mitjans, D. Sander, J. Adan, A. Sutter, J.M. Martinez, C.S. Jaggle, J.M. Moyano, H.G. Kreysch, J. Piulats, S.L. Goodman, An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice, *J. Cell Sci.* 108 (1995) 2825–2838.
- [25] P. Delvoye, P. Wiliquet, J.L. Leveque, B.V. Nusgens, Ch.M. Lapière, Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel, *J. Invest. Dermatol.* 97 (1991) 898–902.
- [26] M. Hayashi, K.M. Yamada, Domain structure of the carboxyl-terminal half of human plasma fibronectin, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 3332–3340.
- [27] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [28] C. Lambert, C. Lapière, B. Nusgens, An interleukin-1 loop is induced in human skin fibroblasts upon stress relaxation in a three-dimensional collagen gel but is not involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase 1, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 23143–23149.
- [29] J.P. Kao, A.T. Harootyan, R.Y. Tsien, Photochemically generated cytosolic calcium pulses and their detection by fluo-3, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 8179–8184.
- [30] O. Tharstrüp, P.J. Cullen, B.K. Drobak, M.R. Hanley, A.P. Dawson, Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 2466–2470.
- [31] J. Gafni, J.A. Munsch, T.H. Lam, M.C. Catlin, L.G. Costa, T.G. Molinski, I.N. Pessah, Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor, *Cell* 19 (1997) 723–733.
- [32] L. Jiang, V. Jha, M. Dhanabal, V.P. Sukhatme, S.L. Alper, Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in endothelial cells by the angiogenesis inhibitors endostatin and angiostatin, *Am. J. Physiol.: Cell Physiol.* 280 (2001) C1140–C1150.
- [33] G. Shankar, I. Davison, M.H. Helfrich, W.T. Mason, M.A. Horton, Integrin receptor-mediated mobilisation of intracellular calcium in rat osteoclasts, *J. Cell Sci.* 105 (1993) 61–68.
- [34] D. Thomas, P. Lipp, S.C. Tovey, M.J. Berridge, W. Li, R.Y. Tsien, M.D. Bootman, Microscopic properties of elementary  $\text{Ca}^{2+}$  release sites in non-excitable cells, *Curr. Biol.* 10 (2000) 8–15.
- [35] N. Itano, S. Okamoto, D. Zhang, S.A. Lipton, E. Ruoslahti, Cell spreading controls endoplasmic and nuclear calcium: a physical gene regulation pathway from the cell surface to the nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 5181–5186.
- [36] M.A. Schwartz, K. Denninghoff, Alpha v integrins mediate the rise in intracellular calcium in endothelial cells on fibronectin even though they play a minor role in adhesion, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 11133–11137.
- [37] P.W. Tsao, S.A. Mousa, Thrombospondin mediates calcium mobilization in fibroblasts via its Arg-Gly-Asp and carboxyl-terminal domains, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 23747–23753.
- [38] Z. Zimolo, G. Wesolowski, H. Tanaka, J.L. Hyman, J.R. Hoyer, G.A. Rodan, Soluble alpha v beta 3-integrin ligands raise  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  in rat osteoclasts and mouse-derived osteoclast-like cells, *Am. J. Physiol.* 266 (1994) C376–C381.
- [39] M.D. Sjaastad, B. Angres, R.S. Lewis, W.J. Nelson, Feedback regulation of cell-substratum adhesion by integrin-mediated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 8214–8218.
- [40] X. Wu, J.E. Mogford, S.H. Platts, G.E. Davis, G.A. Meininger, M.J. Davis, Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$  integrin ligands, *J. Cell Biol.* 143 (1998) 241–252.
- [41] M. Weismann, A.H. Guse, L. Sorokin, B. Broker, M. Frieser, R. Hallmann, G.W. Mayr, Integrin-mediated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  signalling in Jurkat T lymphocytes, *J. Immunol.* 158 (1997) 1618–1627.
- [42] M.D. Bootman, T.R. Cheek, R.B. Moreton, D.L. Bennett, M.J. Berridge, Smoothly graded  $\text{Ca}^{2+}$  release from inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  stores, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 24783–24791.
- [43] H.J. Visch, G.A. Rutter, W.J. Koopman, J.B. Koenderink, S. Verkaar, T. de Groot, A. Varadi, K.J. Mitchell, L.P. van den Heuvel, J.A. Smeitink, P.H. Willems, Inhibition of mitochondrial  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchange restores agonist-induced ATP production and  $\text{Ca}^{2+}$  handling in human complex I deficiency, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 40328–40336.
- [44] W.T. Arthur, L.A. Petch, K. Burchidge, Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism, *Curr. Biol.* 10 (2000) 719–722.
- [45] K.M. Yamada, B. Geiger, Molecular interactions in cell adhesion complexes, *Curr. Opin. Cell Biol.* 9 (1997) 76–85.
- [46] A. Hall, Rho GTPases and the actin cytoskeleton, *Science* 279 (1998) 509–514.
- [47] N.A. Hotchin, A. Hall, The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases, *J. Cell Biol.* 131 (1995) 1857–1865.
- [48] C.F. Deroanne, D. Hamelryckx, T.T. Ho, C.A. Lambert, P. Catroux, C.M. Lapière, B.V. Nusgens, Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway, *J. Cell Sci.* 118 (2005) 1173–1183.
- [49] R.B. Lichtner, A.R. Howlett, M. Lerch, J.A. Xuan, J. Brink, B. Langton-Webster, M.R. Schneider, Negative cooperativity between  $\alpha 3\beta 1$  and  $\alpha 2\beta 1$  integrins in human mammary carcinoma MDA MB 231 cells, *Exp. Cell Res.* 240 (1998) 368–376.
- [50] W.G. Carter, M.C. Ryan, P.J. Gahr, Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes, *Cell* 65 (1991) 599–610.
- [51] S. Dedhar, K. Jewell, M. Rojiani, V. Gray, The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin alpha3/beta1, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 18908–18914.
- [52] H.C. Krutzsch, B.J. Choe, J.M. Sipes, N.H. Guo, D.D. Roberts, Identification of an alpha(3)beta(1) integrin recognition sequence in thrombospondin-1, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 24080–24086.
- [53] S.M. Akula, N.P. Pramod, F.Z. Wang, B. Chandran, Integrin  $\alpha 3\beta 1$  (CD49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells, *Cell* 108 (2002) 407–419.
- [54] P.A. Janmey, The cytoskeleton and cell signalling: component localization and mechanical coupling, *Physiol. Rev.* 78 (1998) 763–781.
- [55] B.M. Chan, P.D. Kassner, J.A. Schiro, H.R. Byers, T.S. Kupper, M.E. Hemler, Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin alpha subunit cytoplasmic domains, *Cell* 68 (1992) 1051–1060.
- [56] J. Emsley, C.G. Knight, R.W. Farndale, M.J. Barnes, R.C. Liddington, Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1, *Cell* 101 (2000) 47–56.
- [57] M.A. Schwartz, S.J. Shattil, Signalling networks linking integrins and Rho family GTPases, *TIBS* 25 (2000) 388–391.
- [58] R. Visse, H. Nagase, Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry, *Circ. Res.* 92 (2003) 827–839.



#### **4.4. CONCLUSIONS**

Ce modèle expérimental répond aux exigences des vols paraboliques, puisque l'ajout de peptides mimétiques des macromolécules de la matrice extracellulaire déclenche un flux calcique très précoce (endéans  $\pm 5$  secondes) et transitoire (de 30 à 120 secondes, selon les peptides) dépendant de voies de signalisation que nous avons identifiées. L'analyse des flux calciques induits par ces peptides mimétiques durant les périodes de microgravité au cours de vols paraboliques pourrait apporter des éléments de compréhension de la perception de la gravité au travers des intégrines. La transposition de ce modèle expérimental dans l'Airbus A300 nécessitera néanmoins la mise en place de systèmes de mesure adéquats que nous avons déjà eu l'occasion de tester avec EADS Astrium S.A. (photodiode et caméra CCD) ou qui sont actuellement en cours de développement par l'ESA (microscope confocal).

## ***Conclusions de la partie I***

La gravité est une force ubiquitaire et un facteur environnemental permanent qui a joué un rôle majeur dans l'évolution de la vie terrestre et qui continue à avoir un impact considérable au cours du développement embryonnaire et sur de multiples processus biophysiques et physiologiques affectant les organismes adultes. L'avènement de l'exploration spatiale a pour la première fois confronté l'Homme à des conditions d'apesanteur relative. De nombreuses études démontrent clairement que les astronautes présentent, à des degrés divers, des problèmes de santé affectant notamment le tissu osseux, la masse musculaire, le réseau vasculaire et la résistance immunitaire. La complexité des organismes multicellulaires ne laisse que peu de possibilités d'explorer directement *in vivo* les mécanismes cellulaires et moléculaires altérés en microgravité. Nous nous sommes donc tournés, tout comme de nombreux chercheurs impliqués dans ce domaine, vers la biologie cellulaire pour tenter d'identifier des cibles pharmacologiques visant à corriger ces altérations.

Dans l'introduction de cette première partie, nous avons développé les bases scientifiques de notre travail et décrit les options expérimentales que nous avons choisies pour aborder de façon pertinente le problème de la mécano-réception, de la mécano-transduction et de la mécano-réaction au niveau cellulaire. Les RhoGTPases sont indéniablement des molécules clé à la fois pour l'intégration des signaux biochimiques et mécaniques, et pour leur transduction vers la machinerie cellulaire. Nous avons participé au sein du laboratoire au développement des outils biologiques, cellulaires et moléculaires requis pour la réalisation de ce programme ainsi qu'à la mise au point de techniques et stratégies expérimentales adaptées aux conditions contraignantes de la biologie spatiale. Le plan de l'expérience emmenée dans le vol FOTON-M3 avait pris en considération le maximum d'éléments contraignants tels que les délais d'attente, les variations de température ou la fixation et la conservation des échantillons dans des conditions non-optimales. C'est malheureusement une défaillance technique de l'incubateur qui a réduit de façon significative la validité et l'interprétation de nos résultats. Ceux-ci semblent toutefois confirmer le rôle des RhoGTPases, en particulier Rac1, dans la régulation des mécanismes influencés par la microgravité. Par ailleurs, l'ensemble de cette mission, y compris la mise en évidence d'éléments confondants pouvant conduire à une interprétation erronée de certains résultats, nous a permis d'accumuler des connaissances et un savoir-faire qui seront des plus utiles

pour la planification et la réalisation d'une autre expérience centrée sur les RhoGTPases qui devrait avoir lieu dans l'ISS dans le courant de l'année 2012.

Notre deuxième approche, destinée à être expérimentée au cours de vols paraboliques, n'implique pas directement les RhoGTPases et le cytosquelette, mais s'adresse cependant au flux des ions calciques, un second messenger primitif et ubiquitaire impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques, induit par des signaux ciblant les intégrines.

***PARTIE II : CHAMPS ÉLECTROMAGNÉTIQUES (EMF) ET  
SIGNALISATION INTRACELLULAIRE***

## ***Introduction***

Pour répondre à l'inquiétude de la population vis-à-vis des problèmes potentiels de santé engendrés par les lignes à haute tension, les Services Fédéraux des Affaires Scientifiques, Techniques et Culturelles (SSTC) du gouvernement belge ont mis sur pied un programme d'impulsion « Risques pour la santé (1990-1994) » auquel notre laboratoire a participé en collaboration avec deux autres équipes biomédicales supportées par une équipe d'ingénieurs-électriciens. Ce programme fédéral a été suivi par la création, sous l'impulsion d'Electrabel et d'Elia, d'un groupe de recherche multidisciplinaire, le « Belgian BioElectroMagnetic Group (BBEMG) » réunissant 6 équipes universitaires dont notre laboratoire qui en a été le coordinateur durant plusieurs années. Notre rôle au sein de ce groupe de recherche a été de tenter d'identifier des processus cellulaires modifiés par les EMF afin d'apporter ainsi des éléments biologiques objectifs qui permettraient d'évaluer une possible corrélation qui existerait, selon certaines études toujours controversées, entre l'exposition aux EMF et l'apparition de certaines pathologies.

### **1. EMF d'origine naturelle et générés par l'activité humaine**

Les champs électriques et magnétiques sont naturellement présents en dehors de toute intervention humaine. Sur Terre, un champ électrique naturel est produit par la séparation de charges entre la planète et l'ionosphère (95). Son intensité varie en fonction de la météorologie et de la situation géographique. Le champ électrique moyen à la surface de la Terre est de 130V/m (96). Le champ magnétique terrestre est statique et est dû aux dipôles magnétiques induits par la rotation du cœur ferreux planétaire. Son intensité, exprimée en Tesla (T), est de  $\pm 70\mu\text{T}$  aux pôles et tend vers 0 à l'équateur (97). L'activité humaine de nos sociétés industrialisées génère également des EMF : applications médicales, production, distribution et utilisation de l'électricité, transmission d'informations en radiofréquences, ... . Depuis que l'énergie électrique fait partie intégrante de notre mode de vie moderne, des EMF alternatifs de très basse fréquence (50-60Hz) sont omniprésents dans l'environnement. Dans les habitations, la moyenne des intensités des EMF est de l'ordre de  $0.05\mu\text{T}$ . Au voisinage de certains appareils domestiques (sèche-cheveux, rasoir), les valeurs instantanées peuvent cependant atteindre quelques centaines de  $\mu\text{T}$  mais décroissent rapidement en fonction du carré de la distance. Lors des expositions

professionnelles, les intensités moyennes observées vont de 0.4 à 1 $\mu$ T, avec des maxima pouvant toutefois atteindre près de 10 mT dans certaines applications (98).

Alors que les EMF ne sont pas perturbés par le corps humain, ils y induisent cependant des courants électriques (perpendiculaires aux EMF eux-mêmes) dont l'intensité dépend de celle du champ extérieur et de la conductivité des organes et des tissus (98).

## **2. Etudes épidémiologiques**

Les premières études épidémiologiques qui ont lancé la question des effets délétères potentiels des EMF sont celles de Wertheimer and Leeper (1979) (99). Ces auteurs suggéraient une association entre l'exposition résidentielle aux EMF générés par le réseau de distribution électrique et l'incidence des cancers, en particulier les leucémies chez les enfants du Colorado. Milham en 1985 (100) publie une lettre relatant une augmentation de la mortalité par leucémie chez les travailleurs du secteur de l'électricité de l'Etat de Washington. L'OMS écrit dans son rapport de 2007 (98) qu'il existe une association positive faible entre les leucémies infantiles et l'exposition à des EMF. Toutefois, les méta-analyses ne permettent pas de dégager de score significatif. De même, de nombreuses études épidémiologiques portant sur l'état de santé général (fatigue, anxiété, céphalées, tendances dépressives voire suicidaires), sur divers types de cancers ou sur l'issue d'une grossesse restent polémiques et ne permettent pas d'aboutir à des conclusions fiables et définitives. L'impact sur la santé publique serait donc incertain. L'IARC et l'OMS classent les EMF comme des agents potentiellement cancérigènes, respectant ainsi un principe de précaution. Selon l'OMS, l'interprétation des données épidémiologiques est rendue difficile par l'absence de données expérimentales objectivant une relation de cause à effet entre les EMF et une modulation des fonctions cellulaires.

## **3. Interactions des EMF avec les structures biologiques**

Les mécanismes potentiels d'interactions des EMF avec les structures biologiques se situent, selon les théories revues par Repacholi et Greenebaum (101), au niveau des membranes cellulaires par l'induction de courants et de champs électriques et par des modifications, minimes, du potentiel de membrane. Tout comme la force gravitationnelle, le potentiel énergétique des EMF est insuffisant pour modifier la conformation des protéines

ou leur capacité fonctionnelle. La subtilité de leurs effets pourrait se manifester sur des processus dynamiques participant à la signalisation intracellulaire prenant place en périphérie de la membrane cellulaire, tels que translocation de molécules, diffusion, interactions protéines-protéines, ou association avec des éléments du cytosquelette. De plus, dans des systèmes biologiques en équilibre instable, la possibilité d'effets non-linéaires (102) et de résonance (103,104) pourrait être considérée.

Parmi les effets biologiques décrits des EMF, beaucoup de travaux se sont adressés à leur action sur les mouvements des ions calciques (105-107). Par ailleurs, les EMF modèleraient l'activation transitoire de PKC (108), sa translocation à la membrane (109) et le relargage d'IP3 (110). Une stimulation des tyrosines-kinases de la famille Src (111) a été rapportée, ainsi qu'une modulation du profil de synthèse protéique ou de l'expression de certains gènes, dont ceux des « heat shock proteins » (HSP) et de certains oncogènes (112-115). Ces conclusions restent controversées, plusieurs expériences parmi les plus significatives n'ayant pu être reproduites par d'autres auteurs (116). D'autres mécanismes ont été évoqués tels que l'induction de champs électriques dans les réseaux neuronaux, la stimulation de fibres neuronales myélinisées (117), la modulation de l'effet des radicaux libres (118,119) ou encore la perturbation des microparticules de magnétite présentes dans l'organisme à l'état de trace (120).

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal dans les domaines de la cancérologie, de l'hématologie, de l'immunologie, de la reproduction et du développement ont été réalisées durant ces trois dernières décennies. L'OMS considère que la plupart des études menées ont produit des résultats ambigus et/ou insuffisants et non-reproductibles. Une génotoxicité des EMF a également été évoquée (121) mais n'a pas pu être confirmée par d'autres groupes (122). Bien que les EMF ne soient pas mutagènes par eux-mêmes, une activité co-carcinogène avec des agents mutagènes connus a été suggérée mais peu explorée. C'est dans ce cadre que nous avons évalué la possibilité d'une modulation des effets des radiations UV par les EMF (voir chapitre II.3).

#### **4. Le Calcium, cible potentielle des EMF**

Parmi les cibles biologiques potentielles des EMF, une des plus citées est l'homéostasie du calcium. L'ion calcium est un second messenger ancestral, ubiquitaire, utilisé par de nombreux types cellulaires pour transmettre une large variété de signaux extracellulaires. Il contribue au contrôle de nombreuses fonctions physiologiques (123,124). Ce large éventail de fonctions supporte le choix du calcium comme rapporteur sensible des altérations potentielles affectant de nombreuses voies de signalisation et explique l'attention considérable portée à l'effet des EMF sur la signalisation calcique.

De nombreuses études des effets potentiels des EMF sur le calcium ont été effectuées dans de nombreux types cellulaires (voir tableau 5), mais principalement dans les lignées lymphocytaires (126-128, 105-107, 131-135 et 143-145). Alors que certains auteurs observent que les EMF modulent les flux calciques (126-128, 105-107, 132-137 et 139), d'autres n'ont pu reproduire ces résultats (129-131, 138 et 141). Les effets des EMF ont été également étudiés sur l'activité des enzymes dépendantes du calcium, comme par exemple la calmoduline (125).



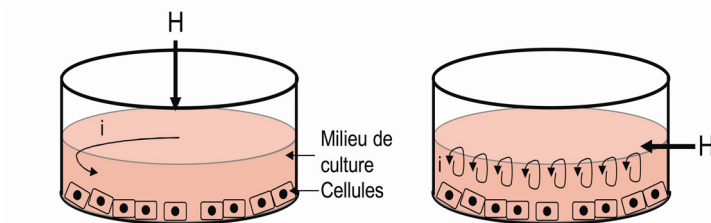
Cellules	Expositions	Résultats	Références
Lymphocytes T de rat quiescents ou activés par la concanavalin-A	Champ magnétique de 60Hz produisant un champ électrique de 1mV/cm	Augmentation de la concentration de calcium dans les lymphocytes activés par la concanavalin-A	(126)
Lymphocytes T de rat quiescents ou traités par des agents mitogènes	Champ magnétique pulsé de 3Hz, quasi-rectangulaire à des intensités de 0, 1.6, 6.5 et 28 mT	Modulation de l'effet de la concanavalin-A	(105)
Lymphocytes T	22mT 60Hz sinusoïdal	Influx de calcium accru lors de l'activation mitogénique	(107)
Cellules humaines leucémiques Jurkat et cellules mononucléaires sanguines	100μT 50Hz sinusoïdal	Induction d'oscillations de calcium intracellulaire comparable à l'influx induit par un anticorps anti-CD3	(106)
Cellules humaines leucémiques Jurkat	De 40 à 300 μT et de 5 à 100Hz sinusoïdal	Effet maximum d'induction d'oscillations de calcium par les EMF à 150μT et 50Hz	(127)
Cellules humaines leucémiques Jurkat	150μT et 50Hz sinusoïdal	Les Jurkat sans CD45 ou sans le domaine intracytoplasmique de CD45 ne sont pas capables de présenter des oscillations de calcium intracellulaire induites	(128)
		Critiques virulentes des résultats de Liburdy	(129)
		Droit de réponse	(130)
Cellules humaines leucémiques Jurkat	150μT et 50Hz sinusoïdal	Absence de reproduction des résultats de Lindström et al., 1993 et 1995a	(131)
Cellules humaines leucémiques Jurkat	150μT et 50Hz sinusoïdal	Le laboratoire de Lindström reproduit les résultats obtenus préalablement mais le pourcentage de réponse est plus faible	(132)
Cellules humaines leucémiques Jurkat	Différents champs magnétiques : statique, 100μT 60 Hz sinusoïdal, 78μT statique et une combinaison de 100μT 60 Hz et de 78μT statique (AD + DC).	Diminution du taux de calcium intracellulaire induit par les EMF de 78μT statique et 100μT 60Hz plus 78μT statique	(133)
Cellules humaines leucémiques Jurkat et cellules mononucléaires sanguines	Champ électromagnétique statique de 4,75T	Module les mouvements de calcium intracellulaire et la prolifération cellulaire	(134)
Lymphocytes et Jurkat	Combinaison de champs électromagnétiques statique (4,75T) et pulsé (700μT)	Modulation du taux de calcium et des réponses biologiques en aval variables en fonction du type de cellules	(135)
Ostéoblastes primaires sans ou avec sérum dans le milieu de culture	Combinaison de champs magnétiques statiques et sinusoïdaux avec 20 μT statique + 40μT p-p à soit 15.3 ou 76.6 Hz, et 130μT statique + soit 500 ou 1000μT p-p à 100 Hz	Pas d'effet des EMF en absence de sérum. En présence de 2% de sérum, on observe une augmentation de calcium intracellulaire mais pas d'effet des EMF sur l'induction de calcium intracellulaire par la bradykinine.	(136)
Fibroblastes progéniteurs mitotiques et fibrocytes post-mitotiques	8mT 20Hz	Modulation de la concentration de calcium intracellulaire par les EMF dépendant de l'état de différenciation des cellules	(137)
Cellules neuroendocriniennes bovines	Entre 10μT et 2mT à 60Hz	Fluctuations spontanées de calcium intracellulaire non affectées par les EMF	(138)
Cellules neuroendocriniennes bovines	Champs magnétiques variables de 70mT à 1,7T en fonction du temps	Suppression de l'augmentation de calcium intracellulaire induit par la bradykinine à 1.4T	(139)
Cellules neuroendocriniennes bovines	Champs magnétiques de 1,51T en fonction du temps	Suppression de l'augmentation de calcium intracellulaire induit par la bradykinine mais pas d'influence sur la production d'inositol IP(3)	(140)
Cellules ostéoblastiques ROS17/2.8	Champs magnétiques sinusoïdaux d'intensités et de fréquences variables	Pas de modulation positive ou négative de la concentration de calcium intracellulaire, de la concentration moyenne ou des augmentations transitoires de calcium intracellulaire	(141)
Fibroblastes humains de peau et ostéoblastes de rat	7 et 8mT 20Hz	Modulation transitoire de PKA	(142)
HL-60	100μT 50Hz	Activation de CREB dépendant du calcium intracellulaire, mais pas de PKA, d'Erk1/2, de PKC et p38	(143)
HL-60, MCF-7, and HTB-124	0,8 à 300μT 60Hz	Phosphorylation d'Erk1/2 par les EMF	(144)
HL-60, MCF-7 et fibroblastes de rat 3Y1	100μT 60Hz	Activation de MAPK par les EMF comparable à celle induite par le TPA	(145)

**Tableau 5 : Liste non-exhaustive de publications s'intéressant aux EMF et au calcium.**

## 5. Stratégies expérimentales

### 5.1. Les systèmes d'expositions

L'exposition aux EMF de culture cellulaire *in vitro* induit un courant électrique dans le milieu de culture. Ce courant est perpendiculaire au champ d'induction électromagnétique (figure 23) et provoque, par effet Joule, un accroissement de la température du milieu.

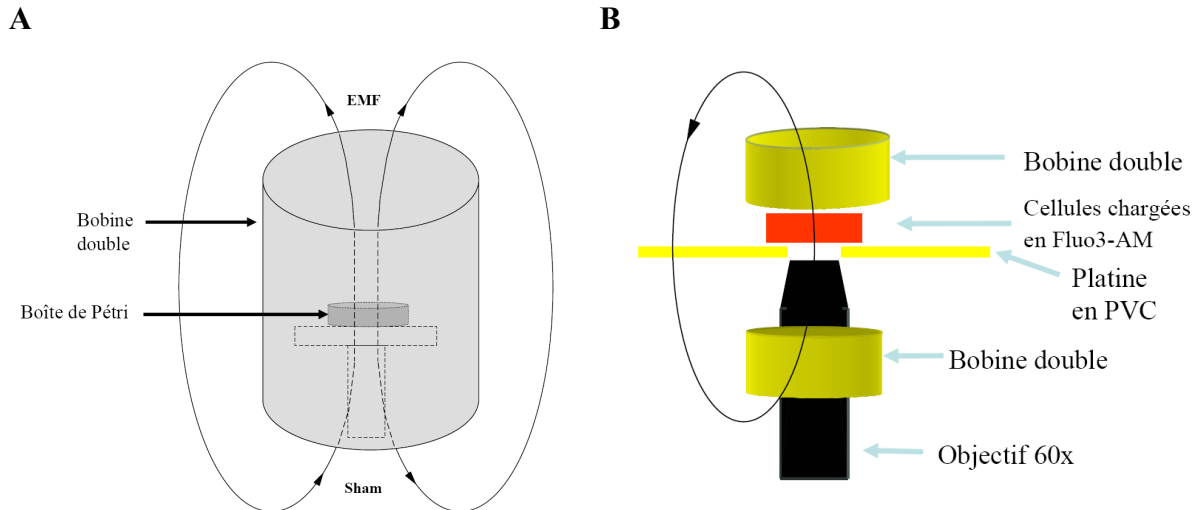


*Figure 23 : Les EMF (H) induisent dans le milieu de culture des courants électriques (i) dont l'orientation est perpendiculaire à celle du vecteur H.*

Celle-ci a donc été soigneusement contrôlée grâce à un thermocouple constantan-cuivre, insensible aux EMF, qui commande la thermostatisation d'un bain dont l'eau circule en contact avec les boîtes de culture.

La fréquence des EMF a été choisie à 50Hz et de type sinusoïdal, la fréquence d'alimentation domestique en Europe. Les champs d'induction étudiés avaient une intensité variant de 100 $\mu$ T (valeur maximale recommandée par l'ICNIRP pour l'exposition de la population) et 450 $\mu$ T (valeur moyenne d'exposition à certains appareils domestiques). Nous considérons que les études *in vitro* utilisant des intensités d'induction largement supérieures (de plusieurs mT à quelques T) ne s'adressent pas à l'exposition environnementale rencontrée par la population en général et sortent donc du cadre de notre étude. L'évaluation de leurs effets directs est en outre largement compromise en raison d'artefacts induits dont, notamment l'effet Joule.

Les systèmes d'expositions sont constitués soit de bobines simples de géométrie variable soit d'une paire de bobines Helmholtz (figure 24A) dans lesquelles le courant électrique peut circuler dans un sens dans l'une des bobines (production d'EMF) ou dans des sens opposés dans les deux bobines, condition pour laquelle les deux champs s'annulent. Cette exposition fictive que nous appellerons « Sham » permet d'éliminer au maximum les possibilités d'artefacts liées aux conditions expérimentales (vibrations, échauffement, ...).



**Figure 24 :** *Systèmes d'expositions des cellules aux EMF. A. Bobine double permettant d'exposer les cellules aux EMF ou de les maintenir en conditions contrôles (Sham). B. Système d'exposition des cellules aux EMF modifié pour être utilisé sur un microscope confocal*

## 5.2. Les modèles expérimentaux

Deux approches expérimentales ont été développées. Nous avons d'abord évalué l'effet des EMF sur les flux de calcium libre intracellulaire induits par les peptides mimétiques de la matrice extracellulaire (RGDS et DGEA) ou par des facteurs sériques. La deuxième approche s'est adressée à la modulation potentielle par les EMF des effets d'un facteur environnemental délétère : les radiations UV-B.

L'analyse des mouvements calciques est réalisée à l'aide d'un microscope confocal à LASER selon le procédé décrit dans la première partie du mémoire et dans la publication n°1. Le système d'exposition (figure 24B) est constitué d'une double paire de bobines de Helmholtz placées de part et d'autre de la platine du microscope mais sans la toucher, permettant ainsi une exposition des cellules à un champ réel ou leur maintien dans des conditions contrôles « Sham ». La platine d'origine en métal a été remplacée par une platine en PVC afin d'éviter toute perturbation des EMF.

Les cellulesensemencées dans un Lab-Tek® sont incubées durant 1h dans du DMEM sans sérum contenant 10µM de Fluo3-AM, un fluorophore activé par les ions calciques dans le milieu intracellulaire après clivage par les estérases cellulaires (voir publication n°1). Les cultures sont ensuite lavées à deux reprises et utilisées endéans 5 minutes. Les mesures de variation de fluorescence représentant la vague de calcium intracellulaire sont effectuées

en temps réel et de manière individuelle sur chacune des 10 à 15 cellules présentes dans le champ optique. Elles sont enregistrées et analysées par le software Meridian selon les modalités décrites dans la publication n°1.

## ***Résultats***

### **1. Effet des EMF sur le flux de calcium intracellulaire induit par RGDS et DGEA**

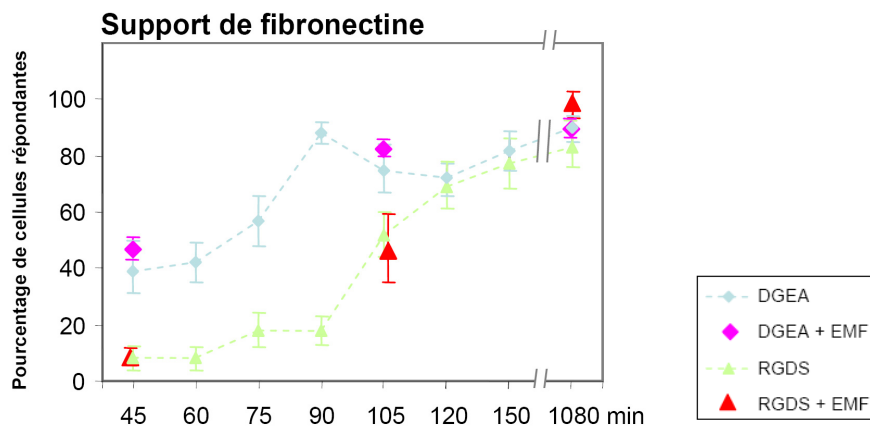
Comme nous l'avons démontré dans la première partie de notre mémoire, RGDS et DGEA, deux peptides dont les séquences sont présentes respectivement dans la fibronectine et le collagène de type I, induisent un flux transitoire de calcium intracellulaire dans les fibroblastes dermiques. Ce flux de calcium dépend de voies de signalisation impliquant des tyrosines kinases et phosphatases, ainsi que la phospholipase C avec production d'IP3 et relargage de calcium à partir des réserves calciques intracellulaires. Cette signalisation calcique dépend de l'intégrine  $\alpha_3\beta_1$  pour RGDS et de la sous-unité  $\beta_1$  pour DGEA sans qu'aucune sous-unité  $\alpha$  n'ait été identifiée. Durant l'adhésion des cellules sur le collagène ou la fibronectine, une période réfractaire à la stimulation par les peptides semble bien liée à la non-disponibilité des intégrines spécifiques reconnaissant chacun des peptides.

Ce modèle expérimental, dont les voies de signalisation ont été clairement définies (publication n°1), nous a paru pertinent pour mettre en évidence un effet potentiel des EMF.

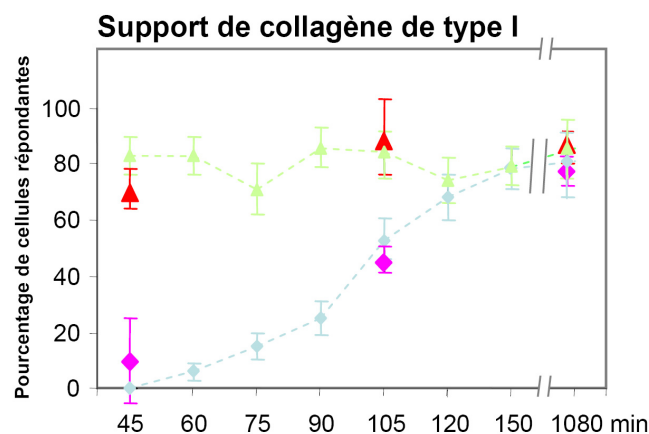
Les cellules en culture sur un support de fibronectine ou de collagène de type I sont exposées à un EMF sinusoïdal (50Hz) vertical de 450 $\mu$ T puis stimulées après quelques secondes d'exposition par les peptides RGDS ou DGEA à trois temps différents après l'ensemencement, à savoir :

- à 45 minutes, lorsque les cellules sont en période réfractaire pour le peptide spécifique d'un substrat (RGDS / fibronectine ; DGEA / collagène de type I).
- à 105 minutes, lorsque  $\pm$  50% des cellules répondent aux peptides par un flux de calcium intracellulaire.
- à 18 heures, lorsque 80% des cellules répondent aux peptides.

A.



B.



**Figure 25 : Pourcentage de cellules répondant par un flux calcique à l'ajout de peptides.** Les peptides DGEA (-◆-) ou RGDS (-▲-) ont été ajoutés à des temps croissants après ensemencement des cellules, sur un support de fibronectine (A) ou de collagène de type I (B). Une exposition aux EMF deux minutes avant l'ajout de peptides à 45 min, 105 min et 18h (◆ et ▲) ne module pas la réponse des cellules à ces deux peptides.

Les EMF ne modifient pas la réponse des fibroblastes aux peptides RGDS et DGEA, quelque soit le support sur lequel ils sont ensemencés ou le moment où survient l'exposition (durant, pendant ou après la période réfractaire au stimulus peptidique) (figure 25). Par ailleurs, les paramètres du flux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire (intensité, durée) ne sont pas influencés par les EMF. De même, la réponse induite par la bradykinine, l'agoniste de référence induisant un flux calcique dans 100% des cellules, n'est pas modifiée par les EMF dans nos conditions expérimentales, ce qui confirme les observations de Reinbold et Pollack (136) qui avaient évalué l'effet d'EMF à des intensités variant de 40 à 1000 $\mu$ T. A l'inverse, Ikehara et al. (139,140) avaient observé une réduction de la stimulation par la bradykinine mais uniquement par des EMF d'intensités très largement supérieures (1.5T) à celles des expositions domestiques.

## **2. Effet des EMF sur le flux de calcium intracellulaire induit par le sérum**

Dans la continuité de notre stratégie expérimentale visant à étudier les interactions potentielles des EMF avec des événements de la signalisation intracellulaire, nous nous sommes tournés vers un modèle utilisant le sérum comme agent inducteur de flux calciques. Les nombreux facteurs de croissance et médiateurs biologiques contenus dans le sérum sont en effet capables d'induire des flux calciques de nature transitoire et oscillante (146). Plusieurs mécanismes sont potentiellement responsables du caractère oscillatoire des vagues calciques en faisant intervenir des boucles négatives et positives de rétrocontrôle (147-150).

Notre démarche expérimentale a consisté à établir les conditions optimales d'induction d'oscillations calciques par le sérum, à déterminer les voies de signalisation qui les contrôlent et à évaluer l'effet de l'exposition aux EMF sur ces signaux. Ces résultats résumés ci-après sont détaillés dans la publication n°2.

Publication n°2

**Very low frequency electromagnetic field sustains serum-induced intracellular calcium oscillations in fibroblasts.**

P. Mineur, Ch. A. Lambert, A. Colige, Ch. M. Lapière and B. V. Nusgens.

En voie de soumission

### **2.1. Résumé des résultats de la publication n°2**

1. Une concentration en sérum de 0.2% permet d'induire des oscillations de  $Ca^{2+}$  dans environ 40% des cellules, une condition permettant la mise en évidence à la fois d'effets activateurs ou inhibiteurs.
2. Le pourcentage de cellules oscillantes décroît en fonction du temps, le retour au niveau basal s'opérant en plus ou moins 15 minutes.
3. Les mécanismes régulant la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire sous la dépendance de facteurs sériques ont été déterminés à l'aide d'une série d'agents pharmacologiques (tableau 6). Les oscillations calciques font intervenir à la fois le

Ca<sup>2+</sup> du milieu extracellulaire (inhibition par l'EGTA) et des réserves intracellulaires (inhibition par le BAPTA-AM). Elles requièrent la PLC $\gamma$  et une (des) activité(s) tyrosine-kinase(s) ainsi que les pompes à calcium ATPase-dépendantes du réticulum endoplasmique, comme le démontrent leur suppression par les inhibiteurs spécifiques (respectivement, U73122, la génistéine et la thapsigargine). A l'inverse, les tyrosines kinases de la famille Src ne semblent pas impliquées comme l'indique l'absence d'effet de l'herbimycine A.

Agent inhibiteur	Cible (s)	% de cellules oscillantes	Nombre (cellules) (expériences)	
Contrôle	-	45	29	3
BAPTA-AM	Ca <sup>2+</sup> intracellulaire	0*	22	2
EGTA	Ca <sup>2+</sup> extracellulaire	0*	28	3
Thapsigargine	ER Ca <sup>2+</sup> -ATPase	5*	20	2
U73122	PLC $\gamma$	0*	27	3
Génistéine	Tyrosine kinases	3*	29	3
Herbimycine A	Tyrosine kinases de la famille Src	46	24	3

*Tableau 6 : Effet d'inhibiteurs des diverses voies de signalisation sur les oscillations de calcium induites dans les fibroblastes par l'ajout de 0.2% de sérum. \* indique une différence significative (P < 0.005) par rapport au contrôle.*

4. L'effet des EMF (450 $\mu$ T-50Hz) a été évalué dans 3 conditions expérimentales.

i) En absence de sérum (niveau basal, 5% de cellules oscillantes)

Les EMF n'induisent pas de vague calcique intracellulaire, alors que pratiquement toutes les cellules répondent à la bradykinine.

ii) En présence de 10% de sérum (activation maximum, 80% de cellules oscillantes)

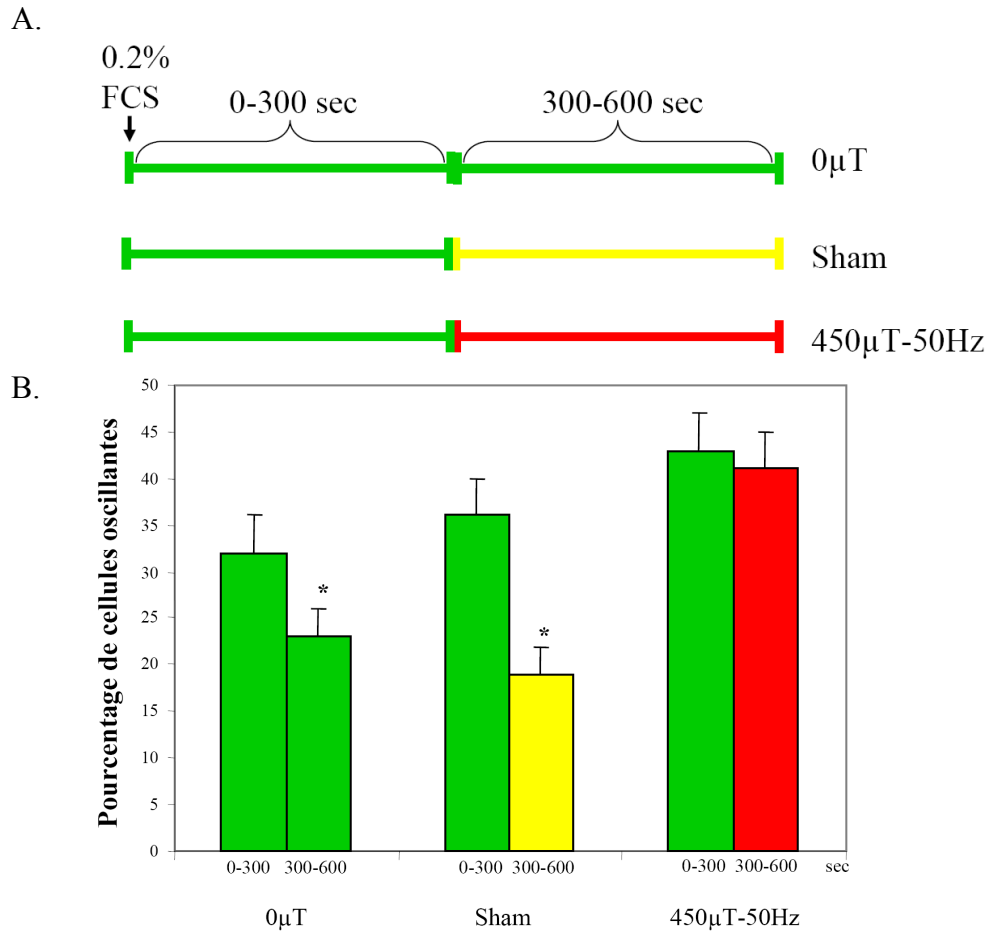
L'exposition aux EMF n'induit aucune modification perceptible ni du nombre de cellules oscillantes ni des paramètres (amplitude, fréquence) des oscillations.

iii) En présence de 0.2% de sérum (40% de cellules oscillantes)

Le nombre de cellules oscillantes et non-oscillantes a été enregistré durant 300 secondes en conditions basales, puis durant les 300 secondes suivantes soit en



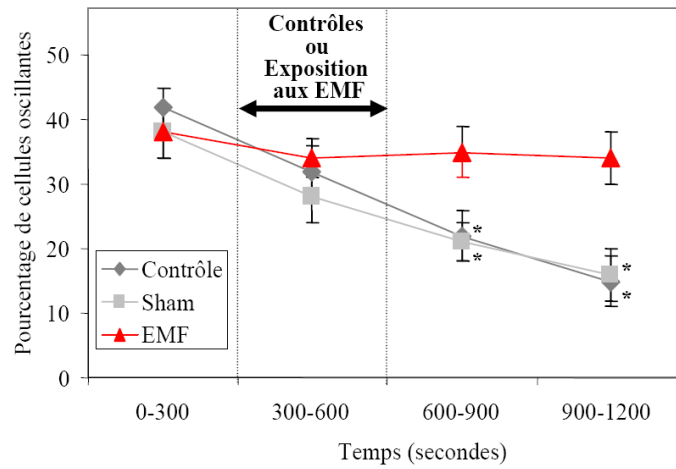
absence d'exposition ( $0\mu\text{T}$ ), sous une exposition « nulle » obtenue avec la double bobine en anti-parallèle (Sham) ou sous une exposition réelle ( $450\mu\text{T}$ -50Hz) (figure 26A).



**Figure 26 : Schéma expérimental d'exposition des fibroblastes aux EMF.** Les cellules sont mises en présence de 0.2% de sérum (FCS) et observées durant 300 secondes. Elles sont ensuite maintenues en conditions contrôles ( $0\mu\text{T}$ , ou Sham) ou exposées aux EMF ( $450\mu\text{T}$ -50Hz) (A). Pourcentage de cellules présentant des oscillations de calcium durant les deux phases d'observation (B). \*  $p < 0.05$  (test du Chi-carré).

En moyenne, 37% des cellules présentent des oscillations de calcium durant les 300 premières secondes pour les trois groupes confondus (Figure 26B). Ce pourcentage se réduit, durant les 300 secondes suivantes à 23% dans les cellules non-exposées et à 19% dans les cellules fictivement exposées (Sham). Par contre, la proportion de cellules oscillantes reste élevée, de l'ordre de 40%, lorsque celles-ci sont exposées aux EMF. Ces oscillations persistent jusqu'à 10 minutes après l'arrêt de l'exposition tandis que le pourcentage de cellules oscillantes se réduit à 15% dans les conditions contrôles (figure 27). Une analyse réalisée sur base individuelle montre qu'il s'agit d'un processus de

stabilisation des oscillations dans les cellules activées et non d'une induction d'un flux de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cellules non-répondantes



**Figure 27 : Pourcentage de cellules oscillantes avant, pendant et après l'exposition aux EMF ou aux conditions Contrôles.** \* représente une différence significative par rapport à la période 0-300 secondes ( $p < 0.0001$  lors de l'analyse statistique par le test de Mantel-Haenszel).

## **2.2. Publication n°2**

# VERY LOW FREQUENCY ELECTROMAGNETIC FIELD SUSTAINS SERUM-INDUCED INTRACELLULAR CALCIUM OSCILLATIONS IN FIBROBLASTS.

P. Mineur, Ch. A. Lambert, A. Colige, Ch. M. Lapière and B. V. Nusgens\*.

*Laboratory of Connective Tissues Biology, University of Liège, Belgium;*

Short title: EMF and calcium oscillations.

Key words: Electromagnetic field, calcium, MAPK, fibroblasts

## **SUMMARY.**

The study was designed to investigate in vitro the effects of 50 Hz sinusoidal electromagnetic fields (450 $\mu$ T) on intracellular calcium ions transients in human dermal fibroblasts. EMF are not able to induce calcium oscillations in a serum-free medium neither to modulate oscillations induced by 10% of serum. At a sub-optimal concentration of serum (0.2%) that induces  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations in  $\pm 40\%$  of cells, EMF sustains the intracellular calcium oscillations in the responsive fibroblasts, but are not able to induce them in the non-responding cells. The 0.2% serum-induced phosphorylation of Erk1/2 and the proliferation rate of fibroblasts were not altered by EMF. The present study shows that extremely low frequency EMF are able to modulate intracellular calcium oscillations without any effect on MAPK and proliferation.

## **INTRODUCTION.**

Calcium is an ubiquitous second messenger that plays a significant role in many cell processes. The cytoplasmic free calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) frequently oscillates (calcium transients) during stimulation of non-excitabile cells (Brandman and Meyer, 2008).  $[Ca^{2+}]_i$  is strictly controlled, as this ion is toxic at high concentration, and can modulate a variety of functions such as contractility, proliferation, migration, protein synthesis, apoptosis and gene expression (Berridge, 1993; and Clapham, 1995).

A diversity of biological effects have been attributed to exposures to electromagnetic fields of various intensities and frequencies. It remains however highly controversial. Alterations in calcium transients by EMF have been observed in a number of cell types including lymphocytes (Liburdy, 1992; Walleczek and Budinger, 1992; Lindström et al., 1993 and 1995; Galvanovskis et al., 1996 and Mattsson et al., 2001), osteosarcoma cells (Fitzsimmons et al., 1994), astrocytoma cells (Aldinucci et al., 2000; Pessina et al., 2001) and dermal fibroblasts exposed to 8mT, an intensity

largely outside the environmental range (Löschinger et al., 1999). Some studies indicated that mitogens were required to observe the effects of EMF. For example, Liburdy (1992) and Walleczek and Budinger (1992) observed that EMF induced calcium transients in lymphocytes only in the presence of concanavalin-A, while other investigators showed EMF-induced effects in lymphocytes or fibroblasts in absence of mitogens (Lindström et al., 1993; 1995; Löschinger et al., 1999). A number of other studies were unable to replicate some of the above-mentioned effects of EMF. Garcia-Sancho et al. (1994) and Lyle et al. (1997) did not observe any effect on the calcium transients in lymphocytes in experimental conditions similar to those of Lindström. The data obtained by Liburdy were also debated, sometimes with animosity (Vergano, 1999 and Liburdy, 1999).

Growth factors induce the phosphorylation of MAPK by the Raf-MEK cascade (Peyssonaux and Eychene, 2001; Agell et al., 2002; Pouyssegur and Lenormand, 2003). The Erk1/2 pathway is involved in many physiological processes, including cell proliferation. Phosphorylated Erk1/2 translocate into the

---

\* Corresponding author: B.V. Nusgens  
Laboratory of Connective Tissues Biology  
University of Liège  
Tour de Pathologie B23/3  
4000 Sart-Tilman, Belgium

\* Telephone: 32 4 366 24 56  
Fax: 32 4 366 24 57  
E-Mail: Betty.Nusgens@ulg.ac.be

nucleus where they activate transcription factors. EMF between 100 and 300 $\mu$ T were shown to increase Erk1/2 phosphorylation in HL-60, HTB124 and MCF-7 cells (Jin et al., 2000; Nie and Henderson, 2003). However, Zhou et al. (2002) did not observe any modification of phosphorylated MAPK upon EMF exposure at similar intensity in HL-60 cells.

Our work aimed at analyzing variations of  $[Ca^{2+}]_i$  in normal human dermal fibroblasts in absence or presence of sub-optimal concentrations of FCS upon exposure to 450 $\mu$ T-50Hz sinusoidal electromagnetic fields, by using real-time, single cell confocal microscopy. We further investigated the correlation between  $[Ca^{2+}]_i$  variations and the level of Erk1/2 phosphorylation and the rate of cell proliferation.

## **MATERIALS AND METHODS.**

### **Reagents**

Bradykinin, EGTA, BAPTA-AM, thapsigargin, herbimycin A, genistein, rabbit anti-MAPK and mouse anti-phosphorylated MAPK antibodies were purchased from Sigma (St Louis, MI), U73122 from ICN (Costa Mesa, CA), secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies from DAKO (Denmark), trypsin, fetal calf serum (FCS) and DMEM from Life Technologies Inc. (Rockville, MD), Fluo3-AM from Molecular Probes (Eugene, OR) and borosilicate coverslip Lab-Teck® from Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

### **Cell culture**

Normal human skin fibroblasts were grown from a young healthy donor as described earlier (Delvoye et al., 1991) and used between passages 8 and 13. All cells were mycoplasma-free and routinely maintained in DMEM in the presence of 10% FCS, 2 mM glutamine, penicillin-streptomycin (100 IU/ml each) and ascorbic acid (50  $\mu$ g/ml) (= standard medium) at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Cells were passaged at confluence by splitting 1/3 using trypsin/EDTA in phosphate buffered saline.

### **Fluo-3AM loading and fluorescence recording**

The procedure for loading, recording and analyzing data was adapted from a previous work (Mineur et al., 2005). For routine experiments,  $5 \times 10^4$  cells were plated on borosilicate Lab-Teck for 18 hours in DMEM containing 1% FCS, rinsed once with serum-free medium and incubated with the fluorophore Fluo3-AM (10

$\mu$ M) in serum-free medium for one hour. After loading, cells were further washed and used in culture medium containing the indicated concentration of FCS. The observation of the fluorescence emitted by the Fluo3-labeled cells started 3 minutes after the last wash and was performed at room temperature (30 $\pm$ 2°C). Microscope fields randomly chosen in the culture dishes were examined by an Insight-IQ LASER confocal microscope (Meridian, Akemos, MI). At the 60X magnification, the microscope field contained 10-20 cells. The Fluo3-loaded cells were excited by an Argon LASER at 488 nm and the emitted fluorescence recorded at 530 nm in single cell and in real time. Image processing and data computing were performed using the Meridian software. The intensity of the emitted fluorescence reflecting the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration was recorded in each individual cell every 5 seconds during 600 or 1200 seconds. The frame scanning microscopy acquisition mode was used to monitor the variation of fluorescence intensity in planes (x-y axis) that intersected the nuclear region. As the overall fluorescence intensity varied from cell to cell, the level of fluorescence of each cell at the beginning of the recording was normalised to one unit. The fluorescence of cells maintained in DMEM spontaneously varied by about 5% around the baseline. A 10% rise above the baseline was considered as significant and the cell regarded as responsive. The results were expressed as the percentage of responding cells. All periods of observation were terminated by inducing a Ca<sup>2+</sup> signal with bradykinin (1nmol), and the non-responding cells were not taken into consideration. In most experiments, more than 95% of the cells responded to bradykinin stimulation.

### **Exposure device**

Cells were exposed to a perpendicular electromagnetic field produced by a pair of Helmholtz coils mounted on either side of a specially devised non-metallic supporting stage. There was no contact between the coils and the plate to avoid vibrations. The intensity of the field was regularly monitored by a gaussmeter. The coils were able to produce a null field when the current was circulated in the antiparallel direction (sham exposure). The EMF, generated by a TOE7741 function Generator (Toellner), produced a sinusoidal signal of 450 $\mu$ T-50Hz. For the Erk1/2 phosphorylation and cell proliferation measurements, fibroblasts were exposed to a perpendicular sinusoidal electromagnetic field (450 $\mu$ T-50Hz) produced by a double coil (42cm long and 20cm wide). The cells were exposed in the middle of the coil. In all experiments, cells

were either non-exposed (0 $\mu$ T-0Hz), Sham-exposed (0 $\mu$ T-50Hz) or exposed to EMF (450 $\mu$ T-50Hz). The temperature of the culture medium, measured using a copper-constantan thermocouple (Data Acquisition, Hydra, FLUKE), was constant at  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$  in all conditions.

### Pharmacological investigations

Genistein (10  $\mu\text{M}$ ), thapsigargin (2  $\mu\text{M}$ ) and BAPTA-AM (30  $\mu\text{M}$ ) were added to the cells 3 hours before loading of Fluo3-AM. Herbimycin A (10  $\mu\text{M}$ ) was added 2 hours before loading while EGTA (2 mM) and U73122 (100 nM) were added 2 minutes before  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  analysis.

### Erk1/2 phosphorylation

$10^5$  fibroblasts were plated in a 35mm diameter dish in 10% FCS-DMEM. After 18h, cells were washed twice with serum-free DMEM and cultured in the same medium overnight prior to the experiments. To induce the phosphorylation of Erk1/2, cells were supplemented with DMEM containing 0.2% FCS.

### Western blots

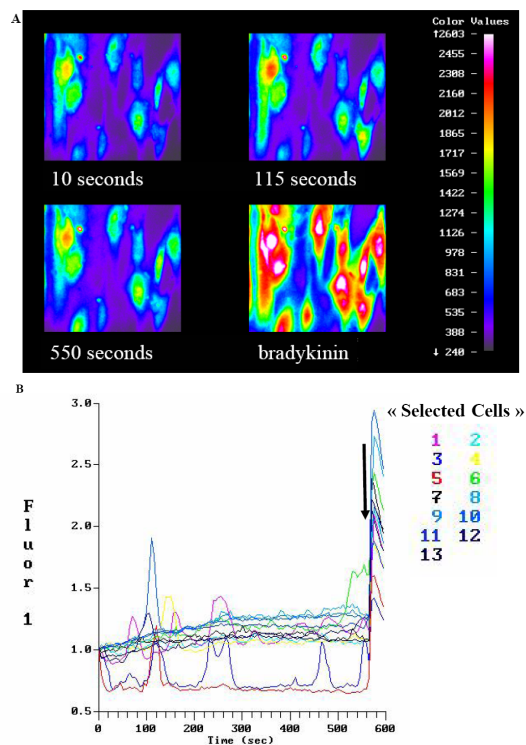
The cells were lysed in SDS-PAGE loading buffer supplemented by DTT. Proteins were separated on a 12.5% acrylamide gel and transferred overnight at 20V to a methanol-preincubated PVDF Tranfer Membrane (NEN Life Science products, Boston, MA). Membranes were blocked in 4% dry milk in PBS-Tween, incubated with either anti-Erk1/2 or anti-phosphorylated Erk1/2 antibodies diluted in the blocking solution for one hour at room temperature. After washing with PBS-Tween, the membranes were incubated for one hour with the horseradish-conjugated secondary antibodies and washed again. The peroxidase activity was revealed by ECL (Amersham Biosciences, UK) and X-ray film exposure. The intensity of bands was measured using a Fluor-S MultiImager (BioRad, Hercules, CA) and calculated using the MultiAnalyst program. The intensity of the signal of phosphorylated Erk1/2 were normalized to those of total Erk1/2 measured on duplicate acrylamide gels in order to take into account possible differences in protein loading.

## RESULTS.

### Effects of FCS on calcium transient

In fibroblasts loaded with Fluo3-AM and maintained in DMEM supplemented with 10% FCS, there was no major variation of the intracellular concentration of calcium ions. The

fluorescence was highest in the perinuclear area and diffuse within the cytoplasm with scattered bright spots (not shown). The calculated intracellular free calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) was  $120\text{nM} \pm 30\text{nM}$ , a value in close agreement

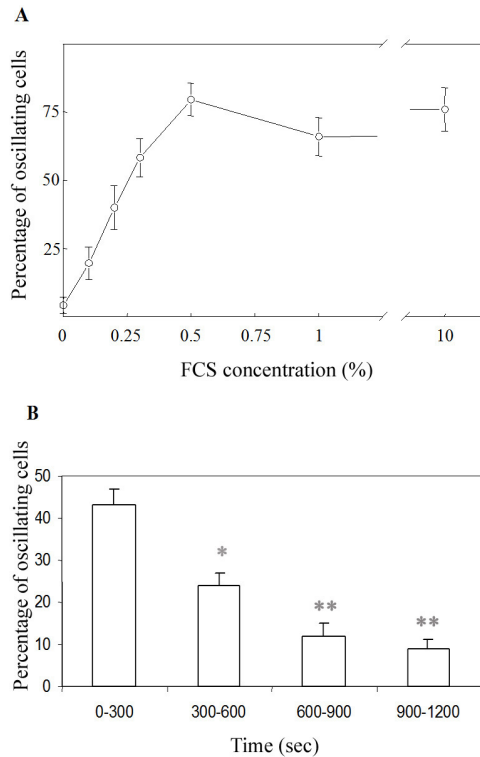


**Fig.1:** Time-course variation of the fluorescence in Fluo3-AM loaded fibroblasts ( $n=13$ ) by adding 0.2% FCS on starved cells. (A) Pseudocolor micrographs of one selected field taken at increasing times after adding 0.2% FCS. The three first pictures show the intracellular calcium variations in fibroblasts after 10, 115 and 550 seconds. The last picture shows the calcium rise in response to bradykinin in almost all cells in the field. (B) Recording of time-variation of the fluorescence in the same microscopic field as in A. The fluorescence of each cell at the beginning of the recording was normalized to one unit. Arrow indicates the addition of bradykinin.

with that reported in the literature. When cells were starved by deprivation of serum, cells reacted to the addition of FCS by oscillatory transients of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , as illustrated in Fig1, that progressively decreased with time.

In order to find conditions allowing to assess stimulating or inhibitory effects of EMF on this process, various concentrations of FCS were tested and the proportion of oscillating cells was recorded (Fig 2A). In absence of FCS, the proportion of oscillating cells was low, around 5%, and gradually increased to reach of plateau at 0.5% FCS. A half maximal proportion of oscillating cells, ( $\pm 40\%$ ), was induced by 0.2% FCS.

The serum-induced calcium oscillations in human dermal fibroblasts were analyzed as a function of time after addition of 0.2% of FCS. The proportion of oscillating cells decreased from 42% during the first 300 seconds to 9% of the cell population (Fig 2B) at the end of the observation period (1200 sec).



**Fig. 2:** (A) Percentage of oscillating fibroblasts as a function of FCS concentration. (B) Percentage of oscillating cells in 0.2% of FCS as a function of time (3 separate experiments, a total number of 125 cells). The Mantel-Haenszel test confirms the significant decrease of percentage of oscillating cells. \*  $p < 0.01$  and \*\*  $p < 0.001$  by Chi square test.

To further analyze the signaling pathways controlling the calcium oscillations induced by FCS, cells were treated with a panel of pharmacological agents (Table I). BAPTA-AM, an intracellular calcium chelating agent, suppressed both the FCS- and the bradykinin-induced response. EGTA, an extracellular calcium chelating agent, and genistein, a broad spectrum inhibitor of tyrosine kinases, abrogated the FCS-induced response but not the bradykinin-induced response. Treatment with thapsigargin, an inhibitor of endoplasmic reticulum ATPase-dependent calcium pumps, and U73122, a PLC $\gamma$  inhibitor, suppressed the response induced by FCS and bradykinin. Herbimycin-A, a Src-family tyrosine kinase inhibitor had no effect.

**Table I:** Effects of signaling pathways inhibitors on the  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations induced in fibroblasts by 0.2% FCS or bradykinin.

Agent	Target	Oscillating cells (%) FCS	Responding cells (%) Bradykinin
None	-	45	100
BAPTA-AM	Intracellular $Ca^{2+}$	0*	0*
EGTA	Extracellular $Ca^{2+}$	0*	96
Thapsigargin	ER $Ca^{2+}$ -ATPase	5*	10*
U73122	PLC $\gamma$	0*	18*
Genistein	Tyrosine kinases	3*	100
Herbimycin A	Src-family tyrosine kinase	46	96

Data are the mean of a minimum of 2 separate experiments with a total number of 20-29 cells. \* significant ( $P < 0.005$ ) difference versus the control sample (none). ER Calcium-ATPase: endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase-dependent pump; PLC $\gamma$ : phospholipase C $\gamma$ .

### Effect of EMF on calcium transients

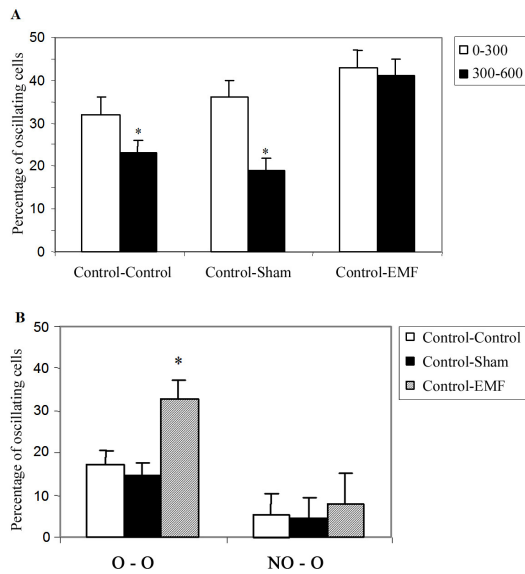
The effect of a transient exposure to EMF was evaluated by analyzing the number of oscillating cells at 0, 0.2 and 10% FCS concentration. Calcium oscillations were recorded during a 300 sec period before exposure and during the following 300 sec where cells were left untreated (Control) or were sham-exposed or EMF-exposed (450 $\mu$ T - 50Hz). At the end of this 600 sec experiment, cells were treated with bradykinin to evaluate the total number of responsive cells. EMF exposure had no effect in cells supplemented with 10% or 0% FCS (data not shown). At 0.2% FCS, an average of 32% of cells showed calcium oscillations before exposure to EMF. This proportion decreased to 23% during the next 300 seconds in non-exposed cells. A similar drop was observed in the sham-exposed cells (19% of oscillating cells). By contrast, the proportion of oscillating cells remained elevated (41%) in EMF-exposed cells during the 300-600 sec period (Fig 3A).

To further analyze the mechanism of stabilization of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations by EMF, the data were distributed according to 2 patterns:

- cells oscillating during the first and the second 300 sec time frame (oscillating-oscillating: O - O)
- cells that started oscillating only during the 300-600 sec period (non-oscillating-oscillating: NO - O)

The proportion of cells keeping oscillations during the last 300 seconds of observation was significantly increased ( $p < 0.01$ ) in the EMF-exposed group as compared to the non-exposed or sham-exposed groups. By contrast, the EMF exposure did not stimulate non-oscillating cells to oscillate (Fig 3B). No significant difference in

other parameters characterizing the  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations such as mean number of oscillations per oscillating cell or oscillations frequency was observed (data not shown).

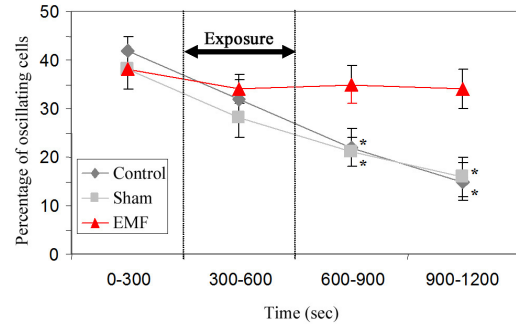


**Fig. 3:** EMF sustain oscillations in fibroblasts cultured in 0.2% FCS. (A) The percentage of oscillating cells was measured during 600 seconds. Cultures were not treated during the first 300 sec and then submitted to sham (0 $\mu$ T) or EMF (450 $\mu$ T) exposure or left untreated for the last 300 seconds. \*  $p < 0.05$  by Chi square test. (B) Comparison of 2 patterns of oscillating cells: cells that were oscillating during the first and the last 300 sec (O-O) and cells that were initially non-oscillating but started oscillating during the last period of 300 sec (NO-O). \*  $p < 0.01$  by Chi square test.

In a second set of experiments, the  $Ca^{2+}$  oscillations were analyzed up to 10 minutes after switching off the EMF device (Fig 4). In non-exposed and sham-exposed cells, the proportion of oscillating cells decreased respectively to 15% and 16% whereas 35% of EMF-exposed cells continued to oscillate.

#### Effect of EMF on phosphorylation of Erk1/2 and cell proliferation

Fibroblasts starved for 18 hours were either left untreated or supplemented with 0.2% FCS before to be sham-exposed or exposed to EMF until the end of the experiment. The pattern of phosphorylation of Erk1/2 was evaluated as a function of time, up to 120 minutes. EMF did not induce any modification in any condition (data not shown). Similarly a 4 day treatment in presence of 0.2% of FCS under the continuous exposure to sham or EMF did not affect cell proliferation.



**Fig. 4:** EMF sustain  $Ca^{2+}$  oscillations in responsive fibroblasts. Cells in 0.2% FCS were observed during the first 300 sec and then were left in control conditions (Control), sham-exposed or exposed to EMF (450 $\mu$ T) during 300 sec. Observations were extended during an additional 600 sec period after switching off the exposure device. Data are the mean of 3 separate experiments analyzing a total of 132 cells. \*  $p < 0.0001$  by Mantel-Haenszel test versus the 0-300 sec period for each condition.

## DISCUSSION.

By real-time measurement of free calcium concentration in single cells, we showed that a very low proportion of human dermal fibroblasts exhibit spontaneous calcium transients in absence of FCS. The number of cells showing oscillatory transients gradually increased with the concentration of serum with a maximum observed at 0.5%. The induction of  $[Ca^{2+}]_i$  transients depends on intracellular events involving tyrosine-kinase(s) and PLC $\gamma$ , a classical signaling pathway triggered by activation of many types of receptors. The suppression of the  $[Ca^{2+}]_i$  transients by chelating the extracellular  $Ca^{2+}$  by EGTA and by depleting intracellular  $Ca^{2+}$  stores by thapsigargin, an irreversible inhibitor of the endoplasmic reticulum ATPase-dependent  $Ca^{2+}$  pump (Thastrup et al., 1990), indicates that the calcium oscillations in our cell system originate both from the extracellular medium and the intracellular stores as in many other cell types. The induction of calcium waves and oscillations upon activation of receptors by their ligands involves a complex system of positive and negative feedback loops involving modulations of IP3 receptors affinity, PLC and other components as recently reviewed by Brandman and Meyer (2008). The decrease in number of oscillating cells with time might be related to a desensitization process as described for some agonists and growth factors (Benovic et al., 1987) or due to depletion of active factor(s) from the culture medium by uptake and/or metabolism. Recapture of calcium ions by buffer proteins probably also participates to the process.

The proportion of cells responding to suboptimal doses of FCS (0.2%) by calcium oscillations



rapidly decreased as a function of time in control cultures. By contrast, oscillating cells exposed to 50Hz sinusoidal EMF continued to oscillate for up to 10 min. No calcium transient was observed in unexposed, sham-exposed or EMF-exposed fibroblasts in absence of FCS (data not shown). These data support a cooperative effect between EMF and mitogen-induced signal transduction as already suggested by others (Liburdy, 1992; Walleczek and Budinger, 1992). It is noteworthy that the effect of EMF lasts for at least 10 minutes after the fields were turned off. A similar lasting effect of EMF on calcium transients in human skin fibroblasts was reported by Löschinger et al. (1999). However, contrasting to our data, they observed that EMF were able to elicit calcium transients in the absence of FCS. This discrepancy might be due to the difference in EMF intensity and frequency (8mT-20Hz in Löschinger studies and 450 $\mu$ T-50Hz in our conditions).

Growth factors rapidly induce the phosphorylation of Erk1/2 through a Ras/Raf pathway which controls many cellular processes including cell proliferation (Pouyssegur et al., 2002). As EMF induce a lasting effect of FCS-mediated calcium oscillations, we speculated that they might affect phosphorylation of Erk1/2 and cell proliferation as well. The level of phosphorylation of Erk1/2 was not significantly modified by EMF. It has been reported that efficient calcium-mediated activation of Ras and Erk/MAPK cascades occurs for an optimized range of calcium oscillations frequencies (Kupzig et al., 2005). The observations that EMF do not seem to modify neither the amplitude nor the frequency of the calcium oscillations is in agreement with a lack of modulation of Erk1/2 phosphorylation and proliferation rate in our cell model.

The molecular mechanism(s) that drive(s) the biological effect of EMF described in this work as well as the functional repercussion of sustained calcium oscillations are hypothetical. EMF might affect ligand binding to the cell membrane, a model that might be consistent with the requirement of mitogens to elicit EMF-induced effects (Liburdy, 1992; Walleczek and Budinger, 1992). As hypothesized by Lednev (1991), EMF might also affect the calcium binding to proteins such as calmodulin and affect their function. Further work is needed to clarify the issue.

## REFERENCES

Agell N, Bachs O, Rocamora N, Villalonga P. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca(2+), and calmodulin. *Cell Signal*. 2002 Aug;14(8):649-54.

Aldinucci C, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A, Pessina F, Pessina GP. The effect of pulsed electromagnetic fields on the physiologic behaviour of a human astrocytoma cell line. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Dec 11;1499(1-2):101-108.

Benovic JL, Kühn H, Weyand I, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(24):8879-82.

Berridge MJ. Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature*. 1993 Sep 30;365(6445):388-9.

Brandman O, Meyer T. Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science*. 2008 Oct 17;322(5900):390-5.

Clapham DE. Intracellular calcium. Replenishing the stores. *Nature*. 1995 Jun 22;375 (6533): 634-5.

Delvoye P, Wiliquet P, Levêque JL, Nusgens BV, Lapière CM. Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel. *J Invest Dermatol*. 1991 Nov;97(5):898-902.

Fitzsimmons RJ, Ryaby JT, Magee FP, Baylink DJ. Combined magnetic fields increased net calcium flux in bone cells. *Calcif Tissue Int*. 1994 Nov;55(5):376-80.

Galvanovskis J, Sandblom J, Bergqvist B, Galt S, Hamnerius Y. The influence of 50-Hz magnetic fields on cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> oscillations in human leukemia T-cells. *Sci Total Environ*. 1996 Feb 2;180(1):19-33.

García-Sancho J, Montero M, Alvarez J, Fonteriz RI, Sanchez A. Effects of extremely-low-frequency electromagnetic fields on ion transport in several mammalian cells. *Bioelectromagnetics*. 1994;15(6):579-88.

Jin M, Blank M, Goodman R. ERK1/2 phosphorylation, induced by electromagnetic fields, diminishes during neoplastic transformation. *J Cell Biochem*. 2000 Jun 6;78(3):371-9.

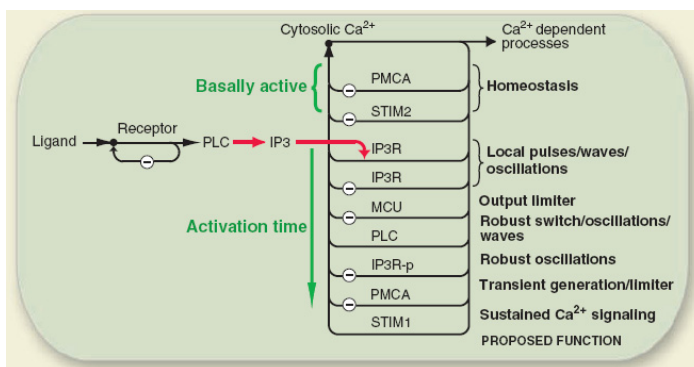
Kupzig S, Walker SA, Cullen PJ. The frequencies of calcium oscillations are optimized for efficient calcium-mediated activation of Ras and the

- ERK/MAPK cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 May 24;102(21):7577-82.
- Lednev VV. Possible mechanism for the influence of weak magnetic fields on biological systems. *Bioelectromagnetics*. 1991;12(2):71-5.
- Liburdy RP. Biological interactions of cellular systems with time-varying magnetic fields. *Ann N Y Acad Sci*. 1992 Mar 31;649:74-95.
- Liburdy RP. Calcium and EMFs: graphing the data. *Science*. 1999 Jul 16;285(5426):337.
- Lindström E, Lindström P, Berglund A, Lundgren E, Mild KH. Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics*. 1995;16(1):41-7.
- Lindström E, Lindström P, Berglund A, Mild KH, Lundgren E. Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field. *J Cell Physiol*. 1993 Aug;156(2):395-8.
- Löschinger M, Thumm S, Hämmerle H, Rodemann HP. Induction of intracellular calcium oscillations in human skin fibroblast populations by sinusoidal extremely low-frequency magnetic fields (20 Hz, 8 mT) is dependent on the differentiation state of the single cell. *Radiat Res*. 1999 Feb;151(2):195-200.
- Lyle DB, Fuchs TA, Casamento JP, Davis CC, Swicord ML. Intracellular calcium signaling by Jurkat T-lymphocytes exposed to a 60 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics*. 1997; 18(6):439-45.
- Mattsson MO, Lindström E, Still M, Lindström P, Mild KH, Lundgren E.  $[Ca^{2+}]_i$  rise in Jurkat E6-1 cell lines from different sources as a response to 50 Hz magnetic field exposure as a reproducible effect and independent of poly-L-lysine treatment. *Cell Biol Int*. 2001;25(9): 901-7.
- Mineur P, Guignandon A, Lambert ChA, Amblard M, Lapière ChM, Nusgens BV. RGDS and DGEA-induced  $[Ca^{2+}]_i$  signalling in human dermal fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Oct 30;1746(1):28-37.
- Nie K, Henderson A. MAP kinase activation in cells exposed to a 60 Hz electromagnetic field. *J Cell Biochem*. 2003 Dec 15;90(6):1197-206.
- Pessina GP, Aldinucci C, Palmi M, Sgaragli G, Benocci A, Meini A, Pessina F. Pulsed electromagnetic fields affect the intracellular calcium concentrations in human astrocytoma cells. *Bioelectromagnetics*. 2001 Oct;22(7):503-10.
- Peyssonaux C, Eychène A. The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol Cell*. 2001 Sep;93(1-2):53-62.
- Pouysségur J, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Eur J Biochem*. 2003 Aug;270(16):3291-9.
- Pouysségur J, Volmat V, Lenormand P. Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. *Biochem Pharmacol*. 2002 Sep;64(5-6):755-63. Review.
- Thastrup O, Cullen PJ, Drøbak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Apr;87(7):2466-70.
- Vergano D. Scientific misconduct. EMF researcher made up data, ORI says. *Science*. 1999 Jul 2;285(5424):23, 925.
- Walleczek J, Budinger TF. Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and field intensity. *FEBS Lett*. 1992 Dec 21;314(3): 351-5.
- Zhou J, Yao G, Zhang J, Chang Z. CREB DNA binding activation by a 50-Hz magnetic field in HL60 cells is dependent on extra- and intracellular  $Ca^{2+}$  but not PKA, PKC, ERK, or p38 MAPK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Aug 30;296(4):1013-8.

### 2.3. Conclusions

Un ajustement fin des paramètres de culture a permis de définir des conditions expérimentales pour lesquelles la « réceptivité » des fibroblastes aux signaux extracellulaires, s'exprimant par des flux calciques intracellulaires, était adéquate pour évaluer une action potentielle des EMF, positive ou négative.

Le pourcentage de cellules répondant par des flux calciques est corrélé à la concentration en sérum alors que ni la fréquence ni l'amplitude de ces oscillations n'est modifiée. Les oscillations observées résultent d'entrées de calcium à partir du milieu extracellulaire et des réservoirs intracellulaires, comme classiquement décrit. L'analyse des voies de signalisation impliquées, que nous avons réalisée à l'aide d'une série d'inhibiteurs, est également en accord avec les données de la littérature.



**Figure 28 : Boucles de rétrocontrôle dans les cellules non-excitables permettant de générer une réponse calcique oscillatoire (150).**

L'induction de vagues calciques et d'oscillations lors de l'activation d'un récepteur par son ligand met en jeu un système complexe de recapture des ions libres par des protéines spécifiques ainsi que des boucles de rétrocontrôle négatif et positif (schématisées dans la figure 28) qui participent également à leur maintenance. La compréhension de l'impact des EMF sur ces processus complexes nécessiterait des investigations plus approfondies et le développement de technologies spécialisées pour lesquelles nous ne sommes pas outillés. Nous avons préféré nous tourner vers un domaine faisant partie de notre expertise, à savoir l'évaluation d'un effet co-génotoxique des EMF et des UV-B.

### 3. Modulation de l'effet toxique des radiations UV-B par les EMF

D'intenses recherches menées in vivo et in vitro visent depuis longtemps à identifier des effets biologiques des EMF qui pourraient supporter une relation causale entre l'incidence de certains cancers et l'exposition résidentielle ou professionnelle aux EMF. Aucune démonstration concluante ou reproductible n'a cependant jamais pu être apportée, ce qui n'a pas manqué de susciter de nombreuses controverses. Parmi les recommandations émanant de l'OMS et à la suite du rapport du NIEHS catégorisant les EMF comme « possible human carcinogen », la possibilité d'un effet co-génotoxique devait être envisagée. Parmi les agents génotoxiques potentiels, les radiations UV nous ont paru intéressantes en raison de leur présence permanente et ubiquitaire dans l'environnement.

Les effets potentiels des EMF en combinaison avec l'irradiation UV ont été relativement peu étudiés. Les EMF ont été décrits comme affectant le système de réparation de l'ADN suite aux effets génotoxiques des UV (tableau 7 ; 151-158) et accélérant le développement de tumeurs cutanées (153-154). Par ailleurs, lorsque l'exposition aux EMF s'effectue avant l'irradiation, ceux-ci protégeraient des actions néfastes des UV par l'induction d'HSP70 (156, 157). Ces derniers résultats n'ont cependant pas été confirmés par d'autres auteurs (155, 158).

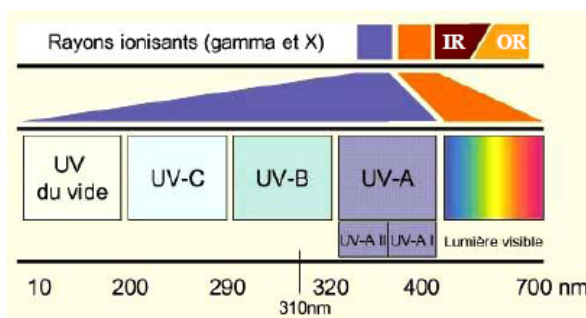
Modèle expérimental	Expositions (UV/Champ électromagnétique)	Résultats	Références
Lymphocytes de rat	UV-A 15mJ/cm <sup>2</sup> 40μT rms 50Hz	Augmentation des effets des UV-A. Les EMF affectent les paires de radicaux libres induits par les UV-A ou les réparations enzymatiques de l'ADN	(151)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Doses sub-létales d'UV 30mT-50Hz	Les EMF diminuent l'efficacité du système de réparation et permettent la progression du cycle cellulaire	(152)
Souris	2 MED ou 42mJ/cm <sup>2</sup> de radiation solaire simulée 100μT 50Hz	Les EMF accélèrent le développement des tumeurs de peau.	(153)
Souris	2 MED et 100μT 50Hz	La réponse apoptotique induite par les UV est réduite par les champs électromagnétiques	(154)
MCF-7	UV-C de 0.66 à 9.94mJ/cm <sup>2</sup> EMF pulsé de 750μT 25Hz	Les EMF augmentent la mortalité cellulaire	(155)
Embryons de poulet	UV-C de 3 ou 4.5mJ/cm <sup>2</sup> 8μT 50Hz	La pré-exposition aux EMF protège des effets nocifs des UV, probablement via l'induction de HSP	(156)
Embryons de poulet	UV-C de 3 ou 4.5mJ/cm <sup>2</sup> 8μT 50Hz	Effet protecteur des EMF supprimé par les vibrations mécaniques	(157)
Embryons de poulet	UV-C (1.7mW/cm <sup>2</sup> ) pendant 60 minutes 10, 5, 50, 100 et 200 μT 50Hz	Pas d'effet protecteur des EMF sur les embryons de poulet	(158)

**Tableau 7 : Principales publications étudiant l'influence des EMF sur les effets biologiques des UV.**

En raison de l'accroissement de l'âge moyen et des changements de modes de vie, les populations sont davantage exposées aux radiations UV, la peau étant en première ligne. Les UV sont connus pour provoquer une sénescence prématurée des fibroblastes cutanés (159,160) et induire l'expression de certains gènes (161). Ils stimulent par exemple la production de métalloprotéases matricielles (MMP) et de cytokines inflammatoires (IL-1, IL-6, ...) alors qu'ils répriment la synthèse de collagènes (162,163). Ils sont également à l'origine de lésions précancéreuses et du développement de cancers cutanés. Il est par ailleurs démontré qu'ils génèrent des radicaux libres et modulent diverses cascades intracellulaires de signalisation, dont celles des MAPK et de NFκB qui conduisent à l'expression de marqueurs de stress.

### 3.1. Quelques éléments de physique

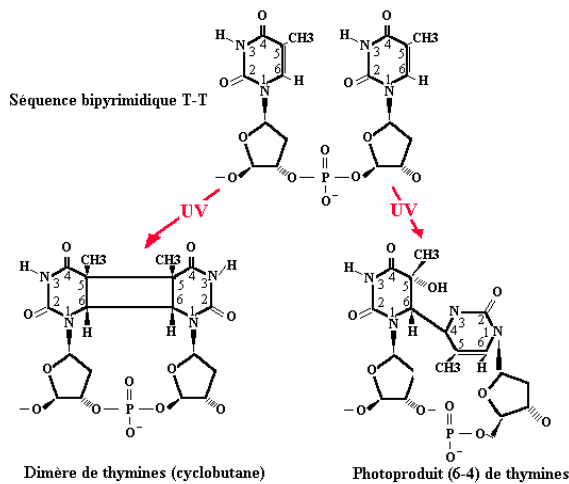
Parmi le spectre des ondes électromagnétiques (figure 29), les ultraviolets sont caractérisés par des longueurs d'ondes allant de 200 à 400 nm. Ils sont divisés en UV-A, UV-B et UV-C, dont l'énergie est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Les UV-C naturels (de 200 à 290 nm) n'atteignent théoriquement pas la Terre, étant absorbés par la couche d'ozone. Lorsqu'ils sont produits artificiellement, ils sont absorbés par tous les constituants cellulaires et sont fortement délétères. Au niveau de la peau, les UV-B (de 290 à 320 nm) pénètrent dans l'épiderme et le derme superficiel et sont responsables de l'érythème solaire. Les UV-A (de 320 à 400 nm) pénètrent dans les couches profondes du derme. La quantité d'énergie précise et la composition du spectre solaire dépendent d'un grand nombre de facteurs, comme l'angle du zénith (lequel varie en fonction de l'heure du jour, de la saison, de la latitude), l'épaisseur de la couche d'ozone, la pollution, la couverture nuageuse et l'altitude (161).



**Figure 29 : Spectre électromagnétique.** Les longueurs d'ondes les plus courtes sont aussi les plus énergétiques. Ainsi, les rayons gamma et X sont dits ionisants, car ils ont la capacité d'arracher des électrons aux molécules. Viennent ensuite les UV, la lumière visible, les infra-rouges, les micro-ondes, les ondes radio et les ondes du réseau de distribution électrique. IR : Infra-Rouge ; OR : Onde Radio.

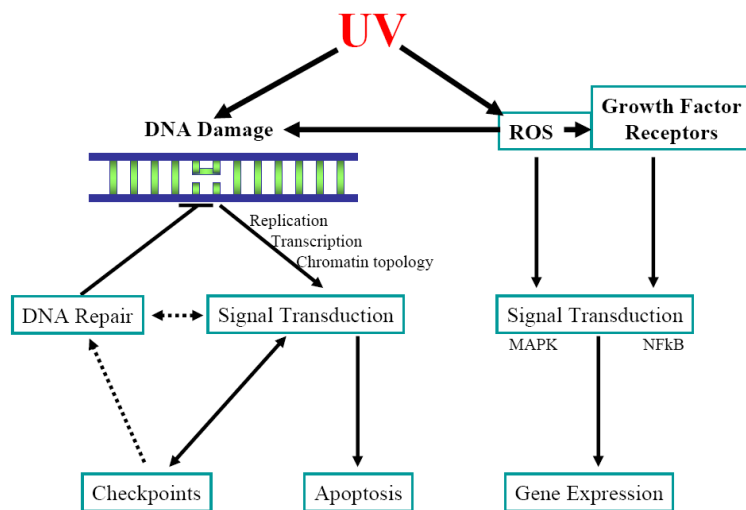
### 3.2. Effets toxiques et génotoxiques des radiations UV

L'ADN est une cible importante des effets à long terme des UV. L'absorption des UV-B par l'ADN induit la formation de lésions dipyrimidiques (figure 30), comme les dimères de cyclobutanes pyrimidiques (CPD) et des pyrimidones 6-4 pyrimidines (nommés 6-4) (164-166). Les photoproduits 6-4 générés par une seule exposition au soleil sont rapidement réparés par excision locale, alors que les CPDs induisent des processus de réparation plus lents (166,167). L'inactivation de gènes intervenant dans ces systèmes de réparation est responsable de maladies rares comme le Xeroderma pigmentosum caractérisé par une incidence majeure de cancers cutanés (161).



**Figure 30 : Formation de dimères dipyrimidiques induite dans l'ADN par les ultraviolets.** L'énergie absorbée provoque le plus souvent la formation d'une liaison covalente entre deux pyrimidines (ici deux thymines) adjacentes sur un même brin pour former un dimère de thymines (cyclobutane) ou un photoproduit (6-4) de thymines.

Les UV-B peuvent également provoquer indirectement des dégâts à l'ADN par production de radicaux libres (ROS) (figure 31) (168). Les ROS sont des éléments très réactionnels. L'anion superoxyde, l'oxygène singulet et le radical hydroxyl ( $\bullet\text{OH}$ ) provoquent des dégâts « oxydatifs » à l'ADN, aux lipides et aux protéines (168). Les dommages engendrés à l'ADN par les ROS (comprenant des coupures et des altérations de bases et de sucres) sont réparés principalement par un processus d'excision – réparation. La voie de signalisation la plus connue induite par les dommages à l'ADN est la voie ATM/ATR – p53. Les deux kinases ATM et ATR, en association avec de nombreuses autres protéines sont capables de détecter les dommages subis par l'ADN et d'induire la phosphorylation de p53, directement ou par l'intermédiaire d'autres médiateurs. La phosphorylation de p53 détermine soit l'induction des réparations de l'ADN et la relance



**Figure 31 : Différentes voies de signalisation affectées par les UV.** Les UV, par les dommages qu'ils occasionnent à l'ADN, activent les voies de signalisation menant aux processus de réparation ou à l'apoptose. Suite à la production de ROS, ils sont également capables de moduler l'expression de gènes spécifiques.

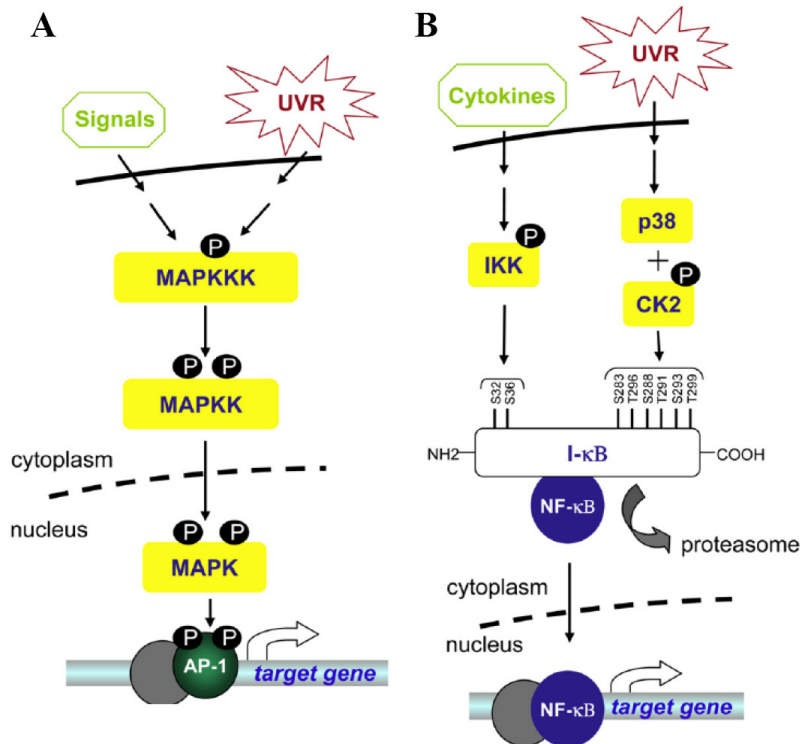
du cycle cellulaire si les dégâts sont mineurs, soit la mise en route des processus menant à l'apoptose (169). Alors qu'ATM est davantage recrutée par les cassures double brins, ATR est plus particulièrement mobilisée par les cassures simple brins ou les photoproduits CPD et 6-4.

### 3.3. Réponses biologiques aux UV-B et signalisation intracellulaire

La peau est l'organe majoritairement affecté par les UV. Le stress oxydatif joue un rôle central dans l'initiation et la vague de signalisation déclenchée par l'exposition aux UV. Une des réponses les plus rapides après une irradiation de la peau est l'activation de nombreux récepteurs aux facteurs de croissance et cytokines, comme les récepteurs à l'EGF (170-172), au TNF- $\alpha$  (173), à IL-1 (174) et au PDGF (175). Par exemple, une irradiation UV de la peau ou de kératinocytes en culture induit une phosphorylation du récepteur à l'EGF endéans 10 minutes (176,177). Celle-ci est indépendante du ligand naturel (175) et résulterait de l'inhibition de l'activité de phosphatases (178,179).

Outre la voie ATM/ATR – p53 déjà mentionnée, deux autres voies de signalisation affectées par les UV conduisent à l'activation d'AP-1 et de NF $\kappa$ B (figure 32). AP-1 est un facteur de transcription dimérique formé par des combinaisons variables de membres de la famille JUN et FOS (180,181). Son activité est régulée à de nombreux niveaux dont notamment au niveau post-transcriptionnel essentiellement par la voie des MAPK. NF $\kappa$ B est un facteur de transcription dimérique, formé des protéines Rel et p65, séquestré dans le

cytoplasme par un inhibiteur spécifique I $\kappa$ B. Sa phosphorylation par les IKK Kinases (IKK), en conjonction avec p38 et la caséine kinase (CK2), induit sa dégradation et permet la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau (179).



**Figure 32 :** Voie de signalisation ciblée par les radiations UV (UVR) (179) conduisant à l'activation d'AP-1 (A) et de NF $\kappa$ B (B) et à la transcription de gènes cibles.

Ces deux familles de facteurs de transcription sont impliquées dans la régulation de la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire ainsi que dans la régulation de l'expression de nombreux gènes. Par exemple, l'activation d'AP-1 par les UV-B est responsable de la stimulation de l'expression par les fibroblastes des MMP-1, -3 et -9, trois métalloprotéases matricielles impliquées collégialement dans la dégradation des constituants de la trame conjonctive du derme. Ces enzymes sont en partie responsables des altérations cutanées observées dans le photo-vieillessement (182,183). Par ailleurs, AP-1 régule négativement la transcription des gènes du collagène de type I (182-184). Au niveau des kératinocytes, les UV-B induisent le relargage de plusieurs cytokines inflammatoires (IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , l'IL-6), de chimiokines et de facteurs pro-angiogènes dont l'IL-8 et le VEGF (185).



Dans le but d'évaluer une éventuelle modulation de l'effet des UV-B par les EMF, les deux types cellulaires majoritairement exposés dans l'environnement ont été utilisés, à savoir les kératinocytes et les fibroblastes dermiques. Des gènes marqueurs connus pour être modulés par les UV-B ont été choisis : les MMP-1 et -3 pour les fibroblastes et l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$ , l'IL-6 et le VEGF pour les kératinocytes.

### **3.4. Protocoles expérimentaux**

#### **a- Cultures de cellules :**

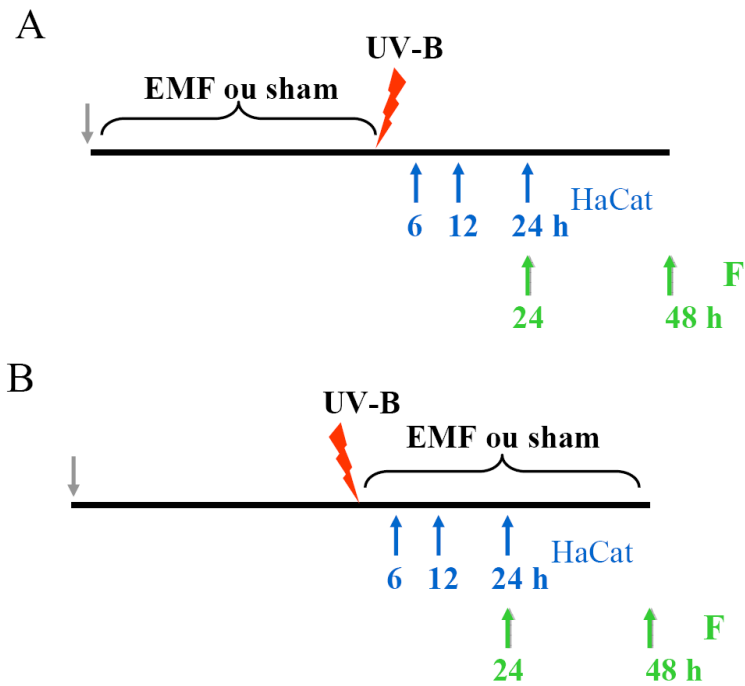
Les fibroblastes ont été obtenus à partir d'un fragment de derme humain d'un donneur jeune (53). Les cellules HaCat, kératinocytes humains immortalisés et non-tumoraux (186), expriment un profil de différenciation épidermique semblable aux kératinocytes normaux. Ils nous ont été aimablement donnés par N. Fusenig (DKFZ, Heidelberg).

#### **b- Irradiation UV :**

L'irradiation des cellules par les UV est réalisée à l'aide de deux lampes Philips TL 20W/12RS dont le spectre d'émission maximal est de 310 nm. Afin d'éviter toute absorption artéfactuelle, les irradiations ont été réalisées dans une quantité minimale de milieu de culture ne contenant ni rouge phénol ni sérum. Une exposition de 45 secondes à une distance de 20 cm délivre une énergie de 30mJ/cm<sup>2</sup>. L'énergie reçue dans ces conditions a été validée par des mesures à l'aide d'un UVX mètre (UVP, Inc., San Gabriel, CA, USA). Les cellules contrôles ont subi les mêmes conditions de culture à l'exception de l'exposition aux UV. Après irradiation, le milieu de culture est remplacé par un volume plus important de milieu « classique » (DMEM) contenant 10% de sérum.

#### **c- Exposition aux EMF :**

La modulation potentielle des effets des UV par les EMF a été évaluée selon deux schémas expérimentaux (figure 33). Le premier consiste en une exposition des cellules aux EMF (450 $\mu$ T - 50Hz) ou aux contrôles adéquats durant 3 jours avant l'irradiation par UV-B (45 sec, 30mJ/cm<sup>2</sup>) puis récolte des échantillons (après 1 ou 2 jours pour les fibroblastes et entre 6 et 24 heures pour les HaCat). Le deuxième protocole consiste en une irradiation UV suivie d'une exposition aux EMF durant des périodes variables de 1 ou 2 jours pour les fibroblastes et de 6 à 24 heures pour les HaCat.



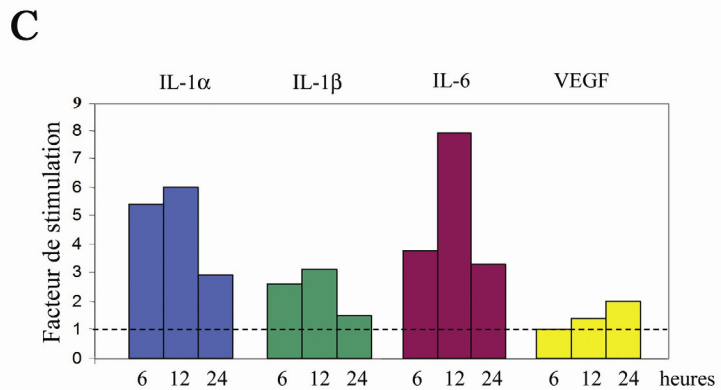
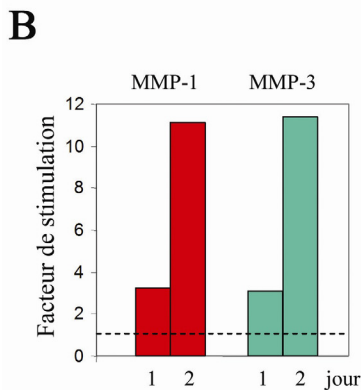
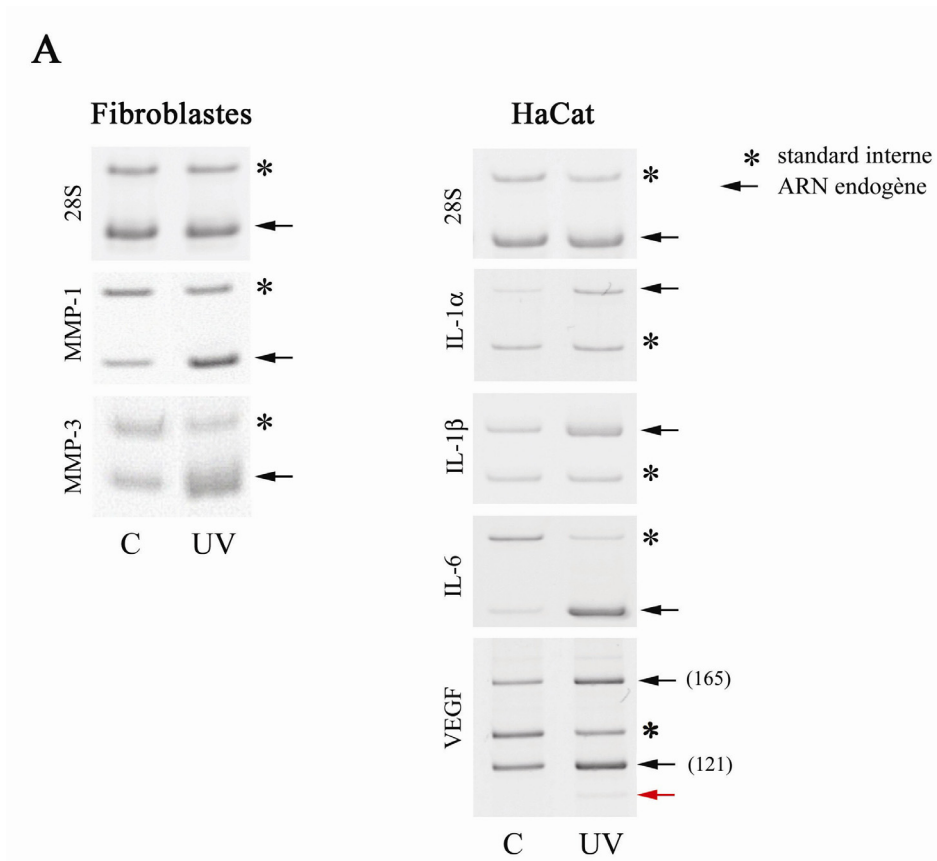
**Figure 33 : Protocoles d'exposition des cellules aux EMF et UV.** (A) Exposition des cellules (fibroblastes ou HaCat) aux EMF avant l'irradiation UV-B. (B) Exposition aux EMF après l'irradiation UV-B. Les cellules ont été récoltées aux temps indiqués par les flèches (1 et 2 jours pour les fibroblastes (F) et 6, 12 et 24 heures pour les HaCat) déterminés sur base d'études préliminaires.

L'ARN est ensuite purifié et dosé selon un protocole précédemment décrit (57). Le niveau d'ARNm des gènes marqueurs est mesuré par RT-PCR rendue quantitative en ajoutant dans chaque tube de réaction une quantité déterminée d'un ARN synthétique servant de standard interne pour évaluer l'efficacité à la fois de la transcription inverse et de la réaction d'amplification (57). Les oligonucléotides utilisés ont été précédemment décrits en détail (72,162). Les produits de RT-PCR sont séparés sur gel de polyacrylamide et l'intensité des signaux respectifs est quantifiée (MultiImager, BioRad) après coloration au Gelstar®. Les effets induits par les UV-B, les EMF et leur action conjointe sont exprimés sous forme de rapport établi entre les valeurs obtenues pour des cultures traitées et les contrôles respectifs (Traité/Contrôle).

### **3.5. Résultats**

#### **3.5.1. Modulation de l'expression des gènes marqueurs par les UV-B seuls**

Dans les fibroblastes, les métalloprotéases matricielles MMP-1 et -3 sont significativement surexprimées après irradiation par les UV-B (figure 34A et B). L'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 sont fortement induites dans les HaCat avec un maximum observé 12h après irradiation (figure 34A et C). L'expression du VEGF-A est quant à elle doublée au temps 24h (figure 34C). Notre technique de RT-PCR permettant d'identifier les différentes formes d'épissage alternatif du VEGF, montre que l'accroissement de l'expression de VEGF-A s'exprime de façon similaire au niveau des deux isoformes principales, le VEGF121 et le 165. Il est intéressant de noter la présence d'un produit d'amplification de plus petite taille ( $\leftarrow$ ) qui fera l'objet de la dernière partie de ce mémoire (figure 34A). L'expression de l'HSP70 n'est guère modifiée par les UV-B dans les deux types de cellules (non illustré).



**Figure 34 : Effet des UV-B sur le niveau d'expression de gènes cibles mesuré par RT-PCR quantitative.** A. Mise en évidence sur gel de polyacrylamide des produits d'amplification. Les signaux du 28S, équivalents dans les contrôles (C) et les cellules irradiées (UV), démontrent que nos mesures ont été réalisées à partir de quantités équivalentes d'ARN total. Par ailleurs, l'utilisation d'un standard interne (\*), ajouté dans chacun des tubes et co-amplifié avec les différents ARN messagers (←), permet de prendre en considération d'éventuels artéfacts expérimentaux. Trois produits d'amplification de l'ARNm du VEGF ont été détectés, correspondant respectivement aux isoformes 165 et 121, et à une nouvelle isoforme (←) caractérisée dans la dernière partie du mémoire. Les quantifications des modifications d'expression des gènes cibles induites par les UV-B dans les fibroblastes (B) et les kératinocytes (C) tiennent compte de l'intensité du signal du standard interne et du taux d'expression dans les cultures contrôles suivant la formule :

$$\frac{(\text{signal spécifique} / \text{signal standard})_{UV}}{(\text{signal spécifique} / \text{signal standard})_{Cont}}$$

La ligne en pointillé (ratio de 1) marque une absence de modification résultant de l'exposition aux UV-B.

### 3.5.2. Modulation de l'expression des gènes cibles des UV-B par les EMF seuls

Afin de déterminer si les EMF seuls étaient capables de moduler l'expression des gènes cibles des UV-B, les fibroblastes et les HaCat ont été exposés de façon continue aux EMF et contrôles adéquats pendant, respectivement, 48h et 24h (tableau 8). Aucune modification significative n'est induite par les EMF.

Fibroblastes	Contrôle	Sham	EMF
MMP-1	77 ± 15	71 ± 3	70 ± 1
MMP-3	176 ± 8	160 ± 4	166 ± 4
HaCat	Contrôle	Sham	EMF
IL-1 $\alpha$	43 ± 2	44 ± 8	57 ± 11
IL-1 $\beta$	38 ± 2	39 ± 4	48 ± 5
IL-6	10 ± 6	12 ± 3	9 ± 1
VEGF	30 ± 6	28 ± 8	30 ± 5

*Tableau 8 : Evaluation de l'effet des EMF seuls sur l'expression des gènes cibles des UV-B. Les résultats sont exprimés sous forme d'un rapport établi entre les valeurs mesurées pour les signaux résultant de l'amplification de l'ARNm spécifique et de son standard interne correspondant (signal spécifique/signal standard).*

### 3.5.3. Modulation de l'expression des gènes marqueurs par les UV-B et les EMF

Les EMF ont été appliqués avant ou après l'irradiation aux UV-B et leurs effets éventuels a été évalué par comparaison aux cellules non-exposées et aux cellules sham. Aucune modulation significative de l'expression des gènes induits par les UV-B n'a été mise en évidence aux différents temps d'exposition (tableaux 9 et 10). Afin de ne pas surcharger davantage ces tableaux, les valeurs des différentes cultures contrôles ayant été exposées uniquement aux UV-B ou uniquement aux EMF ne sont pas rapportées. Les modifications induites par les UV-B seuls étaient similaires à celles observées au cours des expériences précédentes. Seuls les résultats des cultures irradiées par les UV-B et exposées aux EMF avec les contrôles adéquats sont repris.

FIBROBLASTES

EMF puis UVB	Jour 1			Jour 2		
	Contrôle	Sham	EMF	Contrôle	Sham	EMF
MMP-1	91 ± 8	73 ± 0	69 ± 6	284 ± 4	186 ± 7	252 ± 37
MMP-3	258 ± 29	314 ± 47	295 ± 1	1003 ± 109	1569 ± 563	1923 ± 150

UVB puis EMF	Jour 1			Jour 2		
	Contrôle	Sham	EMF	Contrôle	Sham	EMF
MMP-1	165 ± 42	137 ± 3	143 ± 85	376 ± 22	274 ± 5	287 ± 170
MMP-3	143 ± 12	56 ± 3	96 ± 95	727 ± 157	706 ± 26	875 ± 65

**Tableau 9 : Effet des EMF sur l'expression des gènes induits par les UV-B dans les fibroblastes.**  
L'exposition aux EMF a eu lieu avant ou après l'irradiation par les UV-B. Les résultats sont exprimés comme décrit dans la légende du tableau 8.

HaCaT

EMF puis UVB	6 heures			12 heures			24 heures		
	Contrôle	Sham	EMF	Contrôle	Sham	EMF	Contrôle	Sham	EMF
IL-1 $\alpha$	86 ± 76	214 ± 76	144 ± 18	205 ± 18	230 ± 12	202 ± 28	38 ± 19	6 ± 10	52 ± 10
IL-1 $\beta$	177 ± 9	267 ± 93	369 ± 78	105 ± 14	192 ± 39	147 ± 12	83 ± 16	101 ± 2	96 ± 12
IL-6	403 ± 63	527 ± 132	344 ± 16	691 ± 64	772 ± 80	656 ± 205	351 ± 207	336 ± 80	300 ± 86
VEGF	164 ± 11	181 ± 5	193 ± 19	248 ± 13	270 ± 32	242 ± 14	271 ± 42	312 ± 49	289 ± 7

UVB puis EMF	6 heures			12 heures			24 heures		
	Contrôle	Sham	EMF	Contrôle	Sham	EMF	Contrôle	Sham	EMF
IL-1 $\alpha$	76 ± 19	121 ± 1	112 ± 7	111 ± 4	101 ± 29	122 ± 7	55 ± 1	50 ± 2	48 ± 1
IL-1 $\beta$	57 ± 18	92 ± 3	78 ± 4	70 ± 2	50 ± 16	63 ± 1	36 ± 6	30 ± 0	32 ± 4
IL-6	265 ± 78	335 ± 46	293 ± 91	524 ± 14	613 ± 78	460 ± 0	218 ± 22	192 ± 1	199 ± 0
VEGF	103 ± 23	161 ± 27	108 ± 8	148 ± 4	121 ± 32	143 ± 10	124 ± 26	128 ± 16	155 ± 10

**Tableau 10 : Effet des EMF sur l'expression des gènes induits par les UV-B dans les HaCaT.**  
L'exposition aux EMF a eu lieu avant ou après l'irradiation par les UV-B. Les résultats sont exprimés comme décrit dans la légende du tableau 8.

Puisque nous avons précédemment observé que les EMF étaient capables de prolonger les oscillations de calcium intracellulaire à une concentration de sérum sub-optimale, les protocoles identiques d'exposition aux EMF et aux UV-B ont été répétés en présence de 0.2% de sérum. Ici encore, aucun effet des EMF n'a été mis en évidence (non-illustré).

### **3.6. Conclusions**

Les deux types cellulaires majoritairement exposés *in vivo* aux UV, les kératinocytes et les fibroblastes, réagissent à une irradiation UV-B par un accroissement de l'expression d'une série de gènes. Pour les fibroblastes, notre choix s'est porté sur la MMP-1 et la MMP-3, deux enzymes impliquées dans la dégradation du support matriciel du derme. La transcription de ces deux gènes est régulée par une cascade de signalisation (illustrée dans la figure 32A) qui représente une cible potentielle des EMF. De même, les kératinocytes irradiés par les UV-B surexpriment de nombreux facteurs proinflammatoires (IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  et IL-6) et proangiogène (VEGF) dont les voies d'activation sont potentiellement modulées par les EMF. Les cinétiques d'induction de ces gènes ont été établies et nous ont permis d'élaborer deux protocoles d'exposition aux EMF (avant et après irradiation aux UV-B) nous permettant ainsi de cerner tous leurs effets potentiels. Nous avons démontré que les EMF seuls n'ont pas d'effet sur le niveau basal d'expression de ces gènes et ne modifient en rien les modulations d'expression induites par les UV-B, et cela même dans des conditions expérimentales qui nous avaient permis d'observer un effet des EMF sur les mouvements calciques. L'induction de HSP par les EMF décrite dans la littérature comme un évènement protecteur vis-à-vis des UV n'a pas été observée ici. Il faut cependant noter que la plupart de ces travaux rapportent des expériences *in vivo* s'adressant aux UV-C, une situation très éloignée des conditions environnementales sur Terre et de nos conditions expérimentales (UV-B et expositions continues à des EMF de type domestique).

Si aucun effet des EMF sur les voies de signalisation activées par les UV-B n'a pu être mis en évidence, ces expériences nous ont permis, de manière fortuite, de détecter l'existence d'une nouvelle isoforme du VEGF-A dont l'identification et la caractérisation font l'objet de la troisième partie de ce mémoire.

## ***Conclusions de la partie II***

L'OMS (98) a classé les EMF comme potentiellement cancérigènes sur base d'études épidémiologiques controversées et d'ailleurs remises en cause par les méta-analyses récentes. Quoiqu'un nombre élevé d'articles traite des effets potentiels des EMF sur le Vivant, le manque d'évidences établies de façon reproductible et irréfutable ne permet toujours pas d'établir une relation de cause à effet entre exposition et problèmes de santé.

Il est cependant bien admis que les EMF présentant des caractéristiques bien précises, comme par exemple les EMF pulsés de forme rectangulaire, sont capables d'influencer positivement le métabolisme du tissu osseux au cours de la réparation des fractures (187,188). Par ailleurs, des expositions intermittentes se sont également avérées actives sur certains processus biologiques (119,189,190). Il est également possible que des pics extrêmement brefs d'intensité et de fréquence élevées, appelés « transients », aient des effets biologiques. Leur étude vient d'ailleurs d'être recommandée par l'OMS.

Au cours de nos travaux, nous avons observé que les EMF n'affectent ni les signaux calciques induits par des concentrations élevées de sérum ou des peptides mimétiques de la matrice extracellulaire, ni l'expression des gènes régulés par les UV-B. Ils sont cependant capables de moduler les oscillations calciques induites par une concentration sub-optimale de sérum, sans toutefois réguler de manière évidente les voies de signalisation contrôlant la prolifération. Ainsi que l'ont déjà suggéré plusieurs auteurs, il est possible que l'impact des EMF ne se manifeste que sur des processus en équilibre instable ou sur des réactions non-linéaires.

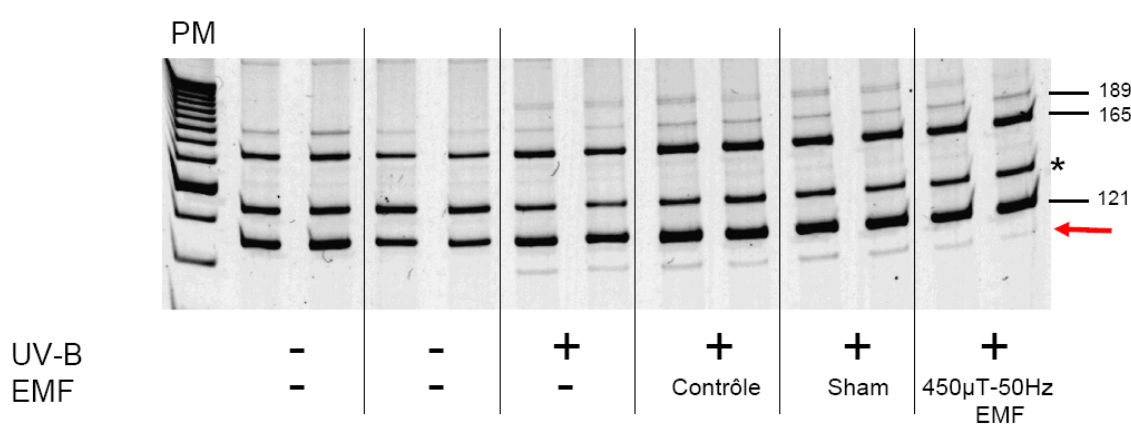


***PARTIE III : EFFET DES AGENTS GÉNOTOXIQUES SUR  
L'ÉPISSAGE ALTERNATIF DU VEGF-A.***

## Introduction

### 1. Observation fortuite

L'analyse, par RT-PCR, de l'expression de VEGF-A par les cellules HaCat exposées aux UV-B avait révélé la présence d'un amplicon d'une taille inférieure à celle des produits connus (figure 35). Notons au passage qu'un système d'analyse par PCR en temps réel n'aurait pas permis ce type d'observation.



**Figure 35 :** Analyse des produits d'amplification par RT-PCR de l'ARNm du VEGF-A. Des cellules HaCat ont été irradiées ou non par les UV-B pour être ensuite exposées ou non aux EMF. Après amplification de l'ARN messager du VEGF par RT-PCR et séparation sur gel de polyacrylamide, un produit de faible taille (←) est observé dans toutes les conditions d'irradiation par UV-B.

PM : poids moléculaire ; \* standard interne ; 189, 165 et 121 : produits d'amplification des variants d'ARNm codant pour les VEGF 189, 165 et 121.

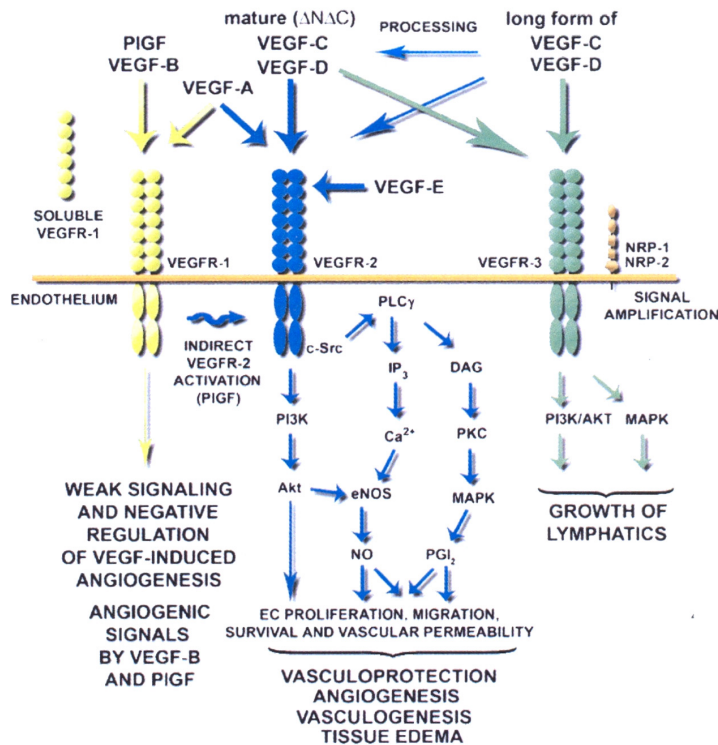
Le séquençage de ce produit nous a permis de conclure que nous avons détecté un nouveau variant d'épissage alternatif du VEGF-A. La dernière partie de notre mémoire sera consacrée à sa caractérisation, à l'étude de ses propriétés biologiques et à une approche préliminaire des voies de signalisation régulant son expression. La découverte de l'induction de cette nouvelle isoforme par les UV-B a été étendue à d'autres agents génotoxiques, dont les substances utilisées en chimiothérapie, mettant en avant la possibilité d'un effet adverse potentiel des traitements des cancers.

## 2. Le VEGF-A

Les VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factor) sont des régulateurs cruciaux du développement de l'arbre vasculaire durant l'embryogenèse et de la formation et la maintenance des vaisseaux sanguins chez l'adulte (191). Ils sont également impliqués dans la croissance des vaisseaux lymphatiques (192). Chez les mammifères, la famille du VEGF comprend plusieurs membres : les VEGF-A, -B, -C, -D et -E (193) ainsi qu'un facteur apparenté, le Placental Growth factor (PIGF). Il existe également un VEGF-E viral et le VEGF-F isolé du venin de serpent (191). Le VEGF-A est le premier membre de la famille à avoir été décrit (194). Il est, pour cette raison, fréquemment appelé VEGF, sans précision de son « prénom » (195). Il induit la prolifération et permet la survie des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo* (196-200). *In vitro*, il prévient l'apoptose induite par la privation de sérum (198,201) et, *in vivo*, il est un élément-clé du développement embryonnaire et néonatal (202). Le VEGF-A est également un facteur chimiotactique pour les monocytes (203). Par ailleurs, il stimule l'hématopoïèse (204) et accroît la perméabilité vasculaire (205,206) via l'induction d'une molécule critique, le NO (207-209). Son rôle clé dans ces processus vitaux l'implique dans de nombreuses pathologies caractérisées par une angiogenèse excessive ou, a contrario, par des conditions ischémiques.

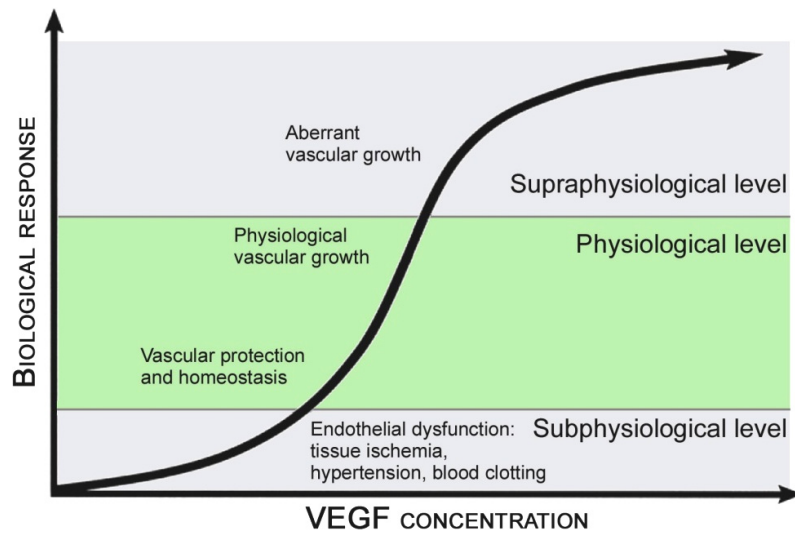
Les VEGFs se lient à des récepteurs de type tyrosine kinase, les VEGF-R1, VEGF-R2 et VEGF-R3, en association avec des co-récepteurs, tels les protéohéparan sulfates et les neuropilines (191). Comme illustré dans le schéma de la figure 36, le VEGF-A se liant au VEGF-R1 ou au VEGF-R2 provoque leur dimérisation, ce qui induit l'activation de tyrosines kinases intracytoplasmiques et de cascades de signalisation régulant de nombreuses fonctions cellulaires (191,210). Bien que le VEGF-A ait une affinité dix fois plus élevée pour le VEGF-R1 que pour le VEGF-R2 (211-213), c'est la liaison à ce dernier qui induit les régulations les plus robustes, faisant de ce récepteur le principal transducteur du signal du VEGF-A dans les cellules endothéliales. La signalisation par le VEGF-R1 est faible mais médierait le recrutement des monocytes (214,215) et pourrait constituer un signal de survie pour les cellules tumorales. Une forme soluble du VEGF-R1 (216) joue un rôle antagoniste en séquestrant le VEGF-A et a été récemment impliquée dans la prééclampsie (217). La signalisation opérée par le VEGF-R2 est impliquée dans la stimulation de la prolifération, de la migration et de la survie des cellules endothéliales

(218). La neuropiline-1 est un co-récepteur pour certaines isoformes du VEGF-A, en accroissant leur affinité pour le VEGF-R2 (219).



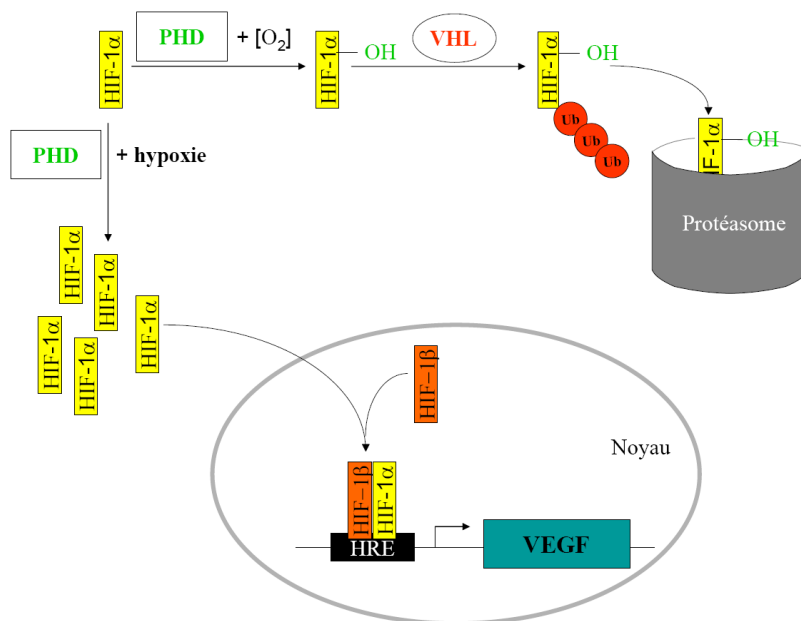
*Figure 36 : Description des différents VEGFs et de leurs récepteurs, ainsi que des principales voies de signalisation et fonctions cellulaires qui en dépendent. (210)*

Le rôle essentiel du VEGF-A dans la vasculogénèse et l'angiogénèse est illustré par la mortalité embryonnaire précoce qui survient chez les embryons privés de l'expression d'un seul allèle (VEGF-A<sup>+/-</sup>). Dans cet embryon, un grand nombre d'anomalies, comme des défauts de vascularisation et un nombre réduit de précurseurs endothéliaux et hématopoïétiques, indiquent que le VEGF-A est impliqué dans la vasculogénèse. D'autres processus développementaux sont également sous la dépendance du VEGF-A. Au cours de l'ossification endochondrale par exemple, un gradient de VEGF est nécessaire pour induire une croissance directionnelle et une invasion du cartilage par les vaisseaux sanguins (220). L'angiogénèse est aussi un processus clé de la fonction normale du cycle ovarien (221) et de l'implantation endométriale (222). Le VEGF-A est également impliqué dans le développement et la fonction du système nerveux (223,224). Plus que sa simple présence, c'est sa concentration qui est un élément critique dans ces divers processus physiologiques (figure 37) expliquant ainsi l'existence d'une multitude de mécanismes contrôlant étroitement son expression et son activité biologique.



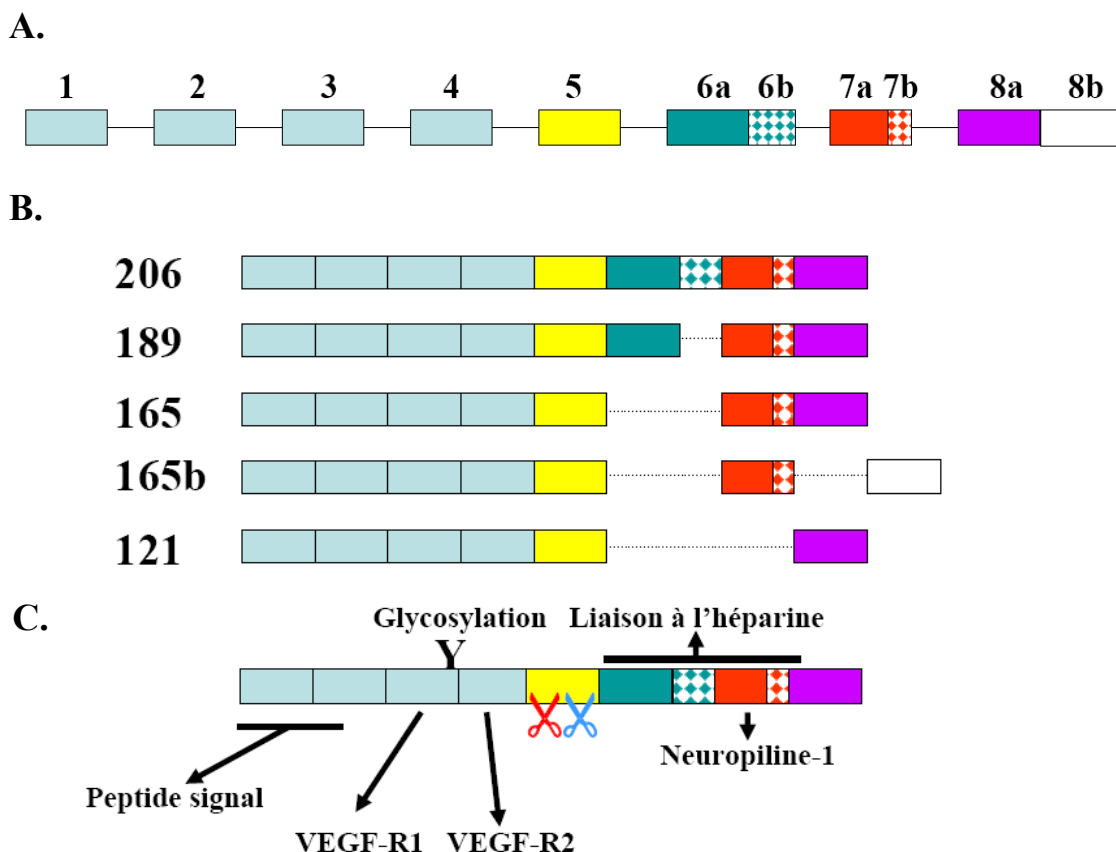
**Figure 37 : Résumé succinct des effets du VEGF-A en fonction de sa concentration (210).** Une concentration trop faible en VEGF-A entraîne un dysfonctionnement de l'endothélium via une réduction de la production de NO et des prostacyclines. Un niveau physiologique faible maintient l'homéostasie et la protection des structures vasculaires, alors que les concentrations plus élevées induisent une expansion vasculaire accompagnée d'une angiogenèse bourgeonnante et d'un élargissement capillaire modéré. A un niveau supraphysiologique, le VEGF-A induit une croissance vasculaire aberrante, la formation de lacunes sanguines et une hyperperméabilité vasculaire conduisant à des œdèmes tissulaires.

L'expression du gène du VEGF-A est régulée à un niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel (225). Un des stimuli les plus remarquables de l'expression du VEGF est l'hypoxie (figure 38).



**Figure 38 : La transcription du VEGF est régulée par les facteurs HIF-1α et β.** En conditions normoxiques, HIF-1α est synthétisé continuellement mais dégradés par le protéasome suite à l'action de la prolyl hydroxylase (PHD). En présence d'une trop faible concentration en oxygène, le manque d'hydroxylation de HIF-1α entraîne son accumulation et la transcription du gène du VEGF-A. (225)

En conditions normoxiques, le facteur HIF-1 $\alpha$  est hydroxylé par des prolyl hydroxylases (PHD, dont on connaît 3 isoformes), ce qui induit sa liaison à la protéine von Hippel Lindau (VHL), son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Dans les tissus hypoxiques, l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$  devient inefficace. Ceci entraîne son accumulation et sa liaison, en association avec HIF-1 $\beta$ , à un élément cis activateur (HRE) du promoteur du VEGF-A (figure 38). De nombreux autres facteurs de transcription induits par l'hypoxie, le stress oxydatif, les UV-B et une multitude de cytokines et de facteurs de croissance sont également impliqués dans la régulation de l'expression de VEGF-A. Un niveau supplémentaire de régulation réside dans la stabilisation de l'ARNm du VEGF-A au niveau de la région 3' non-traduite par des protéines de la famille HUR (226), JNK et p38 (227). Une régulation complémentaire des effets du VEGF-A provient de l'existence d'un processus d'épissage alternatif générant des isoformes de la protéine possédant des propriétés biologiques spécifiques. Le gène du VEGF-A, situé sur le chromosome 6 chez l'humain (228), est composé de 8 exons. Divers processus d'épissage alternatif mènent à la synthèse de plusieurs isoformes de la protéine, dont les plus fréquentes sont le VEGF121, le VEGF165, le VEGF189 et le VEGF206 (229,230), le chiffre indiquant le nombre d'acides aminés que comporte la protéine après excision du peptide signal (figure 39A). Quelques autres isoformes peu abondantes ne différant que par quelques acides aminés ont été décrites. Il est également intéressant de mentionner l'existence d'une famille de variants de VEGF-A dont les 6 derniers acides aminés sont codés par l'exon alternatif 8b et qui sont pour cette raison dénommés VEGFxxx<sub>b</sub> (231).

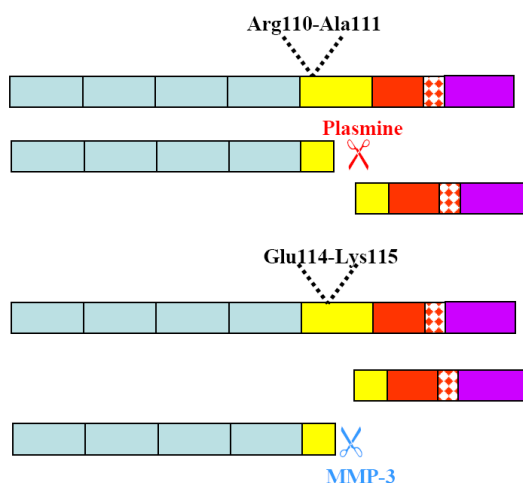


**Figure 39 : Illustration schématique des processus d'épissage alternatif menant à la synthèse de diverses isoformes du VEGF-A.** **A.** Représentation schématique des exons du gène du VEGF-A. **B.** Combinaisons d'exons ou de parties d'exons codant pour les principales isoformes du VEGF générées par épissage alternatif. **C.** Les différents exons codent pour des domaines possédant des activités biologiques spécifiques telles que la liaison aux VEGF-R1 et -R2, à l'héparine ou à la neuropiline-1. ✂ et ✂ représentent, respectivement, des sites préférentiels de clivage par la plasmine et diverses MMPs.

Toutes les isoformes précédemment connues du VEGF-A humain contiennent les exons 1 à 5 et diffèrent entre elles par la présence, partielle ou complète, de séquences correspondant aux exons 6 à 8 (figure 39C). L'exon 1 et une partie de l'exon 2 contiennent la séquence du peptide signal. C'est au niveau de la séquence codée par l'exon 3 que se situent les sites de dimérisation du VEGF, de liaison au récepteur VEGF-R1 et de glycosylation. Les exons 4 et 5 codent respectivement pour le domaine de liaison au VEGF-R2 (232) et les principaux sites de clivage par la plasmine (233) et la MMP-3 (234). Les domaines protéiques correspondants aux exons 6 et 7 contiennent les sites de liaison à l'héparine et à la neuropiline (232). Enfin, il a été récemment démontré que les acides aminés codés par l'exon 8a participeraient à l'interaction avec la neuropiline (235). Un nouveau variant d'épissage du VEGF-A a été récemment décrit, le VEGF165b (231), ne différant du VEGF-165a que par les six derniers acides aminés résultant de l'utilisation de

l'exon 8b remplaçant l'exon 8a (figure 39B). Bien qu'il se lie aux VEGF-R1 et -R2 avec la même affinité que le VEGF-165a, il n'induirait qu'une phosphorylation faible et transitoire du VEGF-R2 et, plus en aval, d'Erk1/2. Par ailleurs, il n'interagirait pas avec la neuropiline et ne se fixerait que faiblement à l'héparine. Ce nouveau variant, détecté principalement dans les cellules épithéliales, serait donc par sa liaison au VEGF-R2 un antagoniste des isoformes de type VEGF<sub>xxxxa</sub> (contenant les 6 acides aminés codés par l'exon 8a) (236). Les séquences particulières de chacune des isoformes du VEGF-A leur confèrent des propriétés biologiques spécifiques. Alors que le VEGF121 est un polypeptide acide et totalement diffusible, les VEGF189 et 206 sont basiques et presque totalement séquestrés dans la matrice extracellulaire (237). Le VEGF165 présente des propriétés intermédiaires (238).

Il est important de noter que toutes ces isoformes sont sensibles à la protéolyse (237), car elles possèdent toutes la séquence codée par l'exon 5, qui est le site principal de clivage par diverses protéases (234,239,240). Le clivage par la plasmine (entre l'arginine 110 et l'alanine 111) génère un fragment N-terminal comprenant les acides aminés 1 à 110, contenant le site de fixation aux récepteurs et totalement diffusible, et le fragment 111-165, capable de se lier à l'héparine. Le VEGF-A peut également être clivé dans ce même domaine par certaines MMPs dont la MMP-3 (stromélysine-1) semble la plus efficace ((234), L. Iruela-Arispe, communication personnelle) (figure 40).



**Figure 40 :** Représentation schématique du clivage du VEGF165 par la plasmine ou la MMP-3 au niveau du domaine codé par l'exon 5.

Peu d'études ont tenté de comprendre les mécanismes de régulation menant à l'expression différentielle des différentes isoformes du VEGF-A (241-243). Parmi celles-ci, Nowak et



al. en 2008 (244) ont montré que l'IGF induit plus spécifiquement la synthèse des isoformes de type VEGF<sub>xxx</sub>a, alors que le TGF $\beta$ 1 engage une voie de signalisation p38 qui mène vers un épissage alternatif formant du VEGF<sub>xxx</sub>b.

## ***Résultats***

### **1. Induction de l'isoforme VEGF111 par les agents génotoxiques**

#### **1.1. Résumé des résultats des publications n°3 et n°4**

Le nouveau variant du VEGF-A que nous avons mis en évidence dans les cellules HaCat irradiées par les UV-B a fait l'objet d'une étude approfondie détaillée dans les publications n°3 et 4.

Publication n°3 :

**Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform  
VEGF111 is induced by genotoxic agents.**

Mineur P, Colige AC, Deroanne CF, Dubail J, Kesteloot F, Habraken Y, Noël A, Vöö S,  
Waltenberger J, Lapière CM, Nusgens BV, Lambert CA.  
J Cell Biol. 2007 Dec 17; 179(6):1261-73.

Publication n°4 :

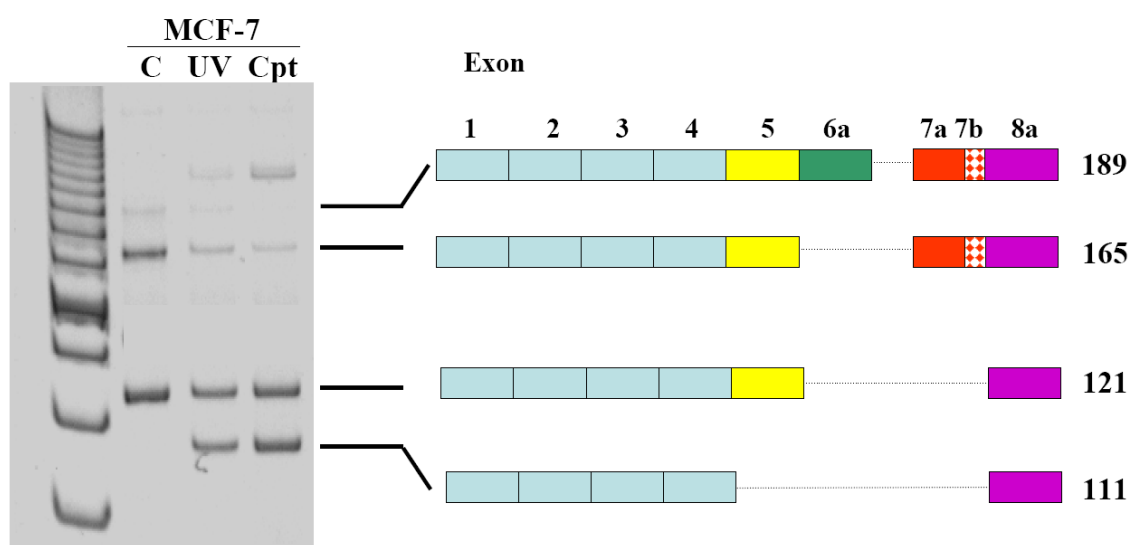
**VEGF111: Dr Jekyll and Mr Hyde?**

Lambert CA, Mineur P, Nusgens BV.  
Medecine Sciences (Paris). 2008 Jun-Jul;24(6-7):579-80.

Les principaux résultats rapportés dans ces publications sont brièvement exposés ci-dessous.

1. Un nouveau variant du VEGF-A a été caractérisé. Il est composé des séquences codées par les exons 1 à 4 et 8a et a été nommé VEGF111, en accord avec la nomenclature communément admise. Ce variant contient donc les sites de glycosylation et de liaison aux VEGF-R1 et -R2. L'absence des domaines codés par les exons 6 et 7 devrait conférer au VEGF111 une diffusibilité similaire à celle du VEGF121, tandis que l'épissage de l'exon 5 devrait lui conférer une résistance à la protéolyse.

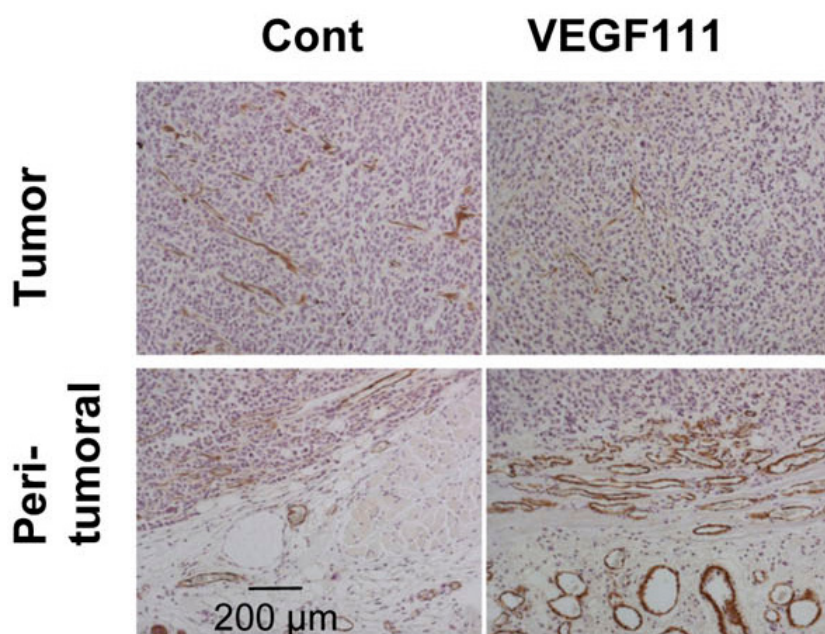
2. Son expression est induite in vitro, de façon dose-dépendante et en fonction du temps, par des stress génotoxiques tels que les UV-B et les agents chimiothérapeutiques (figure 41). Elle découle toujours d'un traitement endommageant l'ADN et peut, selon le type cellulaire, atteindre jusqu'à 60% du VEGF total. L'hypoxie, l'apoptose, l'hypoglycémie et les radicaux libres ne semblent pas capables d'induire sa synthèse. Une production de VEGF111 est observée dans les tumeurs sous-cutanées de cellules MCF-7 chez la souris athymique après injection intratumorale de camptothécine.



**Figure 41 : Mise en évidence de l'induction de l'expression du VEGF111 par les agents génotoxiques.** Les cellules MCF-7 ont été cultivées dans des conditions contrôles (C), exposées aux UV-B (UV) ou traitées à la camptothécine (Cpt). Les UV-B et la camptothécine induisent l'expression du VEGF111, principalement au détriment du VEGF165.

3. Le VEGF111 a été produit en cellules eucaryotes (HEK293). Il est biologiquement actif in vitro. Il induit, en effet, la phosphorylation du VEGF-R2 et de Erk1/2 dans les cellules HUVEC. Il stimule également leur prolifération de façon similaire aux VEGF121 et 165.
4. Le VEGF111, comme les VEGF121 et 165, est capable d'induire la différenciation de cellules souches embryonnaires ES en structures vasculaires.
5. L'activité biologique du VEGF111 a été évaluée in vivo dans les souris athymiques par injection sous-cutanée de cellules HEK293 contrôles ou exprimant le VEGF111, le VEGF121 ou le VEGF165. Alors que le tissu péri-tumoral des tumeurs contrôles

est pauvrement vascularisé, un réseau dense de vaisseaux matures et fonctionnels est observé en périphérie des tumeurs exprimant le VEGF111 (Figure 42). Les paramètres histomorphométriques des tumeurs exprimant les VEGF111, 121 et 165 sont détaillés dans la publication.

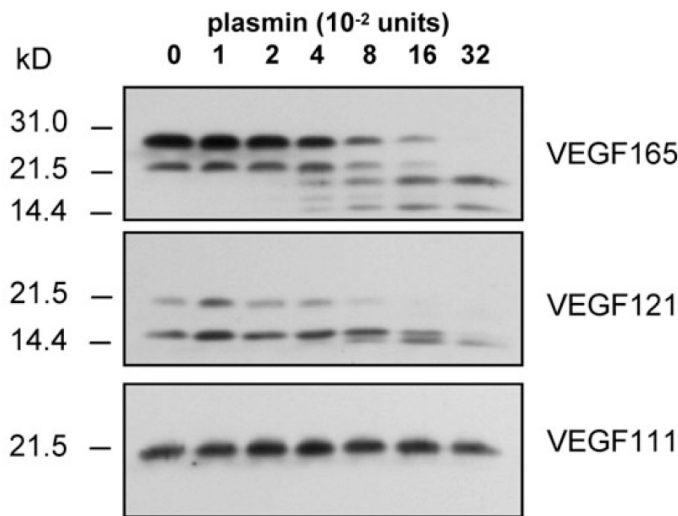


**Figure 42:** Mise en évidence du réseau vasculaire se formant à l'intérieur (tumor) ou autour (peritumoral) des tumeurs contrôles ou exprimant le VEGF111. Les tumeurs formées par les HEK293 transfectées par le vecteur vide (Cont) sont modérément vascularisées mais le tissu péri-tumoral reste pauvre en structures vasculaires.

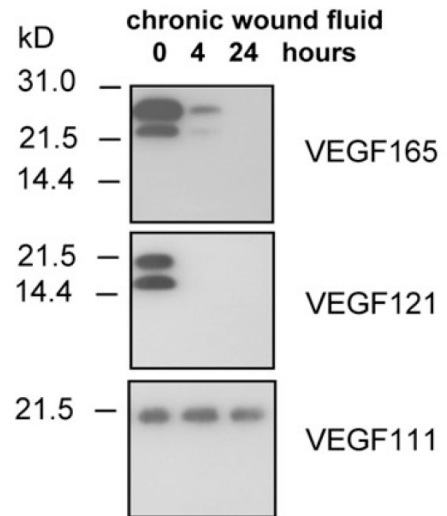
Le tissu tumoral formé par les HEK293 exprimant le VEGF111 ne contient que peu de vaisseaux sanguins tandis que les tissus péri-tumoraux sont richement vascularisés. Marquage des vaisseaux matures (en brun) par un anticorps anti  $\alpha$ -SMA.

- La résistance à la protéolyse du VEGF111, en raison de l'absence du site de clivage par la plasmine et les MMPs, est confirmée par des expériences in vitro mettant le VEGF111 recombinant en présence de plasmine ou d'exsudats d'ulcère riches en enzymes protéolytiques (figure 43). Le VEGF111 résiste à la dégradation et conserve pleinement son activité biologique après ces traitements, tandis que les VEGF121 et 165 sont dégradés et perdent leur activité biologique.

A.



B.



**Figure 43 : Evaluation de la résistance à la protéolyse in vitro des VEGF111, 121 et 165 mis en présence de plasmine ou d'exsudats d'ulcères cutanés.** Les 3 isoformes du VEGF sont incubées à 37°C durant 24h en présence de quantités croissantes de plasmine (A) ou mises en contact avec un exsudat d'ulcères durant 4h ou 24h (B). L'analyse de ces échantillons par western blotting démontre que le VEGF111 résiste à la dégradation à l'inverse des VEGF165 et 121 qui sont rapidement dégradés.

**En conclusion, le VEGF111, dont l'expression est induite par un stress génotoxique, est résistant à la protéolyse et pro-angiogène in vitro et in vivo. Ces caractéristiques remarquables en font un facteur présentant une « double personnalité ».** En effet, son induction potentielle au cours de chimiothérapie et/ou de radiothérapie pourrait être fortement préjudiciable, en permettant une meilleure vascularisation de la tumeur ce qui favoriserait sa croissance et sa dissémination métastatique. A contrario, il est toutefois possible qu'une perfusion plus efficace de la tumeur puisse la rendre plus sensible à certaines chimiothérapies. Ses propriétés pro-angiogènes, associées à sa remarquable résistance à la protéolyse, en font par ailleurs un candidat de valeur dans le traitement de diverses pathologies liées à un défaut de vascularisation, comme les pathologies ischémiques cardiovasculaires, la cicatrisation de plaies chroniques, les maladies neurodégénératives et l'éclampsie.

## **1.2. Publication n°3**

# In This Issue

## A lean and mean VEGF for cancer cells

**C**ells that suffer DNA damage start pumping out a previously undiscovered version of the angiogenesis promoter VEGF, as Mineur et al. report. The variant, which is tough and mobile, might help cancer cells tap new sources of blood.

Researchers have already nabbed about 10 versions of VEGF, which many cancer cells overproduce to feed their need for blood. Mineur et al. were studying the effects of UV light on cells when they stumbled across another variant that lacks three of the eight standard VEGF exons. The new version, which the researchers dubbed VEGF111, forms in cells exposed to UV radiation or DNA-breaking compounds such as camptothecin. Those results suggest that the VEGF111 results from DNA damage.

VEGF111 is short but sturdy; it lacks the region that's vulnerable to protein-slicing enzymes such as plasmin, making it harder to break down. The variant is also missing the VEGF section that interacts with the extracellular matrix (ECM). That loss might boost VEGF111's mobility because it wouldn't get snared as it diffuses through the ECM.

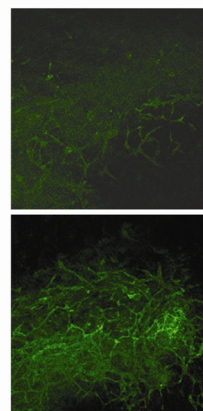
The researchers didn't detect the new variant in cells from healthy mice and people, or in animals dosed with UV light or camptothecin, perhaps because the variant is rare. But tumor cells transplanted into mice that received camptothecin did manufacture VEGF111. To gauge the molecule's effects on

angiogenesis, the team injected mice with tumor cells that fashioned one of three VEGF versions, including VEGF111. All three types of the growth factor spurred formation of new blood vessels. These vessels covered the tumors that made the two other VEGF isoforms, but they sprouted a short distance away from growths that produced VEGF111. The reason for this difference isn't clear.

Because it's durable and forms in response to DNA damage, such as that caused by chemotherapy, VEGF111 could be a formidable foe. It might help cancer cells resist drugs, for instance.

On the other hand, the molecule could spur new treatments for conditions in which angiogenesis is desperately needed, such as heart attacks and non-healing wounds. **JCB**

Reference: Mineur, P., et al. 2007. *J. Cell Biol.* 179:1261–1273.



**More blood vessels sprout on cell clusters that fashion VEGF111 (bottom).**

Downloaded from www.jcb.org on December 18, 2007

# Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents

Pierre Mineur,<sup>1</sup> Alain C. Colige,<sup>1</sup> Christophe. F. Deroanne,<sup>1</sup> Johanne Dubail,<sup>1</sup> Frédéric Kesteloot,<sup>1</sup> Yvette Habraken,<sup>3</sup> Agnès Noël,<sup>2</sup> Stefan Vöö,<sup>4</sup> Johannes Waltenberger,<sup>4</sup> Charles M. Lapière,<sup>1</sup> Betty V. Nusgens,<sup>1</sup> and Charles A. Lambert<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Connective Tissues Biology, <sup>2</sup>Laboratory of Tumor and Development Biology, and <sup>3</sup>Laboratory of Fundamental Virology and Immunology, Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée Research and Center for Research in Experimental Cancerology, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium  
<sup>4</sup>Cardiovascular Research Institute Maastricht, University of Maastricht, 6200 MD Maastricht, Netherlands

Ultraviolet B and genotoxic drugs induce the expression of a vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) splice variant (VEGF111) encoded by exons 1–4 and 8 in many cultured cells. Although not detected in a series of normal human and mouse tissue, VEGF111 expression is induced in MCF-7 xenografts in nude mice upon treatment by camptothecin. The skipping of exons that contain proteolytic cleavage sites and extracellular matrix-binding domains makes VEGF111 diffusible and resistant to proteolysis. Recombinant VEGF111 activates VEGF receptor 2 (VEGF-R2) and extracellularly regulated kinase 1/2 in human umbilical vascular endothelial cells

and porcine aortic endothelial cells expressing VEGF-R2. The mitogenic and chemotactic activity and VEGF111's ability to promote vascular network formation during embryonic stem cell differentiation are similar to those of VEGF121 and 165. Tumors in nude mice formed by HEK293 cells expressing VEGF111 develop a more widespread network of numerous small vessels in the peritumoral tissue than those expressing other isoforms. Its potent angiogenic activity and remarkable resistance to proteolysis makes VEGF111 a potential adverse factor during chemotherapy but a beneficial therapeutic tool for ischemic diseases.

## Introduction

VEGF-A is a potent angiogenic factor that stimulates vascular endothelial cell survival, proliferation, migration, and differentiation, alters their pattern of gene expression, and delays senescence (Dvorak, 2000). VEGF acts through binding to VEGF receptor 1 (VEGF-R1; flt-1) and 2 (VEGF-R2; KDR/flk-1), the latter apparently mediating most of the VEGF signaling, whereas the role of VEGF-R1 is more elusive (Waltenberger et al., 1994). Affinity binding of VEGF-A to VEGF-R2 is enhanced by neuropilin-1, a nonkinase coreceptor (Soker et al., 1998).

Both homozygous and heterozygous deletions of the VEGF-A gene in mice are embryonic lethal (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996), suggesting that a finely tuned regulation of VEGF expression is essential for development. Excessive

and/or ectopic angiogenesis or its reverse, defective vascularization, is responsible for several pathologies. VEGF is a major initiator of tumor angiogenesis, a critical step in cancer growth and metastasis (Skobe et al., 1997). Overexpression of VEGF is also determinant in retinopathies (Caldwell et al., 2005) and many other diseases. A large effort is being produced to decrease the excessive production of VEGF or to tackle VEGF-induced angiogenesis with neutralizing antibodies, antagonists, function inhibitors, or inhibitory soluble receptors (Ferrara, 2005). In contrast, pathologies such as ischemia, chronic wounds, and erectile dysfunction could benefit from neovascularization driven by VEGF delivery (Lauer et al., 2002; Yoon et al., 2004; Burchardt et al., 2005).

VEGF is a disulfide-bonded dimeric glycoprotein with a molecular mass of 34–45 kD encoded by a gene that contains eight exons. The known isoforms of human VEGF generated by alternative splicing are encoded by exons 1–5 and a varying combination of the other exons (Jingjing et al., 1999; Whittle et al., 1999; Robinson and Stringer, 2001; Bates et al., 2002). The domains encoded by the first four exons contain the signal peptide, the

Correspondence to Charles A. Lambert: c.lambert@ulg.ac.be

Abbreviations used in this paper:  $\alpha$ SMA,  $\alpha$  smooth muscle actin; CM, conditioned medium; ERK1/2, extracellularly regulated kinase 1/2; HUVEC, human umbilical vascular endothelial cell; PAEC, porcine aortic endothelial cell; reVEGF, recombinant VEGF; ROS, reactive oxygen species; rRNA, ribosomal RNA; VEGF-R, VEGF receptor.

The online version of this article contains supplemental material.



Table I. The amplified RNA, primer numbers, sequences, and length in base pairs of RT-PCR products

Primer	mRNA	Primers	Length	Std
			bp	bp
P1 (forward)	VEGF	CCTGGTGGACATCTCCAGGAGTA	530, 479, 407,	311
P2 (reverse)		CTCACCGCCTCGGCTTGTCACA		
P3 (forward)	VEGF (full length)	CACACGGCGCCGCCGAAACCATGAACCTTCTGCTGTC	586, 454, 424 <sup>b</sup>	NA
P4 (reverse)		ACACAGCTAGCTCACCGCCTCGGCTTGTCACA		
P1 (forward)	VEGF111 specific	CCTGGTGGACATCTCCAGGAGTA	237	NA
P5 (reverse)		CTCGGCTTGTCACATCTGCATTCA		
P6 (forward)	28S rRNA	GTTCAACCCACTAATAGGGAACGTG	212	269
P7 (reverse)		GATTCTGACTTAGAGGCGTTCAGT		
P8 (forward)	Bcl-X	ACCCCCAGTGCCATCAATGGCAA	512 (Bcl-XI)	NA
P9 (reverse)		CCCCTCAGGAACACAGCGGTTGA		
P10 (forward)	CD31	CAAGGCGATTGTAGCCACCTCCA	206	NA
P11 (reverse)		CCAACAACCTCCCCTTGCTCCAGA		

Std, length in base pairs of amplification products of the synthetic standard RNA. NA, not available.

<sup>a</sup>For human VEGF206, 189, 165, 145, 121, and 111, respectively.

<sup>b</sup>For human VEGF165, 121, and 111, respectively.

sequence of recognition by VEGF-Rs, and a glycosylation site. The amino acid sequence encoded by exon 5 includes the main site of cleavage by plasmin (Claffey et al., 1995; Keyt et al., 1996) and matrix metalloproteinases (Lee et al., 2005). Exon 6 encodes the sequence that binds to heparin and a cell surface retention consensus sequence. The sequence encoded by exon 7, besides a moderate affinity for heparin and heparan sulfate proteoglycans, contains the binding site for neuropilin-1. VEGF121 (lacking exons 6 and 7) is freely diffusible, whereas VEGF189 (containing exons 1–6A, 7, and 8) is primarily associated with the cell surface and the ECM. VEGF165 (containing exons 1–5, 7, and 8) displays properties that are intermediate between VEGF189 and 121 (Park et al., 1993).

Cancers often arise as a consequence of the accumulation of genetic mutations induced by a wide variety of physical and chemical agents. UV irradiation is an environmental element with carcinogenic potential. UV-B (290–320 nm) induces the formation of cyclobutane pyrimidine dimers in the DNA, which are considered to play an essential role in skin cancer induction (Katiyar et al., 2001). Cutaneous alterations observed after a single exposure to UV-B include erythema and edema related to an altered expression of biological mediators, including angiogenic factors (Blaudschun et al., 2002). In this paper, we show that UV-B irradiation and genotoxic drugs induce the expression of a new VEGF splice variant, an isoform lacking the sequence encoded by exons 5–7. This isoform, which is biologically active and resistant to proteolysis, may be of therapeutic interest.

## Results

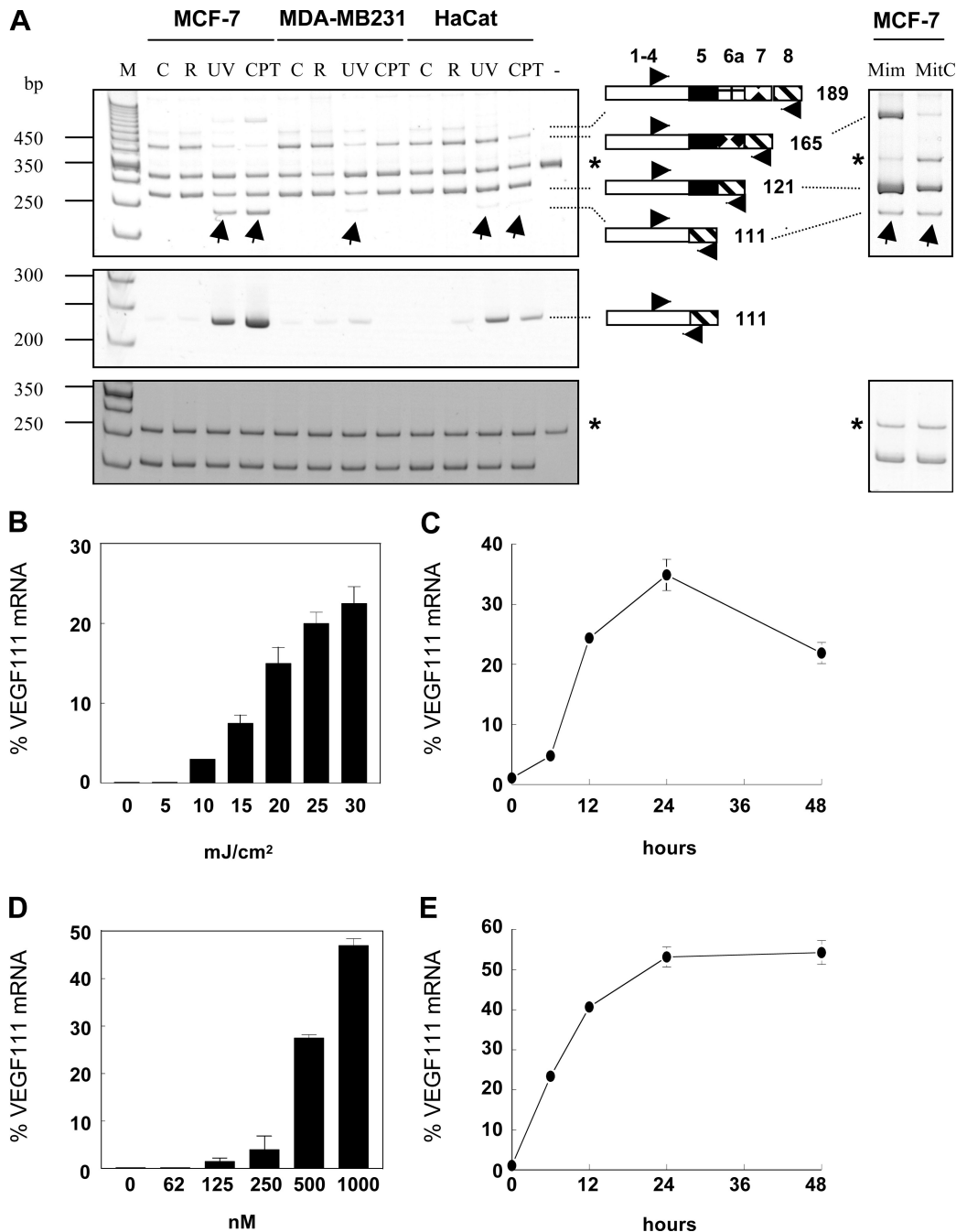
### UV-B and genotoxic agents induce the expression of a new VEGF isoform lacking exons 5–7

UV-B irradiation (30 mJ/cm<sup>2</sup>) of HaCat cells, MDA-MB-231 cells, and MCF-7 cells affected the expression of the mRNA encoding the various VEGF isoforms as evaluated by quantitative RT-PCR. Using primers P1 and P2 (Table I; Hajitou et al., 2001) chosen on exons 3 and 8, respectively, VEGF189, 165, and 121

mRNAs were detected in control and UV-exposed cells (Fig. 1 A, top left). Upon UV treatment, the mRNA levels of VEGF165 and, to a smaller extent, VEGF189 and 121 were decreased, whereas a faster migrating RT-PCR product (Fig. 1 A, arrows) was observed in MCF-7 cells and, at a lower level, in HaCat and MDA-MB-231 cells. This product was never observed in nonirradiated cells. Sequence analysis of this fast migrating product revealed the presence of sequences of exons 3, 4, and 8 and the absence of sequences encoded by exons 5–7. Sequencing of the full-length fast migrating VEGF cDNA variant amplified using primers P3 and P4 (GenBank/EMBL/DBJ accession no. DQ229900; Table I) demonstrated that it was formed by exons 1–4 and 8. Skipping of the 30 bp encoded by exon 5 did not change the reading frame of the downstream sequence. According to the current nomenclature, this new splice variant was named VEGF111, as the sequence theoretically encodes a 111 amino acid–long human VEGF molecule after excision of the signal peptide. It is noteworthy that the total VEGF mRNA level, which can be quantitatively evaluated thanks to the synthetic RNA used as internal standard in each RT-PCR reaction tube, is only barely modified in the UV-treated cells. VEGF111 is formed mostly at the expense of the VEGF165 variant.

As the junction between exons 4 and 8 is specific to VEGF111 mRNA, this isoform was specifically RT-PCR amplified by using a reverse primer (P5) sitting astride these exons, primer P1 being used as forward primer. A product of the expected size (237 bp) was detected using RNA from UV-B-irradiated cells but not from control cells (Fig. 1 A, middle left).

A dose-response analysis of the expression of VEGF111 mRNA upon treatment with UV-B up to 30 mJ/cm<sup>2</sup> was performed in MCF-7 cells. Data indicated that the expression of VEGF111 progressively increased with the energy of the irradiation (Fig. 1 B). The level of VEGF111 mRNA reached ~25% of the overall VEGF mRNA in the illustrated experiment but may vary between 25 and 40% from experiment to experiment. An energy of 30 mJ/cm<sup>2</sup> was chosen in all subsequent experiments. A time-course relationship was also established in MCF-7 cells. VEGF111 mRNA was readily detected 12 h after irradiation, peaked at 24 h, and decreased thereafter (Fig. 1 C). A cDNA



**Figure 1. Genotoxic agents induce the expression of VEGF111.** The indicated cell lines were treated with 30 mJ/cm<sup>2</sup> UV-B, 1  $\mu$ M camptothecin, 5 mM *l*-mimosin, or 100  $\mu$ g/ml mitomycin C for 24 h except otherwise indicated, and VEGF mRNA, VEGF111 mRNA, and 28S rRNA were measured by RT-PCR. (A) PAGE analysis of RT-PCR products of VEGF mRNA (top), VEGF111 mRNA (middle), and 28S rRNA (bottom). Arrows in the top panel indicate the VEGF111 amplification product. The drawings represent the exons (not to scale) encoding the corresponding VEGF isoforms. C, control cells; CPT, camptothecin treatment; M, 50-bp molecular weight markers; Mim, mimosin; MitC, mitomycin C; R, cells rinsed with red phenol-free medium but not irradiated; UV, UV-B irradiation; -, no cellular RNA. Asterisks indicate the RT-PCR products of synthetic RNA added to the test tubes to monitor reaction efficiency. (B-E) Dose-response analysis (B and D) and kinetics of induction (C and E) of the VEGF111 mRNA level in MCF-7 cells irradiated by UV-B (B and C) or treated with camptothecin (D and E). VEGF111 mRNA is given in percentages of the total VEGF isoform mRNA. Error bars represent SD.

corresponding to the VEGF111 amplification product was induced upon UV irradiation, although to various levels, in several human and animal cells lines and in primary human keratinocytes and fibroblasts 24 h after treatment (Table II).

As UV-B is known to display genotoxic effects, the expression of VEGF111 was similarly investigated upon treatment

with genotoxic agents inducing double-strand breaks, namely camptothecin, mimosin, and mitomycin C. 1  $\mu$ M camptothecin, a DNA topoisomerase I poison, induced the expression of VEGF111 in HaCat and MCF-7 cells within 24 h to a level similar or even higher than that observed after UV irradiation (Fig. 1 A). A dose-response analysis indicated that VEGF111 induction progressively

Table II. Induction of VEGF111 and Bcl-Xs/Bcl-Xl ratio by UV-B

Cells	VEGF111	Bcl-Xs/Bcl-Xl
	%	
MCF-7	33	3.1
HuH7	26	ND
A2058	20	1.4
MO59K	16	1.4
HCT116	15	1.8
HT1080	14	0.7
BT549	12	0.9
AT5BIVA	12	ND
CHO	11	2.3
ES CGR8	8	ND
HUVEC	8	ND
PAM212	8	1.4
MEF	7	ND
HS578T	7	3.9
HaCat	6	1.7
HSF2	5	ND
HSF1	4	4.0
Human keratinocytes	1–4	ND
HEK293	3	0.6
AT5BI	2	3.3
HeLa	2	2.5
MDA-MB-231	2	1.3
COS-1	0	2.1
NIH3T3	0	0.1
CT-26	0	ND
B16F10	0	ND

Percentage of VEGF111 (VEGF110 in rodent cell lines) mRNA over total VEGF mRNA and fold induction of the Bcl-X/Bcl-Xl ratio after UV-B treatment.

increased with the concentration of camptothecin in MCF-7 cells (Fig. 1 D). Time-course analysis showed that VEGF111 mRNA expression was already detected after 6 h and reached a plateau after 24 h (Fig. 1 E). MCF-7 cells treated with camptothecin for 24 h were washed and further incubated in fresh medium for up to 5 d. VEGF111 mRNA decreased rapidly after removal of the camptothecin, becoming undetectable after 24 h (unpublished data). 5 mM L-mimosin and 100  $\mu$ g/ml mitomycin C, two other genotoxic agents, also induced the expression of VEGF111 mRNA (Fig. 1 A, top right). A similar induction of VEGF111 was observed in MCF-7 cells treated by UV or camptothecin in the absence of FCS in the medium.  $\gamma$ -Ray irradiation of some of these cell lines did not induce VEGF111 mRNA.

Mediums were conditioned for 24 h by MCF-7 cells either UV irradiated or treated with camptothecin for 6 h and were further washed to eliminate the compound. Naive MCF-7 cells incubated for 24 h with these conditioned mediums (CMs) did not express VEGF111 mRNA, suggesting that the induction of VEGF111 was not dependent on a paracrine mechanism (unpublished data).

#### Expression of VEGF111 in vivo

VEGF111 (or VEGF110, the equivalent of human VEGF111 in rodents) mRNA was measured by RT-PCR in a series of human and mice tissues as well as 6–18-d-old in toto mice embryos. No VEGF111/110 was detected in any of these tissues, whereas

the traditional isoforms were easily detected, although at variable levels. Trials to induce VEGF110 in healthy BalbC or nude mice upon UV-B,  $\gamma$ -ray irradiation, or i.v. injection of the genotoxic agent camptothecin or its water-soluble analogue irinotecan were not successful.

Nude mice supplemented with oestrogens received a subcutaneous injection of MCF-7 cells ( $4 \times 10^6$  cells) mixed with 100  $\mu$ l matrigel on both flanks as previously described (Sounni et al., 2002). After 3 wk, tumors had developed, and mice were treated with a daily intratumoral injection of 50  $\mu$ l camptothecin (2 mg/ml) in one flank or the vehicle alone in the other flank for 1, 2, or 3 d and killed the day after the last injection. VEGF111 mRNA was detected in tumors injected with camptothecin but not or to a barely detectable level in the tumors injected with the vehicle in the controlateral flank (Fig. 2). No VEGF111 mRNA was detected in the tumors of noninjected mice while the other isoforms of VEGF were present.

#### Recombinant VEGF111 is glycosylated

Recombinant VEGF (reVEGF) 165, 121, and 111 were produced in serum-free medium of transfected HEK293 cells and thereafter were called reVEGFs (produced in eukaryotic cells). These cells were selected for their low intrinsic expression of VEGF. When evaluated in parallel cultures, the production of reVEGF by transfected HEK293 was always similar for VEGF121 and 165 and threefold lower for VEGF111. CM containing 20 ng reVEGF, as measured by ELISA, were analyzed by Western blotting in reducing conditions with or without treatment with PNGase F (Fig. 3 A). In the absence of enzymatic treatment, VEGF appeared as a single band at  $\sim$ 18 kD in the CM of HEK293 expressing reVEGF111 and as a doublet at  $\sim$ 17 and 21 kD and at 22 and 26 kD in the CM of HEK293 expressing reVEGF121 and reVEGF165, respectively. No signal was detected in CM from cells transfected with the empty plasmid (unpublished data). As VEGF contains one glycosylation site, the bands of lower mobility likely correspond to glycosylated forms of reVEGF121 and 165. They are indeed shifted to faster migrating forms at the expected size after deglycosylation with PNGase F. The deglycosylated reVEGF165 produced in HEK293 cells displayed a mobility identical to commercial reVEGF165 produced in bacteria. The reVEGF111 expressed as an 18-kD band was processed to the expected lower size ( $\sim$ 14 kD) upon PNGase F treatment, suggesting that the majority of reVEGF111 molecules are glycosylated in HEK293 cells.

#### reVEGF111 is biologically active in vitro

Biological effects of reVEGF111 were evaluated in vitro on endothelial cells, human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs), and porcine aortic endothelial cells (PAECs) expressing VEGF-R1 (PAEC/R1) or VEGF-R2 (PAEC/R2) or transformed with empty vector (PAEC; Waltenberger et al., 1994). reVEGF121 and 165 were used as positive controls, and the CM of HEK293 cells transfected with the empty vector was used as a negative control. HUVEC, PAEC, PAEC/R1, or PAEC/R2 starved overnight were treated for 5 min with each of the three reVEGF isoforms and the control CM. reVEGF111 was able to induce VEGF-R2 phosphorylation in HUVECs and PAEC/R2 at a level

similar to that induced by commercially available VEGF165, reVEGF165, and reVEGF121 (Fig. 3 B). Control medium had no effect. In contrast, we did not observe any phosphorylation of the VEGF-R1 in HUVECs or PAEC/R1. The phosphorylation of extracellularly regulated kinase 1/2 (ERK1/2) was induced in HUVECs, PAEC/R1, and PAEC/R2 but not in PAEC upon treatment with reVEGF111, similar to reVEGF121 or 165 (Fig. 3 C). Control CM had no effect on the ERK1/2 phosphorylation status. Together, these data indicate that VEGF111 signaling is mediated through VEGF-R1 and -R2.

The induction of intracellular calcium transients by reVEGF111 was investigated in HUVECs by single-cell real-time fluorescence microscopy. Although control medium induced calcium transients in only 15% of the cells, reVEGF111 induced calcium transients in 70% of them (i.e., to a level similar to that observed with reVEGF165 and 121; Fig. 3 D). reVEGF111 stimulated HUVEC proliferation to the same extent as reVEGF121 (twofold) and slightly less than reVEGF165 (2.5-fold; Fig. 3 E). Control CM induced a significantly lower cell proliferation rate.

PAEC/R2 cells and monocytes have been previously shown to migrate in response to a chemotactic gradient of VEGF165 (Waltenberger et al., 1994; Stadler et al., 2007). We tested VEGF111 for its ability to promote the migration of PAEC/R2 cells by using a modified Boyden chamber assay (Fig. 3 F). The strongest migratory response to VEGF111 was observed at concentrations ranging between 1 and 20 ng/ml with a peak at 10 ng/ml ( $20.8 \pm 2.3$  cells/high-power field;  $P = 0.006$  vs. unstimulated migration). The peak migration of PAEC/R2 cells to VEGF111 was slightly lower than the peak migratory response to VEGF165 ( $28.7 \pm 2.7$  cell/high-power field peak migration;  $P = 0.09$ ). In contrast, VEGF111-induced migration reached higher levels than that induced by VEGF121 ( $15.5 \pm 1.7$  cells/high-power field;  $P = 0.13$ ). As tested by checkerboard analysis, the migration induced by VEGF111 occurred in the presence of a positive concentration gradient between the two compartments, indicating a true chemotactic activity without appreciable unspecific chemokinetic activity. It is well established that monocytes isolated from peripheral blood migrate in response to the activation of VEGF-R1, whereas the expression of VEGF-R2 is absent or below the detection limit (unpublished data). In our hands, VEGF111 showed no consistent effect on monocyte migration (unpublished data). These observations strongly suggest that VEGF111 mediates its chemotactic signal via VEGF-R2 rather than VEGF-R1.

#### VEGF111 induces an angiogenic phenotype in embryoid bodies

The proangiogenic activity of VEGF111 was tested in an embryoid bodies assay. Mouse embryonic stem cells were cultured for 6 d in the presence of the three reVEGF isoforms or the control medium. Embryoid bodies were fixed at day 6 and labeled by anti-CD31 antibodies to visualize vascular structures. The density of the capillary-like structures was increased in the samples treated with the three reVEGF isoforms as compared with the control (Fig. 4 A) and evaluated by a visual score (Fig. 4 B). reVEGF111 significantly increased the CD31 mRNA at day 4 (Fig. 4 C) to a level similar to that induced by reVEGF165 and 121.

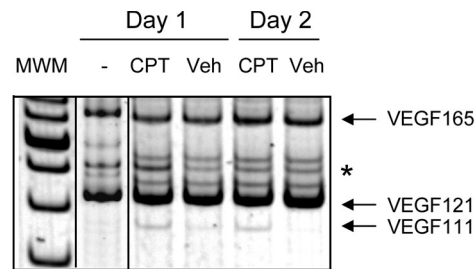


Figure 2. **Expression of VEGF111 in MCF-7 tumors treated with camptothecin.** Estrogen-supplemented nude mice received a subcutaneous injection of MCF-7 cells ( $4 \times 10^6$  cells) mixed with 100  $\mu$ l matrigel in both flanks. After 3 wk, they received a daily intratumoral injection of 50  $\mu$ l camptothecin (2 mg/ml) or the vehicle alone for 1 and 2 d. Tumors were collected 24 h after the last injection, and the VEGF mRNA expression was measured by RT-PCR. MWM, molecular weight marker; CPT, camptothecin treatment. The asterisk indicates the RT-PCR products of synthetic RNA added to the test tubes to monitor reaction efficiency.

To gain further insights into the mechanism of angiogenesis, the effect of the various reVEGF on the pattern of endothelial cell divisions in embryoid bodies was undertaken according to the procedure described by Zeng et al. (2007). Embryoid bodies were prepared and supplemented with 5 ng/ml reVEGF111, 121, or 165. At day 8, they were fixed and immunostained with anti-CD31 and antiphosphohistone H3. The angle between a line drawn along the long axis of the vessel and the division plane of mitotic cells was calculated for 43–63 cells in 11 embryoid bodies for each reVEGF. The majority of the division planes was oriented within 75–90° (i.e., close to perpendicular to the long axis of the vessel; Fig. 4, D and E).

#### VEGF111 induces vascularization in vivo

Nude mice (six per group) were injected with matrigel containing empty plasmid-transfected (control) HEK293 in one flank and HEK293 expressing VEGF111, 121, or 165 in the contralateral flank. In addition, three mice were injected with control cells in both flanks. Tumors were observed at the site of injection in nearly all mice: 21/21 in control HEK293, six/six in HEK293/111, three/six in HEK293/121, and six/six in HEK293/165. High levels of each VEGF mRNA splice variant were found in their respective tumors but not in control tumors (Fig. S1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200703052/DC1>). No VEGF121 mRNA was found in the remnant plugs of matrigel in the three unresponsive mice. Circulating human VEGF, which was measured by ELISA, was detected in the six mice injected with HEK293/111 ( $386 \pm 122$  pg/ml), in the three responsive mice injected with HEK293/121 ( $411 \pm 131$  pg/ml), and in the six mice injected with HEK293/165 ( $436 \pm 279$  pg/ml). None was found in mice injected with control HEK293 in both flanks.

The tumors displayed different macroscopic aspects according to the VEGF isoform expressed by HEK293 cells. The tumor mass and its peritumoral vascularization visualized through the skin are delineated by dotted lines in Fig. 5 A. In the control and HEK293/121, the tumors remained restricted to the site of injection, appearing as a white mass in the control and bluish in the 121 tumors. In mice injected with HEK293/111 and HEK293/165, the tumors appeared largely surrounded by a highly vascularized



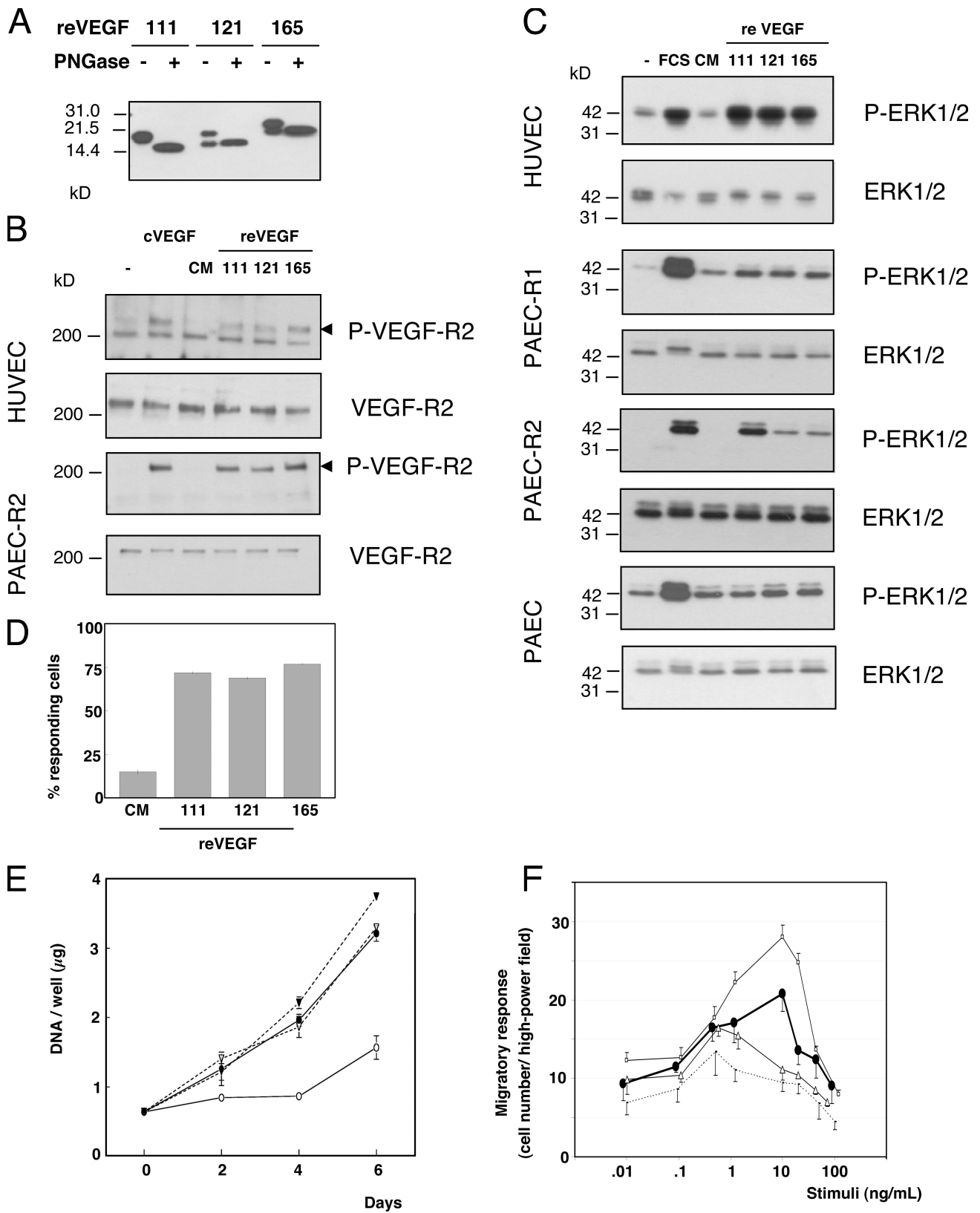
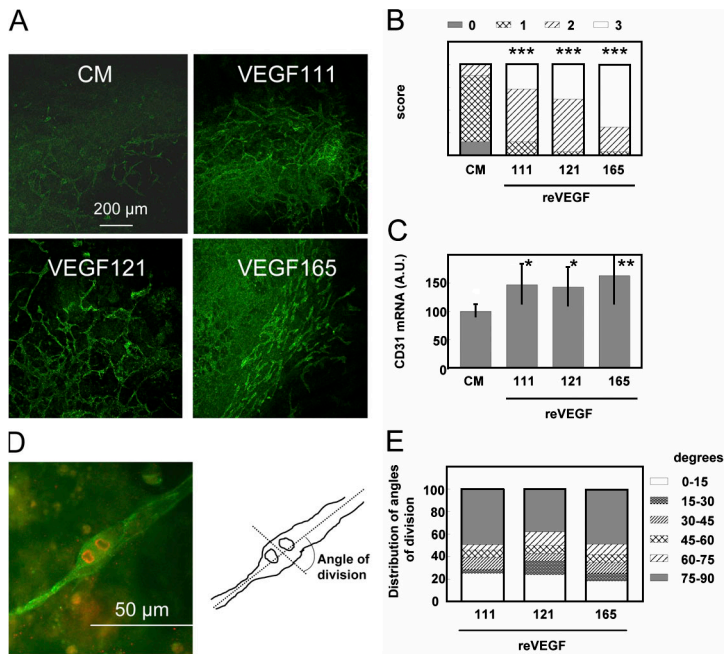


Figure 3. **VEGF111 is biologically active in vitro.** (A) Expression of reVEGF in HEK293 cells and deglycosylation. HEK293 cells were transformed with vectors enabling the expression of VEGF111, 121, and 165. CM containing 20 ng VEGF as measured by ELISA was analyzed by Western blotting before and after treatment with *N*-glycosidase F (PNGase). (B and C) Serum-starved overnight HUVECs, PAEC, PAEC/R1, or PAEC/R2 (expressing VEGF-R1 or -R2) were treated with CM of HEK293 cells expressing VEGF111, 121, or 165 or with commercially available reVEGF165 (cVEGF) produced in bacteria (10 ng/ml each) or with 10% FCS for 5 min. Untreated cells (-) or cells treated with CM of control HEK293 cells (CM) served as controls. Total and phosphorylated VEGF-R2 (B) and ERK1/2 (C) were measured by Western blotting. (D) HUVECs labeled with Fluo3-AM were treated with CM of HEK293 cells expressing 10 ng/ml of VEGF111, 121, or 165 or CM from control HEK293 cells (CM). The percentage of cells responding by a 20% increase in intracellular free calcium



**Figure 4. VEGF111 induces angiogenesis in embryoid bodies.** Embryoid bodies were formed in the presence of CM from HEK293 cells expressing VEGF111, 121, or 165 or CM from control HEK293 cells (CM). (A) Representative microphotograph of embryoid bodies after immunofluorescent labeling of CD31. (B) Several microphotographs of six embryoid bodies from three independent experiments for each treatment were taken at random and analyzed by five investigators in double blind, and a score (from 0 to 3, where 0 indicates lack of vascular labeling and 3 indicates maximum labeling) was given to each sample. Statistical analysis was performed using a Chi square test. \*\*\*,  $P < 0.0001$ . (C) CD31 mRNA level was measured in embryoid bodies by RT-PCR. Statistical analysis was performed using a *t* test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . (D and E) Embryoid bodies were differentiated in the presence of reVEGF111, 121, or 165. The angle between the plane of division of endothelial cells and the long axis of the vascular structures was analyzed after labeling of the vessels with anti-CD31 (green) and the mitotic cells with antiphosphohistone H3 (red) as illustrated in D for two sister cells having divided with a 90° angle. The angle of division plane was recorded for 43–63 cells in each group of embryoid bodies ( $n = 11$ ). A scoring of the distribution of the angles is shown in E. Error bars represent SD.

zone as judged from the bluish color of the skin. The cyanotic skin surface was measured individually, and the mean was  $133 \pm 57 \text{ mm}^2$  for the VEGF121 tumors,  $258 \pm 115 \text{ mm}^2$  for the VEGF165 tumors, and significantly larger,  $397 \pm 102 \text{ mm}^2$ , for the VEGF111 tumors. After dissection (Fig. 5 B), the control tumors and its surrounding tissues were indeed poorly vascularized. A dense network of vessels had developed in the peritumoral tissue in HEK293/111 mice (six/six), whereas the tumor themselves were poorly vascularized. In contrast, the 165 tumors (six/six mice) and, to a lesser extent, the 121 tumors (three/three mice) were highly vascularized, as shown by their reddish appearance, whereas the peritumoral tissue was poorly vascularized.

These observations were confirmed by histological analyses (Fig. 5 C). Sections through the tumor and the peritumoral tissue were stained for  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA). The control and the VEGF111 and 121 tumors contained a moderate number of vessels delineated by  $\alpha$ SMA-positive cells, whereas the VEGF165 tumors showed large kystic ectasia containing red blood cells and tumoral cells. The peritumoral tissue was poorly vascularized in control HEK293 tumors, whereas it contained a very large number of vessels in VEGF111 tumors. Fewer but larger size vessels were observed in VEGF121 and 165 peritumoral tissue. This observation was confirmed by quantifying the number and size of  $\alpha$ SMA-positive vessels per millimeter<sup>2</sup> of peritumoral tissue. The vessel density within the tissue surrounding the tumor (Fig. 5 E) was actually significantly higher in VEGF111 mice ( $P < 0.01$ ) than in control, VEGF121, or VEGF165 mice that contained a similar low number of vessels. The mean size of these peritumoral vessels (Fig. 5 F) was significantly higher in VEGF121 and VEGF165 mice ( $2,042 \pm 2,537 \mu\text{m}^2$  and

$4,505 \pm 9,060 \mu\text{m}^2$ , respectively), whereas it was similar in control and VEGF111 mice ( $740 \pm 1,073 \mu\text{m}^2$  and  $1,042 \pm 1,710 \mu\text{m}^2$ , respectively). The level of CD31 mRNA in the tumors expressing each isoform of VEGF was significantly higher than in the control tumor (Fig. 5 D).

The lateral thoracic vein and afferent vessels draining the tumor were significantly enlarged in mice bearing tumors expressing the three VEGF isoforms as compared with control tumors. Moreover, this enlargement was significantly higher in mice bearing VEGF111 tumors than the two other isoforms (Fig. 5 B and Fig. S2, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200703052/DC1>).

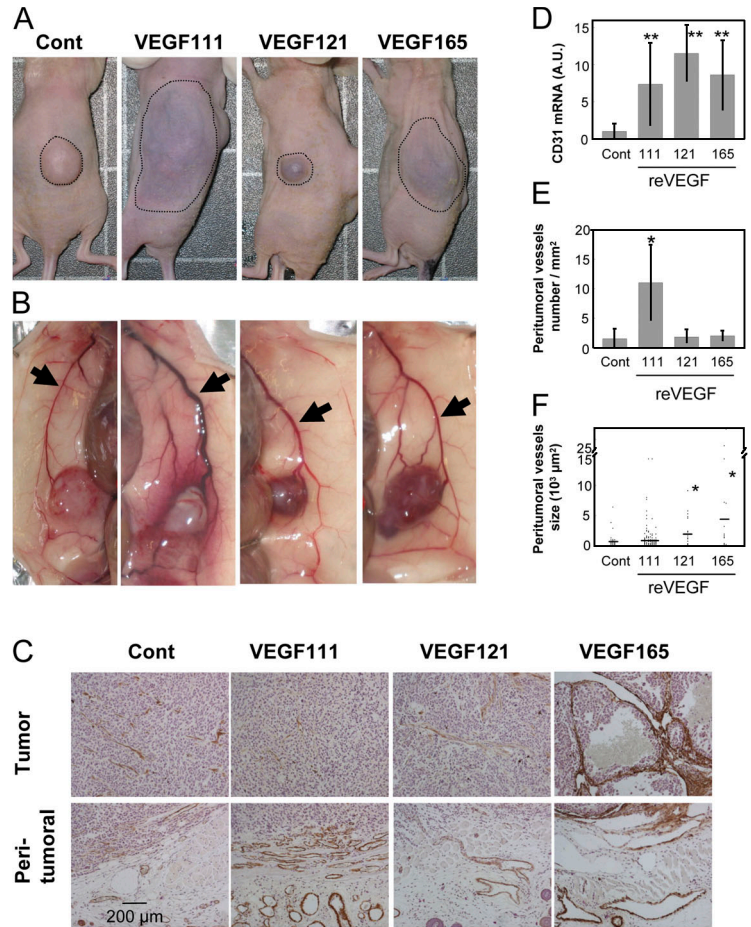
As an element of interpretation of the *in vivo* data, clearance of the various reVEGF isoforms was determined after an *i.v.* injection. The half-life was 74 min for VEGF111, 73 min for VEGF121, and 55 min for VEGF165 (Fig. S3, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200703052/DC1>). Altogether, these results demonstrate that the VEGF111 isoform displays potent angiogenic activity both *in vitro* and *in vivo*.

#### reVEGF111 is resistant to proteolytic degradation and remains biologically active

The main site of cleavage of VEGF by plasmin has been identified as Arg110-Ala111 (Key et al., 1996) in the sequence encoded by exon 5, suggesting that VEGF111 should be resistant to plasmin. Upon incubation of the reVEGF isoforms with purified plasmin at increasing concentrations for 4 h, both reVEGF121 and 165 were progressively degraded in fragments with an apparent molecular size of 14–18 kD under reducing conditions, which is consistent with the expected size of glycosylated and

concentration was recorded. (E) HUVECs were treated with HEK293 CM containing 10 ng/ml VEGF111 (black circles), 121 (open triangles), or 165 (black triangles) or CM from control HEK293 cells (open circles). DNA was measured in triplicate wells harvested as a function of time. (F) A modified Boyden chamber assay was used to measure the effect of VEGF111 (black circles), 121 (open triangles), 165 (open squares), and control medium (dotted line) on the chemotactic migration of PAEC/R2 cells. Error bars represent SD.

**Figure 5. VEGF111 induces angiogenesis in vivo.** Mice were injected with a mixture of matrigel and HEK293 cells expressing reVEGF111, 121, or 165 or were transfected with empty vector (Cont) and killed after 3 wk. (A) Photographs of one representative mouse of each group before dissection. Dotted lines delimit the surface of the tumor and the peritumoral vascular network visible through the skin. (B) Photographs of one representative mouse of each group after dissection showing the tumor and the peritumoral tissue. Arrows indicate the lateral thoracic veins. (C) Histopathological analysis of the tumor and peritumoral tissues. Sections were stained with anti- $\alpha$ SMA antibodies and hematoxylin-eosin. (D) Expression of CD31 mRNA in the tumors: the mRNA was measured by RT-PCR in control HEK295 tumors ( $n = 21$ ) and tumors grown from HEK293/111 ( $n = 6$ ), HEK293/121 ( $n = 3$ ), and HEK293/165 ( $n = 6$ ). The data were corrected by the signals obtained for the 28S rRNA. (E) Number of vessels per millimeter squared of peritumoral tissue. The vessels were counted on paraffin sections of control mice (20 sections) and 111 (six sections), 121 (three sections), and 165 (six sections) mice. (F) Surface of the  $\alpha$ SMA-positive vessels in the peritumoral tissue. Dots represent individual values, and horizontal bars indicate the mean value. \*,  $P < 0.01$ ; \*\*,  $P < 0.0001$  (versus control tumor). Statistical analysis was performed using the  $t$  test. Error bars represent SD.



nonglycosylated monomers of VEGF110. In contrast, reVEGF111 was completely resistant to plasmin (Fig. 6 A). Similar results were obtained after incubation with fluids collected from human nonhealing wounds known to be rich in proteases, including plasmin. reVEGF121 and 165 were almost completely degraded already after a 4-h incubation, whereas reVEGF111 remained intact even after 24 h (Fig. 6 B). HUVECs were incubated with control CM and CM containing each of the three VEGF isoforms, pretreated or not pretreated with plasmin or fluids from chronic ulcer. As expected, [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was stimulated in cells treated with reVEGF isoforms (Fig. 6 C). Pretreatment of reVEGF165 and 121 with plasmin (0.32 U) induced a slight but significant decrease in proliferative activity (Fig. 6 C), whereas pretreatment with wound fluid completely abolished it (Fig. 6 D). In contrast, neither plasmin nor chronic wound fluid affected [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation induced by reVEGF111.

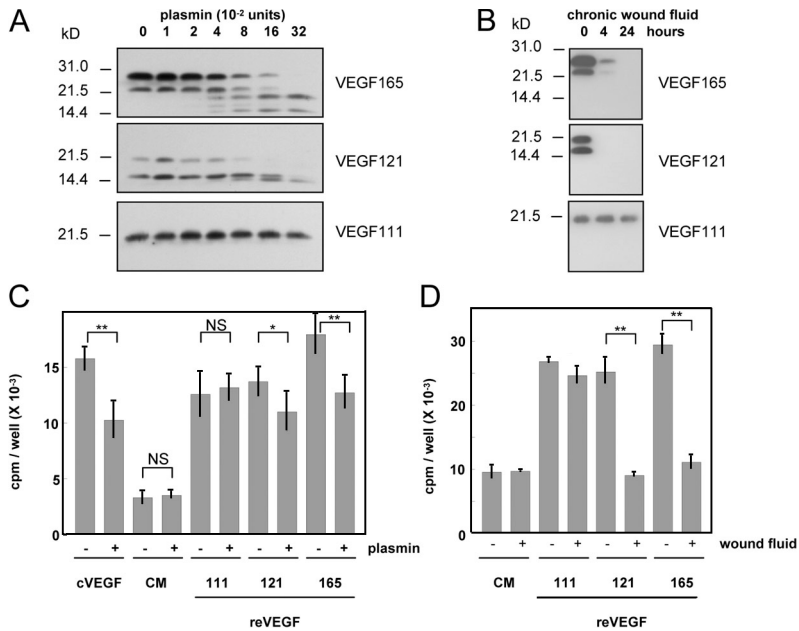
**VEGF111 is not induced by hypoxia, hypoglycemia, apoptosis, or reactive oxygen species but seems to be related to DNA damage**

Hypoxia, a recognized mechanism able to stimulate VEGF expression (Stein et al., 1995), was induced by culturing MCF-7 cells under 1% O<sub>2</sub> or mimicked by treatment with cobalt ions. Although both treatments induced an overall VEGF mRNA over-

expression, about twofold in agreement with published observations (Maity et al., 2000), they failed to induce a detectable level of VEGF111 (unpublished data). Hypoglycemia, which is also known to increase VEGF expression, was induced by culturing MCF-7 cells in glucose-free DME compared with DME supplemented with 4.5 g/liter glucose. Again, VEGF111 mRNA was not detected, whereas the overall VEGF expression was stimulated by twofold.

Beside genotoxicity, UV-B and camptothecin induce nongenomic effects as the production of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis (Hattori-Nakakuki et al., 1994). To decipher whether genomic effect, cell death, or oxidative stress triggers the expression of VEGF111 mRNA, MCF-7 cells were treated by puromycin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as inducers of apoptosis and ROS, respectively. The Bcl-Xs/Bcl-Xl mRNA ratio monitored in parallel progressively increased with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations to reach a concentration of 250 μM, a level similar to that observed after treatment with UV-B (Fig. S4, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200703052/DC1>). However the level of VEGF111 mRNA remained 20–30-fold lower in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells than in the UV-B-treated cells, suggesting that apoptosis and ROS do not trigger the splicing mechanism leading to VEGF111 expression. Similarly, puromycin barely induced VEGF111 expression while increasing the Bcl-Xs/Bcl-Xl mRNA ratio to a level similar to that observed in UV-B. Cells treated with ROS inducers FeSO<sub>4</sub> (10 μM) or Na<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>5</sub>NO (80 μM) also failed to





**Figure 6. VEGF111 is resistant to degradation by plasmin and proteases from nonhealing chronic wound fluid.** (A and B) CM from HEK293 containing 20 ng reVEGF165, 121, and 111 were treated at 37°C with the indicated concentrations of plasmin for 4 h (A) or 10  $\mu$ l of fluid collected from a chronic wound for the indicated times (B). The products were analyzed by Western blotting. (C and D) Cultures of HUVECs were treated with HEK293 cell CM containing 2 ng/ml VEGF111, 121, or 165, CM from control HEK293 (CM), or 2 ng/ml of commercial reVEGF165 (cVEGF) produced in bacteria either untreated or pretreated with 0.32 U plasmin for 4 h (C) or fluids collected from a chronic ulcer for 24 h (D). After 48 h, the cells were incubated with [ $^3$ H]thymidine for 18 h, and TCA-precipitable radioactivity was measured. Statistics were performed using the analysis of variance test followed by the Tukey-Kramer test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.001$ . Error bars represent SD.

express VEGF111 (unpublished data). Together, these data strongly suggest that induction of VEGF111 expression by genotoxic agents is not related to apoptosis or to oxidative stress. They also indicate that the regulation of pre-mRNA splicing that results in the expression of VEGF111 and Bcl-Xs are different processes. Accordingly, the Bcl-Xs/Bcl-Xl mRNA ratios measured in the various cell types after UV irradiation did not correlate with the expression of VEGF111 (Table II).

Preliminary data suggest that VEGF111 expression could depend on ataxia telangiectasia mutated/ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) and p53 known to be activated by genotoxic agents. Further work is progressing to decipher the signaling mechanisms involved in this alternative splicing.

## Discussion

VEGF111 is a new splice variant of VEGF-A lacking exons 5–7. Its expression is induced in several types of cultured cells by genotoxic agents such as UV-B, camptothecin, L-mimosin, and mitomycin C. UV-B triggers the formation of pyrimidine dimers in DNA, whereas camptothecin, L-mimosin, and mitomycin C induce double-strand breaks. Surprisingly,  $\gamma$  irradiation, which also leads to double-strand breaks, does not induce VEGF111 expression.

### Relationship between structure and biological properties of VEGF111

The VEGF mRNA variants described up to now contain exons 1–5 and a combination of exons 6a, 6b, 7, and 8 (Robinson and Stringer, 2001; Bates et al., 2002). The VEGF111 encoded by exons 1–4 and 8 contain the sequences responsible for binding to VEGF-R1 and VEGF-R2, which were located in exons 3 and 4, respectively, whereas binding sites for NRP-1, heparin, and ECM components encoded by exons 6 and 7 are lacking. Lack of the ECM-binding domain of the protein confers to VEGF111 a larger bioavailability, which might explain some of our findings in the

in vivo experiments that are discussed later. No specific function has been ascribed for the short amino acid sequence encoded by exon 8. However, its role may be underestimated because VEGF165b containing an alternative exon 8 has antiangiogenic properties (Bates et al., 2002). It has also been suggested that exon 8 stabilizes VEGF binding to NRP-1 (von Wronski et al., 2006).

Although recombinant human VEGF121 and 165 produced in HEK293 cells were only partly glycosylated, VEGF111 was fully glycosylated, as shown by the difference in the electrophoretic pattern before and after treatment with PNGase. This suggests that Asn74 is more accessible to the glycosylation machinery in VEGF111. Although VEGF glycosylation appears to have no major effect on its biological activity, it seems required for efficient secretion (Peretz et al., 1992; Claffey et al., 1995). The new splice variant VEGF111 is indeed efficiently secreted and is as active as the other known VEGF isoforms.

Houck et al. (1991) reported that VEGF165 and 121, the shortest previously described isoform encoded by exons 1–5 and 8, as well as VEGF110, a proteolytic fragment obtained after partial digestion by a plasmin-containing sequence encoded by exons 1–4 and a partial sequence of exon 5, have similar endothelial cell mitogenic activity. In agreement with these observations, we found that the mitogenic activity of VEGF111 on endothelial cells was similar to that of VEGF121 and slightly less efficient than VEGF165. The lack of sequences encoded by exons 5–7 in VEGF111 and exons 6–7 in VEGF121 might affect the positioning of the receptor-binding interfaces in the dimeric molecules. Moreover, the absence of the NRP-1-binding site in these two isoforms could also be responsible for their slightly reduced mitogenic activity (Soker et al., 1997). The phosphorylation level of the VEGF-R2 induced by VEGF111 was found to be similar to that induced by VEGF121 and slightly lower than the activation produced by VEGF165.

The main sites of cleavage of VEGF by plasmin and matrix metalloproteinases were found in the sequence encoded by exon 5 (Claffey et al., 1995; Keyt et al., 1996; Lee et al., 2005).



As expected on the basis of the lack of exon 5, VEGF111 is not sensitive to degradation by plasmin in conditions that cleave VEGF121 and 165 isoforms primarily between residues 110 and 111, producing VEGF110 homodimers. Accordingly, the mitogenic potential of VEGF111 is unaffected by plasmin treatment, whereas that of VEGF121 and 165 is reduced. Fluid collected from a nonhealing chronic wound was used as a source of proteolytic enzymes found in cutaneous impaired healing conditions. Incubation of VEGF165 and 121 results in their complete proteolysis and a total loss of their mitogenic activity, whereas VEGF111 is completely resistant to degradation and retains its full biological properties. A similar degradation of VEGF165 by fluids from chronic ulcers was reported by Lauer et al. (2000). It was prevented by mutating the Arg110 and Ala111 plasmin cleavage site (Lauer et al., 2002), further suggesting that the cleavage of VEGF within exon 5 unmasks proteolytic sites that are cryptic otherwise.

VEGF111, phosphorylated VEGF-R2, and ERK1/2 induced calcium transient and stimulated HUVEC proliferation similarly to the 121 and 165 isoforms. Although we have no direct evidence of the binding of VEGF111 to VEGF-R1, two arguments are in favor of VEGF111 signaling via this receptor. The first is the induction of ERK1/2 phosphorylation by VEGF111 in the PAEC/R1 cells similarly to the VEGF121 and 165 isoforms. The second comes from the results of the oriented endothelial cell division in the embryoid bodies assay. According to Zeng et al. (2007), the preferential orientation perpendicular to the long axis of the vessel, as we observed in embryoid bodies differentiated by VEGF111, 121, and 165, is determined by Flt-1 because embryonic stem Flt-1<sup>-/-</sup> loses this behavior. A controversial argument is the lack of induction by VEGF111 of monocyte chemotactic migration. Further work is needed to clarify the issue.

Although VEGF111 displays biological activities in vitro close to those of VEGF121 and 165, the three isoforms elicited a different pattern of the neovasculature in and around the tumors produced by the injection of transfected HEK293 with their respective cDNA. VEGF111-expressing tumors were macroscopically pale and exhibited moderate intratumoral vascularization in high contrast with VEGF165-expressing tumors that were highly vascularized and contained large blood lacunae. No or little inflammatory infiltrate was observed in any type of tumor. A most striking feature was the presence in the peritumoral tissue of an extensively developed network of small size vessels around VEGF111-expressing tumors, whereas the vessels in the peritumoral area of VEGF121 and 165 tumors were less numerous but of larger size. These findings are in agreement with those of Lee et al. (2005), who reported that tissues adjacent to xenograft tumors expressing a protease-resistant mouse VEGF (VEGFΔ108–118, corresponding to VEGF164 but lacking most of the sequence encoded by exon 5) had smaller vessels at higher density than tumors expressing wild-type VEGF164. The development of a high density vascular network in the adjacent tissue of VEGF111-expressing tumors may be correlated with its reduced potential for ECM binding. However, the diffusible VEGF121 that shares a similar feature and has a similar half-life did not induce the same vascular organization. The widespread peritumoral vascular network in VEGF111 mice may also contribute to enlargement of the draining thoracic vein.

As the HEK293 cells transfected with the cDNA of either isoform proliferate and migrate at the same rate, at least in vitro, and the mRNA level of each isoform is similar in the three types of tumors (Fig. S1), the differences observed in the tumoral and peritumoral vascular network are likely linked to the diffusible properties and/or possibly to the resistance to proteolysis of the various isoforms. The mechanisms that regulate these different patterns require additional investigations.

### VEGF111, a promising therapeutic agent?

VEGF111 mRNA is absent from all healthy human or murine tissues that we tested. We also failed to detect it in mouse skin after UV-B irradiation. This is not surprising, as its expression in UV-B-treated human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro is very low. In contrast, it was induced in MCF-7 tumors upon treatment with camptothecin. The potential induction of VEGF111 by chemotherapy might be an adverse side effect that could contribute to the acquisition of drug resistance. The finding that VEGF111 expression by xenografts of HEK293 cells surpasses VEGF121 and 165 in inducing the formation of a large array of vessels around the tumor supports this hypothesis, which needs further experimental and clinical investigations to be firmly established.

Defective vascularization and ischemia is a significant medical problem in many disciplines, including cardiovascular diseases and wound healing. VEGF-A plays a pivotal role in the angiogenic process during tissue repair. In chronic wounds, although increased VEGF mRNA was detected in the epidermis (Brown et al., 1992), the proteolytic environment and mainly serine proteases such as plasmin lead to VEGF degradation (Lauer et al., 2000; and unpublished data) and impaired vascularization. Mutation of the plasmin cleavage site Arg110/Ala111 in VEGF165 (Lauer et al., 2002) generated a proteolysis-resistant variant that induced an improved healing response in the db/db mouse (Roth et al., 2006). The potent angiogenic properties of VEGF111 and its remarkable resistance to proteolysis make it an interesting alternative candidate for therapeutic use in ischemic diseases. This is presently under investigation.

## Materials and methods

### Cell culture

Cells were cultured in DME containing 10% FCS (Cambrex), 2 mM glutamine, 50 μg/ml ascorbic acid, penicillin, and streptomycin except otherwise indicated. MO59K was cultured in DME/Nut Mix F-12 (Invitrogen) with 10% FCS, 2 mM glutamine, nonessential amino acids (Invitrogen), penicillin, and streptomycin; HEK293 cells were cultured in DME containing 10% FCS, nonessential amino acids, penicillin, streptomycin, 2 mg/liter fungizone, and 40 mg/liter gentamycin. PAECs were cultured in Ham F-12 (Invitrogen) with 10% FCS, gentamycin, penicillin, streptomycin, and fungizone, and HCT116 cells were cultured in MacKoy's medium (Cambrex) containing 10% FCS, penicillin, and streptomycin. Primary human keratinocytes were cultured in KGM-2 (Cambrex), and HUVECs were cultured in MCDB-131 medium (Invitrogen) complemented with 20% FCS, 2 mM glutamine, 5.8 U/ml heparin (Sigma-Aldrich), penicillin, and streptomycin on a coat of 0.2% gelatin. All cultures were kept at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> except otherwise indicated. Monocytes were isolated from buffy coats obtained from healthy donors (Transfusion Center, Liège, Belgium) as described previously (Stadler et al., 2007).

### Chemicals

reVEGF165, plasmin, camptothecin, mimosin, FeSO<sub>4</sub>, and Na<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>5</sub>NO were obtained from Sigma-Aldrich. CoCl<sub>2</sub> was obtained from Merck,

mitomycin C was purchased from Kyowa Hakko Kogyo, hygromycin was obtained from Invitrogen, and irinotecan was purchased from Aventis.

#### **Antibodies, Western blotting, immunohistochemistry, and ELISA**

The following antibodies were used: anti-ERK1/2 (rabbit polyclonal), antiphospho-ERK1/2 (monoclonal), and FITC-conjugated anti- $\alpha$ SMA were obtained from Sigma-Aldrich; anti-VEGF-R2 (rabbit polyclonal) and anti-VEGF (rabbit polyclonal) were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc.; antiphospho-VEGF-R2 (rabbit polyclonal) was purchased from EMD; polyclonal rabbit antiphosphohistone H3 (Ser10) was obtained from Millipore; rat anti-mouse CD31 was purchased from BD Biosciences; sheep anti-FITC antibodies conjugated to HRP were purchased from Roche; secondary antibodies conjugated with biotin, HRP, or streptavidin/FITC were obtained from Dako; and FITC-labeled donkey anti-rat antibodies and rhodamine-labeled donkey anti-rabbit antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride transfer membranes (PerkinElmer) by electroblotting. Membranes were blocked by nonfat dry milk (3% in PBS-Tween buffer) and probed with primary antibodies revealed by HRP-conjugated secondary antibodies. Signals were detected by chemiluminescence using an ECL Western Blotting Analysis System (Thermo Fisher Scientific) and x-ray film exposure and were quantified using a Fluor-S Multimager (Bio-Rad Laboratories).

Tissue samples were fixed in formaldehyde and embedded in paraffin, and sections of 5  $\mu$ m were successively reacted with anti- $\alpha$ SMA antibodies conjugated with FITC and anti-FITC conjugated with HRP and were stained with DAB, hematoxylin, and eosin. The samples were mounted with Aqua PolyMount (Polysciences Inc.) and visualized at room temperature using an inverted fluorescent microscope (Axiovert 25; Carl Zeiss, Inc.) with a 63 $\times$  NA 1.25 objective magnification, camera (AxioCam; Carl Zeiss, Inc.), and KS400 acquisition software (Carl Zeiss, Inc.). Human VEGF was measured in the CM of cultured cells or in blood samples by ELISA (R&D Systems) as described by the manufacturer.

#### **RNA purification**

Total RNA was purified from cell culture using a High Pure RNA Isolation kit (Roche) and from early mouse embryos (days 6–9) using a High Pure RNA Tissue kit (Roche) after grinding in lysis solution with a Dounce homogenizer. Tissues from older mouse embryos and adult mouse or human tissues were crushed in liquid N<sub>2</sub> (Dismembrator; Braun Biotech International), and RNA was collected by cesium chloride floatation (Chirgwin et al., 1979) or by using the High Pure RNA Tissue kit.

#### **RT-PCR amplification**

RT-PCR amplifications were performed using the GeneAmp PCR System 2400 or 9800 (PerkinElmer) and GeneAmp ThermoStable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR kit (PerkinElmer), 10 ng of total RNA, and the different pairs of primers (5 pmol each; see Table I). For amplification of the VEGF isoforms mRNA and 28S ribosomal RNA (rRNA), a known copy number of a synthetic standard RNA was included in each sample to monitor the reaction efficiency (Hajitou et al., 2001; Lambert et al., 2001). Bcl-X and CD31 mRNA were measured using the same conditions as the 28S rRNA. For Bcl-X mRNA amplification, the primers chosen on exons 1 and 3 amplified both Bcl-Xs and Bcl-Xl isoforms. For specific detection of the VEGF111 isoform, mRNA was reverse transcribed using oligodT (Eurogentec) and Superscript II (Invitrogen) as described by the manufacturer. Reverse transcription at 42°C for 50 min was followed by denaturation of the enzyme at 70°C for 15 min. 40 ng VEGF111 cDNA was amplified by PCR, the primers P1 and P5 (Table I), and Taq polymerase (Takara). Conditions for PCR amplification were 94°C for 15 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 10 s.

#### **Irradiation with UV-B light and $\gamma$ rays**

15  $\times$  10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> were seeded for 24 h. Culture medium was replaced by a thin layer of phenol red-free DME, and cells were irradiated in open dishes with UV (30 mJ/cm<sup>2</sup> except otherwise indicated) using two lamps (TL 20W/12; Philips) in the hood. The UV light spectrum was 90% UV-B and 10% UVA, whereas no UVC was detected as measured by a radiometer (UVX; UVP Inc.). After irradiation, the phenol red-free DME was replaced by fresh culture medium. Mice were irradiated by using the same equipment after a short anesthesia. Cells in DME containing 25 mM Hepes, pH 7.25, and mice were  $\gamma$  irradiated in an exactor (Gammacell 40; MDS Analytical Technologies) at 1.15 Gy/min.

#### **Characterization of the VEGF111 splice variant mRNA**

VEGF mRNA from UV-irradiated HaCat cells were RT-PCR amplified using the P1 and P2 primers (Table I). The VEGF111-specific product was extracted

from the acrylamide gel and sequenced using a Thermo-sequenase radio-labeled terminator cycle sequence kit (GE Healthcare). Full-length VEGF111 cDNA was obtained by RT-PCR amplification using primers P3 and P4 (Table I) and was sequenced.

#### **Production of reVEGF**

RNA purified from UV-irradiated HaCat cells was reverse transcribed using SuperScriptII and an oligodT primer. The complete coding sequences of VEGF111, 121, and 165 were amplified with Pwo DNA polymerase (Roche) using P3 (having an NotI restriction site sequence at its 5' end) and P4 (having an NheI restriction site sequence at its 5' end). After restriction with NotI-NheI and purification of the cDNA of interest, the PCR products were ligated (Ligation kit version II; Takara) between the NotI and NheI sites of a pCEP4 vector (Invitrogen) containing a home-modified multiple cloning site (Colige et al., 2005). Plasmids were amplified in XL10-Gold ultracompetent bacteria (Stratagene) and prepared using the Plasmid Mini-prep kit (Bio-Rad Laboratories). HEK293 cells were transfected by 1–2  $\mu$ g plasmid using FuGene 6 (Roche), and transformed cells were selected by 100 mg/liter hygromycin for 2–3 wk.

#### **Cell multiplication**

15,000 HUVECs were seeded in gelatin-coated multiwells in the presence of MCDB-131 supplemented with 20% FCS. After 3 h, the medium was replaced by fresh medium with or without VEGF and renewed every 2 d. Cells were collected at various times, and the DNA was measured by fluorimetry using a SpectraMax Gemini XS apparatus (MDS Analytical Technologies) after labeling with bis-benzimide. In some experiments, 1  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]thymidine (2.5 Ci/mol; PerkinElmer) was added to cell cultures at day 2, and the TCA-precipitable radioactivity was measured after 18 h.

#### **Cell migration**

Chemotactic migration assays of PAEC/R2 and human monocytes were performed in a modified Boyden chamber assay as previously described (Waltenberger et al., 1994; Stadler et al., 2007).

#### **Intracellular calcium measurement**

Measurements of intracellular free calcium transients induced by VEGF111, 121, and 165 in HUVECs were performed as previously described (Mineur et al., 2005).

#### **N-glycosylation of VEGF**

CM of HEK293 cells expressing VEGF165, 121, or 111 or from control cells containing the empty plasmid were treated with PNGase F (N-glycosidase F; New England Biolabs, Inc.) as described by the manufacturer. The electrophoretic pattern of the various VEGF isoforms before and after enzymatic treatment was determined by SDS-PAGE and Western blotting.

#### **In vitro angiogenesis**

Embryoid bodies were formed as previously described (Deroanne et al., 2002). In brief, undifferentiated embryonic stem CGR8 cells were aggregated for 4 d in a 20- $\mu$ l drop of DME supplemented with 10% FCS, 0.1 mM nonessential amino acids, 0.1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, and 5 ng/ml of the various reVEGF isoforms and were further kept in culture on gelatin-coated coverslips for 6 d in the same medium ( $n = 6$  for each isoform). For immunohistochemistry, embryoid bodies were fixed in methanol and incubated with rat anti-mouse CD31 antibodies, biotin-conjugated anti-rat IgG, and streptavidin/FITC. The CD31 mRNA was measured by RT-PCR. A similar procedure was used ( $n = 11$  embryoid bodies for each isoform) to determine the orientation plane of mitotic endothelial cells as described previously (Zeng et al., 2007) by a double immunostaining using anti-CD31 as above, antiphosphohistone H3, and rhodamine-labeled secondary antibodies. Samples were mounted in Aqua PolyMount. Immunostaining was observed at room temperature by inverted confocal microscopy (TSP2; Leica) with an objective magnification of 10 $\times$  NA 0.3 and confocal acquisition software (Leica) or by an inverted microscope (Axiovert 25; Carl Zeiss, Inc.).

#### **In vivo angiogenesis**

HEK293 cells transfected with the empty vector or expressing human reVEGF111, 121, or 165 were mixed ( $2 \times 10^6$  cells) with 200  $\mu$ l matrigel depleted in growth factors (Becton Dickinson) and injected subcutaneously in the flanks of nude mice (6-wk-old Swiss Nu/Nu). After 3 wk, mice were killed according to the ethical policy of our institute. Blood was collected by heart puncture. Tumors and the surrounding tissues were inspected and dissected. Half of each specimen was used for morphological analysis, and the other half was used for RNA extraction.

## Experimental chemotherapy

Nude mice supplemented with oestrogens (SE-121 17  $\beta$ -Estradiol 1.7 mg/pellet 60-d release; Innovative Research of America) received a subcutaneous injection of  $4 \times 10^6$  MCF-7 cells mixed with 100  $\mu$ l matrigel on both flanks according to a previously described procedure (Sounni et al., 2002). After 3 wk, mice were treated by a daily dose of 50 mg/Kg irinotecan or 10 mg/kg camptothecin, an intratumoral injection of 50  $\mu$ l camptothecin (2 mg/ml), or the vehicle alone for 1, 2, and 3 d and were killed 24 h after the last injection. The tumors as well as various organs and tissues were collected. VEGF111 mRNA was detected by RT-PCR.

## Online supplemental material

Fig. S1 illustrates the expression of VEGF mRNA in tumors obtained after injection in nude mice of HEK293 cells expressing the various VEGF isoforms. Fig. S2 shows the diameter of the lateral thoracic vein in mice bearing tumors obtained after injection of HEK293 cells expressing the various VEGF isoforms. Fig. S3 gives the blood concentration of the various VEGF isoforms as a function of time after injection in mice. Fig. S4 illustrates the expression of VEGF111 mRNA and the Bcl-Xs/Bcl-Xl ratio in MCF-7 cells treated with UV-B, puromycin, or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200703052/DC1>.

HaCat and MO59K cells were gifts from N. Fusenig (German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany) and J. Turner (Cross Cancer Institute, Edmonton, Canada), respectively. The technical assistance of M.J. Nix, G. Rega, A. Hoffman, A. Heyeres, and Fabrice Olivier was greatly appreciated. We thank G. Poncin and M.P. Defresne for their help in cytology analyses.

This work was supported, in part, by a grant from the Centre Anticancéreux of the University of Liège, the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique, the Fonds de la Recherche Scientifique Médicale, and the Foundation Against Cancer.

Submitted: 9 March 2007

Accepted: 19 November 2007

## References

Bates, D.O., T.G. Cui, J.M. Doughty, M. Winkler, M. Sugiono, J.D. Shields, D. Peat, D. Gillatt, and S.J. Harper. 2002. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 62:4123–4131.

Blaudschun, R., C. Sunderkotter, P. Brenneisen, R. Hinrichs, T. Peters, L. Schneider, Z. Razi-Wolf, N. Hunzelmann, and K. Scharffetter-Kochanek. 2002. Vascular endothelial growth factor causally contributes to the angiogenic response upon ultraviolet B irradiation in vivo. *Br. J. Dermatol.* 146:581–587.

Brown, L.F., K.T. Yeo, B. Berse, T.K. Yeo, D.R. Senger, H.F. Dvorak, and L. van de Water. 1992. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J. Exp. Med.* 176:1375–1379.

Burchardt, M., T. Burchardt, A.G. Anastasiadis, R. Buttyan, A. de la Taille, A. Shabsigh, J. Frank, and R. Shabsigh. 2005. Application of angiogenic factors for therapy of erectile dysfunction: protein and DNA transfer of VEGF 165 into the rat penis. *Urology.* 66:665–670.

Caldwell, R.B., M. Bartoli, M.A. Behzadian, A.E. El-Remessy, M. Al-Shabraway, D.H. Platt, G.I. Liou, and R.W. Caldwell. 2005. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress. *Curr. Drug Targets.* 6:511–524.

Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, A. Vandenhoec, K. Harpal, C. Eberhardt, et al. 1996. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 380:435–439.

Chirgwin, J.M., A.E. Przybyla, R.J. MacDonald, and W.J. Rutter. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 18:5294–5299.

Claffey, K.P., D.R. Senger, and B.M. Spiegelman. 1995. Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochim. Biophys. Acta.* 1246:1–9.

Colige, A., F. Ruggiero, I. Vandenbergh, J. Dubail, F. Kesteloot, J. Van Beeumen, A. Beschin, L. Brys, C.M. Lapiere, and B. Nusgens. 2005. Domains and maturation processes that regulate the activity of ADAMTS-2, a metalloproteinase cleaving the aminoproteptide of fibrillar procollagens types I-III and V. *J. Biol. Chem.* 280:34397–34408.

Deroanne, C.F., K. Bonjean, S. Servotte, L. Devy, A. Colige, N. Clausse, S. Blacher, E. Verdin, J.M. Foidart, B.V. Nusgens, and V. Castronovo. 2002. Histone deacetylase inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene.* 21:427–436.

Dvorak, H.F. 2000. VPF/VEGF and the angiogenic response. *Semin. Perinatol.* 24:75–78.

Ferrara, N. 2005. VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology.* 69:11–16.

Ferrara, N., K. Carver-Moore, H. Chen, M. Dowd, L. Lu, K.S. O'Shea, L. Powell-Braxton, K.J. Hillan, and M.W. Moore. 1996. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature.* 380:439–442.

Hajitou, A., N.E. Sounni, L. Devy, C. Grignet-Debrus, J.M. Lewalle, H. Li, C.F. Deroanne, H. Lu, A. Colige, and B.V. Nusgens, et al. 2001. Down-regulation of vascular endothelial growth factor by tissue inhibitor of metalloproteinase-2: effect on in vivo mammary tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.* 61:3450–3457.

Hattori-Nakakuki, Y., C. Nishigori, K. Okamoto, S. Imamura, H. Hai, and S. Toyokuni. 1994. Formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in epidermis of hairless mice exposed to near-UV. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201:1132–1139.

Houck, K.A., N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li, and D.W. Leung. 1991. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* 5:1806–1814.

Jingjing, L., Y. Xue, N. Agarwal, and R.S. Roque. 1999. Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40:752–759.

Katiyar, S.K., B.M. Bergamo, P.K. Vyalil, and C.A. Elms. 2001. Green tea polyphenols: DNA photodamage and photoimmunology. *J. Photochem. Photobiol. B.* 65:109–114.

Keyt, B.A., L.T. Berleau, H.V. Nguyen, H. Chen, H. Heinsohn, R. Vandlen, and N. Ferrara. 1996. The carboxyl-terminal domain (111–165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.* 271:7788–7795.

Lambert, C.A., A.C. Colige, C. Munaut, C.M. Lapiere, and B.V. Nusgens. 2001. Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension. *Matrix Biol.* 20:397–408.

Lauer, G., S. Sollberg, M. Cole, I. Flamme, J. Sturzebecher, K. Mann, T. Krieg, and S.A. Eming. 2000. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor in chronic wounds. *J. Invest. Dermatol.* 115:12–18.

Lauer, G., S. Sollberg, M. Cole, T. Krieg, and S.A. Eming. 2002. Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165 variant by a site-directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site. *FEBS Lett.* 531:309–313.

Lee, S., S.M. Jilani, G.V. Nikolova, D. Carpizo, and M.L. Iruela-Arispe. 2005. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* 169:681–691.

Maity, A., N. Pore, J. Lee, D. Solomon, and D.M. O'Rourke. 2000. Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia. *Cancer Res.* 60:5879–5886.

Mineur, P., A. Guignandon, C.A. Lambert, M. Amblard, C.M. Lapiere, and B.V. Nusgens. 2005. RGDS and DGEA-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> signalling in human dermal fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1746:28–37.

Park, J.E., G.A. Keller, and N. Ferrara. 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell.* 4:1317–1326.

Peretz, D., H. Gitay-Goren, M. Safran, N. Kimmel, D. Gospodarowicz, and G. Neufeld. 1992. Glycosylation of vascular endothelial growth factor is not required for its mitogenic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182:1340–1347.

Robinson, C.J., and S.E. Stringer. 2001. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J. Cell Sci.* 114:853–865.

Roth, D., M. Piekarek, M. Paulsson, H. Christ, T. Krieg, W. Bloch, J.M. Davidson, and S.A. Eming. 2006. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *Am. J. Pathol.* 168:670–684.

Skobe, M., P. Rockwell, N. Goldstein, S. Vosseler, and N.E. Fusenig. 1997. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat. Med.* 3:1222–1227.

Soker, S., S. Gollamudi-Payne, H. Fidler, H. Charnahelli, and M. Klagsbrun. 1997. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J. Biol. Chem.* 272:31582–31588.

Soker, S., S. Takashima, H.Q. Miao, G. Neufeld, and M. Klagsbrun. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell.* 92:735–745.

Sounni, N.E., L. Devy, A. Hajitou, F. Frankenne, C. Munaut, C. Gilles, C. Deroanne, E.W. Thompson, J.M. Foidart, and A. Noel. 2002. MT1-MMP

expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *FASEB J.* 16:555–564.

- Stadler, N., J. Eggermann, S. Voo, A. Kranz, and J. Waltenberger. 2007. Smoking-induced monocyte dysfunction is reversed by vitamin C supplementation in vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:120–126.
- Stein, I., M. Neeman, D. Shweiki, A. Itin, and E. Keshet. 1995. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia and hypoglycemia and coregulation with other ischemia-induced genes. *Mol. Cell. Biol.* 15:5363–5368.
- von Wronski, M.A., N. Raju, R. Pillai, N.J. Bogdan, E.R. Marinelli, P. Nanjappan, K. Ramalingam, T. Arunachalam, S. Eaton, K.E. Linder, et al. 2006. Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 281:5702–5710.
- Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, and C.H. Heldin. 1994. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 269:26988–26995.
- Whittle, C., K. Gillespie, R. Harrison, P.W. Mathieson, and S. Harper. 1999. Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant. *Clin. Sci. (Lond.)* 97:303–312.
- Yoon, Y.S., I.A. Johnson, J.S. Park, L. Diaz, and D.W. Losordo. 2004. Therapeutic myocardial angiogenesis with vascular endothelial growth factors. *Mol. Cell. Biochem.* 264:63–74.
- Zeng, G., S.M. Taylor, J.R. McColm, N.C. Kappas, J.B. Kearney, L.H. Williams, M.E. Hartnett, and V.L. Bautch. 2007. Orientation of endothelial cell division is regulated by VEGF signaling during blood vessel formation. *Blood*. 109:1345–1352.

### **1.3. Publication n°4**



## VEGF111 : Dr Jekyll et Mr Hyde ?

Charles A. Lambert, Pierre Mineur, Betty V. Nusgens

Laboratoire de Biologie des Tissus Conjonctifs, GIGA-Cancer, Tour de Pathologie B23/3, Université de Liège, 4000 Liège, Belgique.

[c.lambert@ulg.ac.be](mailto:c.lambert@ulg.ac.be)

[pierre.mineur@ulg.ac.be](mailto:pierre.mineur@ulg.ac.be)

[betty.nusgens@ulg.ac.be](mailto:betty.nusgens@ulg.ac.be)

> Le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est l'un des principaux facteurs contrôlant le développement et le maintien de l'arbre vasculaire chez l'homme. Des thérapies pro-angiogènes utilisant le VEGF sont actuellement en phase d'essais précliniques et cliniques pour le traitement de pathologies très diverses [1]. C'est le cas de maladies ischémiques, pour lesquelles le bénéfice d'une revascularisation des tissus est évident, mais également d'autres pathologies associées à un déficit en VEGF comme l'éclampsie et la sclérose latérale amyotrophique.

Le gène codant pour le VEGF contient 8 exons (Figure 1). Jusqu'à récemment, tous les variants décrits étaient codés par les exons 1 à 5, et différaient dans l'épissage (voir Encadré) précis des exons 6 à 8. Les exons 1 et 2 codent pour le peptide signal, impliqué dans la sécrétion de la protéine dans le milieu extracellulaire, les exons 3 et 4 pour les sites de liaison aux récepteurs et pour un site de glycosylation, et les exons 6 et 7 pour les séquences de liaison à la matrice extracellulaire et aux neuropilines. Ainsi les variants 206 et 189 sont peu biodisponibles en raison de leur liaison élevée à la matrice extracellulaire, alors que le variant 121 est actif et librement diffusible. Le variant 165 a des propriétés de liaison intermédiaires. Un variant utilisant un exon alternatif 8b présente des propriétés anti-angiogènes. L'exon 5 code pour les sites principaux de clivage par la plasmine et les métalloprotéases matricielles ([2, 3] et Iruela-Arispe, communication personnelle).

### Le VEGF111

Nous avons récemment cloné un nouveau variant d'épissage alternatif du VEGF,

codé par les exons 1 à 4 et 8a (VEGF111, DQ229900) [4]. C'est le seul exemple connu de VEGF humain ne contenant pas les séquences codées par l'exon 5. L'exclusion de cette séquence de l'ARN messager ne modifie pas le cadre de lecture des séquences situées en aval. Ce nouveau variant est exprimé uniquement dans les cellules traitées par des agents infligeant des dommages à l'ADN, tels que le rayonnement ultraviolet et des agents chimiothérapeutiques. Il n'a été détecté dans aucun des tissus sains testés - suggérant qu'il n'est pas indispensable à l'organisme - ni dans une série de tissus cancéreux humains. Sur la base de sa séquence, nous avons prédit que le VEGF111 est sécrété, biologiquement actif et résistant à la protéolyse. Ces hypothèses se sont révélées exactes. D'une part, le VEGF111 exprimé par recombinaison dans des cellules humaines en culture *in vitro* est sécrété dans le milieu de culture. D'autre part il active ses récepteurs, stimule la multiplication de cellules endothéliales *in vitro* et induit la formation de structures pseudo-capillaires dans des corps embryonnaires formés à partir de cellules souches embryonnaires de souris.

Enfin il est résistant à la dégradation par la plasmine et les fluides biologiques riches en protéases comme les exsudats d'ulcères. Les cellules humaines exprimant le VEGF165, le VEGF121 ou le VEGF111 par recombinaison ont été injectées à des souris immunodéficientes. Si les cellules exprimant le VEGF165, et dans une moindre mesure celles exprimant le VEGF121, ont produit des tumeurs vascularisées, les cellules exprimant le VEGF111 produisent des tumeurs peu vascularisées, mais dont le tissu environnant est irrigué par un réseau dense de capillaires.

### En cas de coupure, composer le 111

Le VEGF111 pourrait remplacer avantageusement les autres variants dans le traitement de diverses pathologies. C'est particulièrement vrai pour les ulcères veineux, l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral. Dans le premier cas, l'environnement de la plaie est riche en plasmine et en métalloprotéases matricielles et dégrade le VEGF165 [5]. Un VEGF165 muté au site de clivage par la plasmine accroît la stabilité des structures vasculaires durant la cicatrisation des plaies chroniques chez les

Si notre ADN contient quelques 25 000 gènes, nos cellules expriment collectivement plus de 100 000 protéines de séquences différentes. La détermination de la nature et de la fonction de l'ensemble de ces protéines constitue un des défis de l'ère post-génomique. Cette complexification du répertoire protéique par rapport au répertoire génomique est rendue possible grâce notamment au mécanisme d'épissage alternatif des pré-ARN messagers en ARN messagers. Ce processus concerne plus de la moitié de nos gènes. Il permet la synthèse de protéines différentes (variants) à partir d'un gène donné grâce à l'exclusion d'exons ou parties d'exons, ou la rétention d'introns ou parties d'introns, dans la séquence de l'ARN messager. Dans un certain nombre de cas, les variants produits par l'épissage alternatif d'un gène ont des propriétés différentes, voir antagonistes.



souris diabétiques [6]. Sa résistance au clivage par des exsudats d'ulcères fait du VEGF111 une alternative séduisante, potentiellement plus efficace que le VEGF165 muté en raison de l'élimination du site de clivage par les métalloprotéases matricielles. Cette hypothèse est en cours d'étude dans notre laboratoire. Dans les deux autres cas, celui des maladies ischémiques, nombre de patients arrivant dans les services d'urgences reçoivent une injection d'activateur tissulaire du plasminogène, afin de transformer le plasminogène en plasmine capable de lyser le thrombus responsable de l'occlusion artérielle causative de la pathologie. Des travaux préliminaires suggèrent que le VEGF111, et dans une moindre mesure le VEGF165, réduisent le déficit de perfusion cardiaque consécutif à la ligature de l'artère coronaire gauche descendante, l'hypertrophie réactionnelle à l'ischémie et le remodelage du ventricule gauche

chez la souris (Marie Delgaudine, Pierre Mineur et Charles Lambert). L'avantage du VEGF111 par rapport au VEGF165 est faible, mais pourrait devenir significatif si ce dernier est dégradé lors de l'injection d'activateur du plasminogène aux animaux.

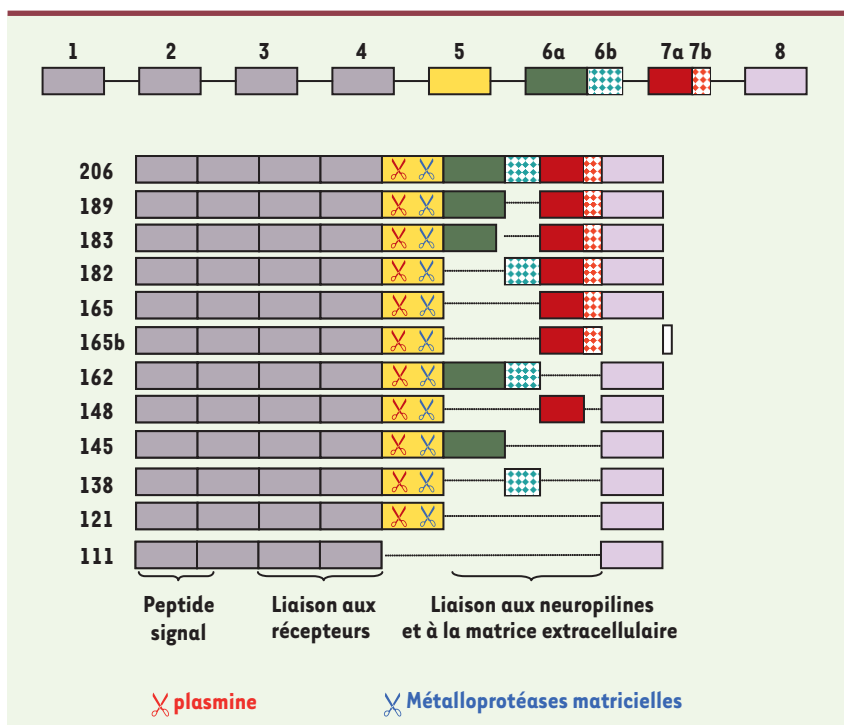
À l'inverse, l'utilisation de thérapies anti-angiogènes pour combattre le cancer a été proposée dès 1971 par Judah Folkman (1933-2008) [7]. Quelque trente ans plus tard, un anticorps humanisé capable de bloquer le VEGF (bevacizumab, Avastin®, Genentech, États-Unis) est le premier agent anti-angiogène accepté aux États-Unis par la *Food and Drug Administration* pour le traitement de cancers colorectaux en adjonction à la chimiothérapie [8]. Certains effets secondaires, notamment des saignements, sont cependant à déplorer. L'expression de VEGF111 par des cellules tumorales humaines transplantées chez la souris, induite par

l'injection intra-tumorale de camptothécine [4], suggère qu'il pourrait être exprimé par des patients traités par chimiothérapie. Si cette hypothèse est avérée, le VEGF111 pourrait progressivement devenir la forme majeure de VEGF en raison de la protéolyse souvent élevée dans l'environnement tumoral. Comme il ne semble pas indispensable à l'organisme, une thérapie ciblant spécifiquement le VEGF111 pourrait diminuer efficacement l'angiogenèse tumorale sans avoir les effets secondaires des traitements anti-VEGF actuels. Plusieurs stratégies sont envisageables : (1) inhibition de la liaison du VEGF111 aux récepteurs par des anticorps ou des aptamères spécifiques ; (2) inhibition spécifique de l'expression de VEGF111 par ARN interférentiel ; (3) inhibition du processus d'épissage impliqué dans la génération du VEGF111 ; La description de molécules capables de corriger l'épissage aberrant de certains gènes sans entraver l'épissage constitutif [8, 9] laisse entrevoir de nouvelles solutions thérapeutiques. ♦

### VEGF111: Dr Jekyll and Mr Hyde?

### RÉFÉRENCES

1. Buyschaert I, Carmeliet P, Dewerchin M. Clinical and fundamental aspects of angiogenesis and anti-angiogenesis. *Acta Clin Belg* 2007 ; 62 : 162-9.
2. Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, et al. The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem* 1996 ; 271 : 7788-95.
3. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, et al. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol* 2005 ; 169 : 681-91.
4. Mineur P, Colige AC, Deroanne CF, et al. Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. *J Cell Biol* 2007 ; 179 : 1261-73.
5. Lauer G, Sollberg S, Cole M, et al. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 2000 ; 115 : 12-8.
6. Roth D, Piekarek M, Paulsson M, et al. Plasmin modulates vascular endothelial growth factor-A-mediated angiogenesis during wound repair. *Am J Pathol* 2006 ; 168 : 670-84.
7. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971 ; 285 : 1182-6.
8. Corcos L, Solier S. Épissage alternatif, pathologie et thérapeutique moléculaire. *Med Sci (Paris)* 2005 ; 21 : 253-60.
9. Soret J, Gabut M, Tazi J. SR proteins as potential targets for therapy. *Prog Mol Subcell Biol* 2006 ; 44 : 65-87.



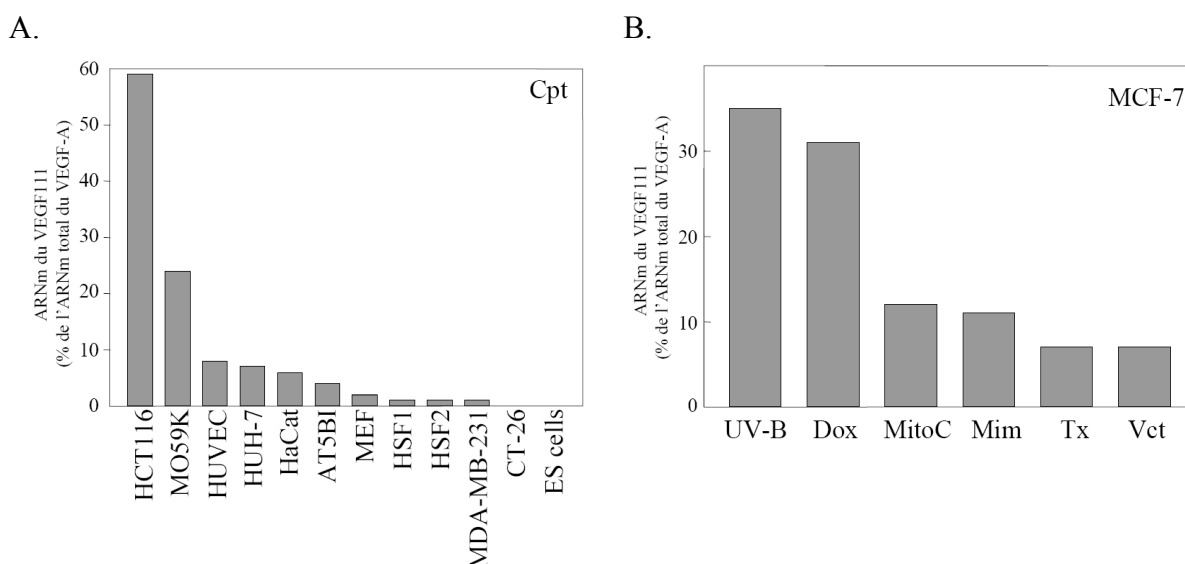
**Figure 1. Variants du VEGF. Description de l'utilisation des exons dans les différents variants du VEGF, et de la fonction des séquences qu'ils codent.** Le numéro d'identification des variants correspond au nombre d'acides aminés contenus dans la molécule mature après excision du peptide signal, et la lettre b indique l'utilisation de l'exon 8b. Les exons ne sont pas dessinés à l'échelle.

## 2. Résultats supplémentaires : étude de la régulation de l'expression du VEGF111

Les nombreuses questions soulevées par la découverte du VEGF111 et son induction potentielle au cours de thérapie anti-cancéreuse nous ont incité à poursuivre nos travaux s'inscrivant dans un programme collaboratif avec plusieurs chercheurs du laboratoire et des équipes étrangères. A l'heure actuelle, notre objectif premier est d'identifier les voies de signalisation contrôlant l'induction du VEGF111.

### 2.1. Evaluation de l'induction de l'expression du VEGF111 dans diverses lignées cellulaires et par divers agents chimiothérapeutiques

L'effet de la camptothécine sur l'expression du VEGF111 a été testé sur une série de lignées immortalisées et de cellules primaires (figure 44A). Nos résultats indiquent que cette expression est variable, certaines cellules exprimant le transcrite du VEGF111 à concurrence de 60% du VEGF total, alors que d'autres ne l'expriment pas ou peu. Aucune corrélation significative n'a pu être établie avec l'expression de la forme sauvage ou mutée de p53. Certains types de cellules primaires, comme les HUVEC par exemple, expriment des quantités non négligeables de VEGF111 en présence de camptothécine, ce qui soulève dès lors la possibilité de sa synthèse par les cellules saines lors d'un traitement chimiothérapeutique.



**Figure 44 : Induction de l'expression du VEGF111 dans diverses lignées cellulaires et par différents agents génotoxiques.** (A) Expression du VEGF111 dans différentes lignées cellulaires après un traitement de 24h par la camptothécine (Cpt : 1 $\mu$ M). (B) Expression du VEGF111 dans des MCF-7 après un traitement de 24h par différents agents génotoxiques (UV-B : ultraviolet B ; Dox : doxorubicine, MitoC : mitomycine C ; Mim : mimosine, Tx : taxol ; Vct : vincristine)



L'effet d'une série d'agents chimiothérapeutiques dont le mode d'action est variable a également été testé sur les MCF-7 (figure 44B). La doxorubicine, une molécule s'intercalant entre les brins d'ADN et inhibant la topoisomérase II, a un pouvoir inducteur pratiquement aussi élevé que les UV-B. Les substances anti-mitotiques agissant par alkylation (mitomycine C, cis-platine) ou coupure de l'ADN (mimosine) induisent également l'expression du VEGF111. Le taxol et la vincristine, deux agents stabilisant les microtubules et dont la génotoxicité a été démontrée *in vitro* (245,246), induisent également son expression. Il semble donc que le VEGF111 soit systématiquement produit suite à un stress génotoxique quelque soit son mode d'action.

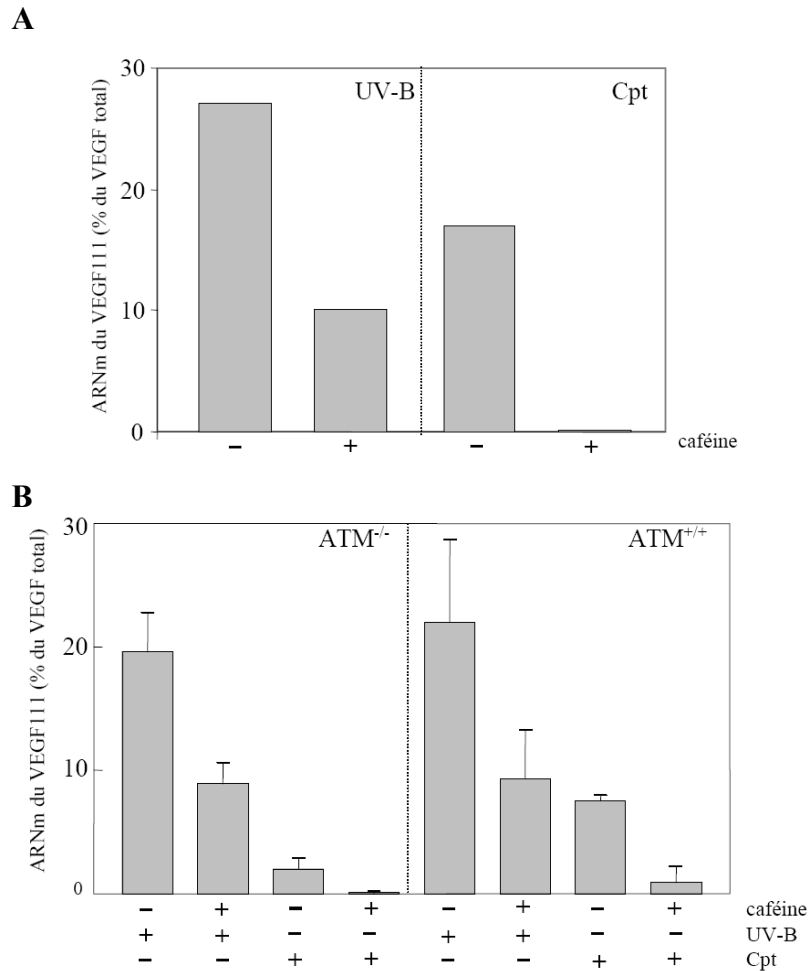
## ***2.2. Etude des mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant l'expression du VEGF111***

Ainsi qu'évoqué précédemment, les lésions affectant l'ADN génomique déclenchent une cascade de signalisation mettant en première ligne ATM et ATR, deux kinases impliquées dans la phosphorylation de p53.

### ***2.2.1. Implication d'ATM/ATR dans l'induction du VEGF111 par les UV- B et la camptothécine***

Une première observation sur des MCF-7 exposées aux UV-B ou à la camptothécine en présence ou en absence de caféine, un inhibiteur d'ATM et ATR, suggère que ces deux kinases sont impliquées dans l'induction de l'expression du VEGF111 (Figure 45A). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de la lignée AT5BIVA, des fibroblastes immortalisés issus de patients souffrant d'ataxia telangectasia, une pathologie liée à des mutations d'ATM et associée au développement de nombreux cancers. Ces cellules sont incapables de réparer les lésions occasionnées à l'ADN, sont sensibles aux radiations ionisantes (comme les rayons X et  $\gamma$ ) et à la streptonigrine, une substance chimique radiomimétique (247). Leur transfection par un vecteur d'expression pcDNA-Flag-ATM (don du Dr Kastan, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN) permet de récupérer une activité ATM (cellules AT5BIVA/ATM, don de Y. Habraken, Laboratoire de Virologie-Immunologie, GIGA-R). L'expression du VEGF111 induite par les UV-B est similaire dans les cellules AT5BIVA et AT5BIVA/ATM. Une inhibition comparable par la caféine est également observée (Figure 45B.). L'expression du VEGF111 induite par la camptothécine (1 $\mu$ M) est par contre plus faible dans les cellules déficientes en ATM que

dans les cellules exprimant l'ATM recombinant. Dans ces 2 cas, cette expression est complètement inhibée par la caféine. Ces données suggèrent que les UV-B induisent l'expression du VEGF111 via ATR qui, comme ATM, est sensible à la caféine, tandis que la camptothécine agirait principalement via ATM.

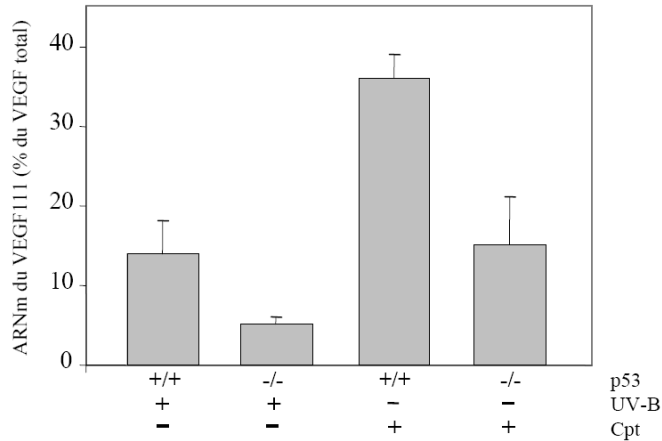


**Figure 45 : Implication d'ATM et ATR dans l'expression du VEGF111.** Expression du VEGF111 dans les cellules MCF-7 (A), AT5BIVA et AT5BIVA/ATM (B) traitées ou non par la caféine (5mM) durant 4h puis exposées aux UV-B ou à la camptothécine (Cpt).

### 2.2.2. Implication de p53 dans l'induction du VEGF111 par les UV-B et la camptothécine

Dans les MCF-7 et les HCT116, les UV-B et la camptothécine induisent la phosphorylation rapide de p53 sur la sérine 15 (non-illustré). L'implication de p53 dans l'expression du VEGF111 a été analysé dans les cellules HCT116 l'exprimant (p53<sup>+/+</sup>) ou ne l'exprimant pas (p53<sup>-/-</sup>) (248). Une réduction de 60% de l'expression du VEGF111 est observée dans les cellules déficientes en p53, que l'induction soit due aux UV-B ou à la

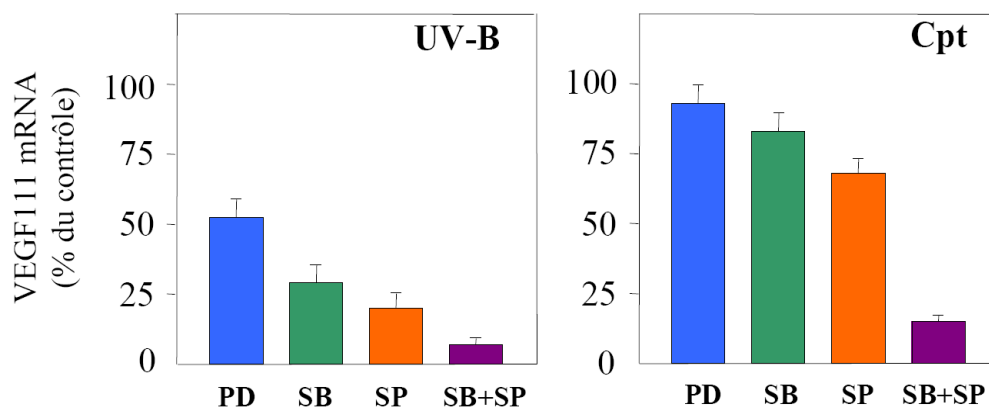
camptothécine (figure 46). Il faut noter que la réduction de VEGF111 n'est pas complète, ce qui suggère l'existence de voie(s) alternative(s) à p53 contrôlant l'expression du VEGF111.



**Figure 46 : Implication de p53 dans l'expression du VEGF111.** L'expression du VEGF111 est évaluée dans les cellules HCT116 exprimant ou non p53 ( $p53^{+/+}$  ou  $p53^{-/-}$ ), après irradiation par les UV-B ou traitement par la camptothécine (Cpt).

### 2.2.3. Implication des MAPK dans l'induction de VEGF111 par les UV-B et la camptothécine

Il est connu que les dommages à l'ADN activent également les MAPK (249,250). Afin d'identifier les voies de signalisation mises en jeu dans la régulation de l'expression du VEGF111, les cellules MCF-7 ont été pré-traitées durant 24h par divers inhibiteurs utilisés à des concentrations efficaces mais non-toxiques (44), avant leur exposition aux UV-B ou à la camptothécine.



**Figure 47 : Effet d'inhibiteurs des MAPK sur l'expression du VEGF111 par des MCF-7 soumises à une irradiation par des UV-B ou un traitement par la camptothécine.** Les résultats sont exprimés en pourcentage des valeurs observées en absence d'inhibiteurs. PD : PD98059 inhibiteur de  $Erk1/2$  ; SB : SB203580, inhibiteur de p38 ; SP : SP600125, inhibiteur de JNK.

Lors de l'irradiation par les UV-B, l'inhibition de JNK par le SP600125 et de p38 par le SB203580 réduisent de 80% l'expression du VEGF111. Une inhibition presque complète est observée lorsque les deux inhibiteurs sont combinés (Figure 47). L'inhibition d'Erk1/2 par le PD98059 ne réduit l'expression que de 50%. Lorsque le VEGF111 est induit par la camptothécine, aucun inhibiteur individuel n'a d'effet très marqué. Par contre, l'inhibition combinée de JNK et p38 réprime sévèrement l'expression de VEGF111.

Comme nous l'avons constaté lors des études concernant les voies ATM et ATR, il se confirme que l'induction de l'expression du VEGF111 par les UV-B et la camptothécine emprunte des voies de signalisation (en partie) distinctes.

### ***Conclusions et perspectives de la partie III***

La découverte de ce nouveau variant du VEGF-A et de ses propriétés biologiques remarquables, notamment sa résistance à la protéolyse, ouvre un champ considérable d'investigations visant à répondre à des questions fondamentales ou à développer des approches thérapeutiques nouvelles. A titre illustratif, une liste non-exhaustive de questions soulevées ou d'hypothèses à vérifier a été dressée.

- Le VEGF111 est-il produit de manière naturelle et est-il induit lors de traitements anti-cancéreux chez l'Homme, comme le suggèrent nos résultats in vitro et in vivo chez l'animal ? Dans l'affirmative, quels sont les impacts de son expression ?
- Quels sont les mécanismes fins et les voies de signalisation responsables de l'expression du VEGF111 ?
- Existe-t-il d'autres ARNm partageant avec le VEGF111 les mêmes mécanismes de régulation d'épissage alternatif ?
- En raison de l'absence de liaison à la neuropiline et de sa grande capacité à diffuser à distance de son lieu de synthèse, quel est l'effet du VEGF111 sur la perméabilité vasculaire, sur le chimiotactisme envers les monocytes, et sur le recrutement des cellules hématopoïétiques progénitrices ?
- Est-il possible de produire à grande échelle un VEGF111 biologiquement actif à usage thérapeutique ?
- Quelle est l'efficacité thérapeutique du VEGF111 dans les pathologies ischémiques myocardiques, périphériques ou cérébrales, dans l'éclampsie ou dans la cicatrisation des plaies chroniques ?
- Le VEGF111 est-il un neuroprotecteur dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique ?

Ces nombreuses questions ne pourront être résolues que par la mise en place d'un réseau de collaborations qui est actuellement en voie de développement et fait appel aux compétences spécifiques de plusieurs équipes belges et étrangères. Le support du FNRS, de la Fondation contre le Cancer et de la région wallonne pour le programme Waleo3 « CardioSave » ainsi que de l'ESA et Belspo pour l'impact potentiel des radiations cosmiques sur le spliceosome sont autant d'encouragements pour la poursuite de nos recherches sur cette molécule.

## Bibliographie

1. Ingber, D. E. (2006) Mechanical control of tissue morphogenesis during embryological development, *Int. J. Dev. Biol.* **50**, 255-266
2. Pavy-Le Traon, A., Heer, M., Narici, M. V., Rittweger, J., and Vernikos, J. (2007) From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986-2006), *Eur. J. Appl. Physiol.* **101**, 143-194
3. Orr, A. W., Helmke, B. P., Blackman, B. R., and Schwartz, M. A. (2006) Mechanisms of mechanotransduction, *Dev Cell* **10**, 11-20
4. Ingber, D. E. (2003) Mechanobiology and diseases of mechanotransduction, *Ann. Med.* **35**, 564-577
5. Schwartz, M. A., and Ginsberg, M. H. (2002) Networks and crosstalk: integrin signalling spreads, *Nat Cell Biol* **4**, E65-68
6. Huang, S., and Ingber, D. E. (1999) The structural and mechanical complexity of cell-growth control, *Nat Cell Biol* **1**, E131-138
7. Chen, C. S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G. M., and Ingber, D. E. (1997) Geometric control of cell life and death, *Science* **276**, 1425-1428
8. Boudreau, N., and Bissell, M. J. (1998) Extracellular matrix signaling: integration of form and function in normal and malignant cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 640-646
9. Lim, C. T., Zhou, E. H., and Quek, S. T. (2006) Mechanical models for living cells--a review, *J. Biomech.* **39**, 195-216
10. Buschmann, M. D., Gluzband, Y. A., Grodzinsky, A. J., and Hunziker, E. B. (1995) Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture, *J. Cell Sci.* **108 ( Pt 4)**, 1497-1508
11. Bachrach, N. M., Valhmu, W. B., Stazzone, E., Ratcliffe, A., Lai, W. M., and Mow, V. C. (1995) Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment, *J. Biomech.* **28**, 1561-1569
12. Sato, M., Levesque, M. J., and Nerem, R. M. (1987) Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress, *Arteriosclerosis* **7**, 276-286
13. Kuchan, M. J., and Frangos, J. A. (1993) Shear stress regulates endothelin-1 release via protein kinase C and cGMP in cultured endothelial cells, *Am. J. Physiol.* **264**, H150-156
14. Jen, C. J., Jhiang, S. J., and Chen, H. I. (2000) Invited review: effects of flow on vascular endothelial intracellular calcium signaling of rat aortas ex vivo, *J. Appl. Physiol.* **89**, 1657-1662; discussion 1656
15. Hynes, R. O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell* **110**, 673-687
16. Springer, T. A., and Wang, J. H. (2004) The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion, *Adv. Protein Chem.* **68**, 29-63
17. Arnaout, M. A., Mahalingam, B., and Xiong, J. P. (2005) Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 381-410
18. Robles, E., and Gomez, T. M. (2006) Focal adhesion kinase signaling at sites of integrin-mediated adhesion controls axon pathfinding, *Nat. Neurosci.* **9**, 1274-1283
19. Kano, Y., Katoh, K., and Fujiwara, K. (2000) Lateral zone of cell-cell adhesion as the major fluid shear stress-related signal transduction site, *Circ. Res.* **86**, 425-433
20. Cukierman, E., Pankov, R., Stevens, D. R., and Yamada, K. M. (2001) Taking cell-matrix adhesions to the third dimension, *Science* **294**, 1708-1712
21. Takada, Y., Ye, X., and Simon, S. (2007) The integrins, *Genome Biol* **8**, 215
22. van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001) Function and interactions of integrins, *Cell Tissue Res.* **305**, 285-298

23. Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J., and Smith, J. W. (2000) Ligand binding to integrins, *J. Biol. Chem.* **275**, 21785-21788
24. Emsley, J., Knight, C. G., Farndale, R. W., Barnes, M. J., and Liddington, R. C. (2000) Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1, *Cell* **101**, 47-56
25. Staatz, W. D., Fok, K. F., Zutter, M. M., Adams, S. P., Rodriguez, B. A., and Santoro, S. A. (1991) Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen, *J. Biol. Chem.* **266**, 7363-7367
26. Alam, N., Goel, H. L., Zarif, M. J., Butterfield, J. E., Perkins, H. M., Sansoucy, B. G., Sawyer, T. K., and Languino, L. R. (2007) The integrin-growth factor receptor duet, *J. Cell. Physiol.* **213**, 649-653
27. Miyamoto, S., Akiyama, S. K., and Yamada, K. M. (1995) Synergistic roles for receptor occupancy and aggregation in integrin transmembrane function, *Science* **267**, 883-885
28. Choquet, D., Felsenfeld, D. P., and Sheetz, M. P. (1997) Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages, *Cell* **88**, 39-48
29. Wiesner, S., Lange, A., and Fassler, R. (2006) Local call: from integrins to actin assembly, *Trends Cell Biol.* **16**, 327-329
30. Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. M. (2001) Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 793-805
31. Lambert Ch, A. L. C., M; Nusgens B, V. (2007) Biology of adherent cells in microgravity. in *Biology in Space and Life on Earth* (Brickmann, E. ed., Wiley-VCH
32. Brakebusch, C., and Fassler, R. (2003) The integrin-actin connection, an eternal love affair, *EMBO J.* **22**, 2324-2333
33. Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., and Parsons, J. T. (1995) Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase, *Mol. Biol. Cell* **6**, 637-647
34. Chen, H. C., Appeddu, P. A., Parsons, J. T., Hildebrand, J. D., Schaller, M. D., and Guan, J. L. (1995) Interaction of focal adhesion kinase with cytoskeletal protein talin, *J. Biol. Chem.* **270**, 16995-16999
35. Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., and Turner, C. (1988) Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton, *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**, 487-525
36. Schneller, M., Vuori, K., and Ruoslahti, E. (1997) Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF, *EMBO J.* **16**, 5600-5607
37. Plopper, G. E., McNamee, H. P., Dike, L. E., Bojanowski, K., and Ingber, D. E. (1995) Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex, *Mol. Biol. Cell* **6**, 1349-1365
38. Filipenko, N. R., Attwell, S., Roskelley, C., and Dedhar, S. (2005) Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via alpha-PIX, *Oncogene* **24**, 5837-5849
39. Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions, *J. Cell Biol.* **133**, 1403-1415
40. Rivelino, D., Zamir, E., Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A. D. (2001) Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism, *J. Cell Biol.* **153**, 1175-1186
41. Galbraith, C. G., Yamada, K. M., and Sheetz, M. P. (2002) The relationship between force and focal complex development, *J. Cell Biol.* **159**, 695-705



42. Balaban, N. Q., Schwarz, U. S., Riveline, D., Goichberg, P., Tzur, G., Sabanay, I., Mahalu, D., Safran, S., Bershadsky, A., Addadi, L., and Geiger, B. (2001) Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates, *Nat Cell Biol* **3**, 466-472
43. Ingber, D. E. (1993) Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton, *J. Cell Sci.* **104 ( Pt 3)**, 613-627
44. Lambert, C. A., Lapiere, C. M., and Nusgens, B. V. (1998) An interleukin-1 loop is induced in human skin fibroblasts upon stress relaxation in a three-dimensional collagen gel but is not involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase 1, *J. Biol. Chem.* **273**, 23143-23149
45. Eckes, B., Hunzelmann, N., Ziegler-Heitbrock, H. W., Urbanski, A., Luger, T., Krieg, T., and Mauch, C. (1992) Interleukin-6 expression by fibroblasts grown in three-dimensional gel cultures, *FEBS Lett.* **298**, 229-232
46. Lambert, C. A., Soudant, E. P., Nusgens, B. V., and Lapiere, C. M. (1992) Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces, *Lab. Invest.* **66**, 444-451
47. Watanabe, T., Noritake, J., and Kaibuchi, K. (2005) Regulation of microtubules in cell migration, *Trends Cell Biol.* **15**, 76-83
48. Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V., and Aebi, U. (2007) Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics, *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 562-573
49. Ridley, A. J. (2006) Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking, *Trends Cell Biol.* **16**, 522-529
50. Olson, M. F., Ashworth, A., and Hall, A. (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1, *Science* **269**, 1270-1272
51. Zhao, Z. S., and Manser, E. (2005) PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation, *Biochem. J.* **386**, 201-214
52. Vico, L., Collet, P., Guignandon, A., Lafage-Proust, M. H., Thomas, T., Rehaillia, M., and Alexandre, C. (2000) Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts, *Lancet* **355**, 1607-1611
53. Delvoye, P., Wiliquet, P., Leveque, J. L., Nusgens, B. V., and Lapiere, C. M. (1991) Measurement of mechanical forces generated by skin fibroblasts embedded in a three-dimensional collagen gel, *J. Invest. Dermatol.* **97**, 898-902
54. van Loon J, J. (2007) The Gravity Environment in Space Experiments. in *Biology in Space and Life on Earth* (Brickmann, E. ed., Wiley-VCH
55. Guignandon, A., Akhouayri, O., Laroche, N., Lafage-Proust, M. H., Alexandre, C., and Vico, L. (2003) Focal contacts organization in osteoblastic cells under microgravity and cyclic deformation conditions, *Adv Space Res* **32**, 1561-1567
56. Lambert, C. A., Guignandon, A., Colige, A., Rega, G., Laroche, N., Heyeres A., Munaut, C., Lapière, Ch.M. and Nusgens, B.V. (2001) Microgravity Stimulates the Expression of Interleukin-6 and Matrix Metalloproteinase-1 in human Dermal Fibroblasts. In Space Scientific Research in Belgium, *Microgravity Ed OSTC 1*, P167-177
57. Lambert, C. A., Colige, A. C., Munaut, C., Lapiere, C. M., and Nusgens, B. V. (2001) Distinct pathways in the over-expression of matrix metalloproteinases in human fibroblasts by relaxation of mechanical tension, *Matrix Biol.* **20**, 397-408
58. Papaseit, C., Pochon, N., and Tabony, J. (2000) Microtubule self-organization is gravity-dependent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8364-8368
59. Vassy, J., Portet, S., Beil, M., Millot, G., Fauvel-Lafeve, F., Karniguian, A., Gasset, G., Irinopoulou, T., Calvo, F., Rigaut, J. P., and Schoevaert, D. (2001) The effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7, *FASEB J.* **15**, 1104-1106
60. Uva, B. M., Masini, M. A., Sturla, M., Prato, P., Passalacqua, M., Giuliani, M., Tagliaferro, G., and Stollo, F. (2002) Clinorotation-induced weightlessness influences the cytoskeleton of glial cells in culture, *Brain Res.* **934**, 132-139

61. Sarkar, D., Nagaya, T., Koga, K., Kambe, F., Nomura, Y., and Seo, H. (2000) Rotation in clinostat results in apoptosis of osteoblastic ROS 17/2.8 cells, *J Gravit Physiol* **7**, P71-72
62. Guignandon, A., Akhouayri, O., Usson, Y., Rattner, A., Laroche, N., Lafage-Proust, M. H., Alexandre, C., and Vico, L. (2003) Focal contact clustering in osteoblastic cells under mechanical stresses: microgravity and cyclic deformation, *Cell Commun Adhes* **10**, 69-83
63. Buravkova, L. B., and Romanov, Y. A. (2001) The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity, *Acta Astronaut* **48**, 647-650
64. Meyers, V. E., Zayzafoon, M., Douglas, J. T., and McDonald, J. M. (2005) RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity, *J. Bone Miner. Res.* **20**, 1858-1866
65. Higashibata, A., Imamizo-Sato, M., Seki, M., Yamazaki, T., and Ishioka, N. (2006) Influence of simulated microgravity on the activation of the small GTPase Rho involved in cytoskeletal formation--molecular cloning and sequencing of bovine leukemia-associated guanine nucleotide exchange factor, *BMC Biochem* **7**, 19
66. Servotte, S., Zhang, Z., Lambert, C. A., Ho, T. T., Chometon, G., Eckes, B., Krieg, T., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V., and Aumailley, M. (2006) Establishment of stable human fibroblast cell lines constitutively expressing active Rho-GTPases, *Protoplasma* **229**, 215-220
67. Zhang, Z. G., Lambert, C. A., Servotte, S., Chometon, G., Eckes, B., Krieg, T., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V., and Aumailley, M. (2006) Effects of constitutively active GTPases on fibroblast behavior, *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 82-91
68. Nikolova, E., Mitev, V., Zhelev, N., Deroanne, C. F., and Poumay, Y. (2007) The small Rho GTPase Rac1 controls normal human dermal fibroblasts proliferation with phosphorylation of the oncoprotein c-myc, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 834-839
69. Nikolova, E., Mitev, V., Minner, F., Deroanne, C. F., and Poumay, Y. (2008) The inhibition of the expression of the small Rho GTPase Rac1 induces differentiation with no effect on cell proliferation in growing human adult keratinocytes, *J. Cell. Biochem.* **103**, 857-864
70. Ho, T. T., Merajver, S. D., Lapiere, C. M., Nusgens, B. V., and Deroanne, C. F. (2008) RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha, *J. Biol. Chem.* **283**, 21588-21598
71. Deroanne, C. F., Hamelryckx, D., Ho, T. T., Lambert, C. A., Catroux, P., Lapiere, C. M., and Nusgens, B. V. (2005) Cdc42 downregulates MMP-1 expression by inhibiting the ERK1/2 pathway, *J. Cell Sci.* **118**, 1173-1183
72. Deroanne, C., Vouret-Craviari, V., Wang, B., and Pouyssegur, J. (2003) EphrinA1 inactivates integrin-mediated vascular smooth muscle cell spreading via the Rac/PAK pathway, *J. Cell Sci.* **116**, 1367-1376
73. Guignandon, A., Lafage-Proust, M. H., Usson, Y., Laroche, N., Caillot-Augusseau, A., Alexandre, C., and Vico, L. (2001) Cell cycling determines integrin-mediated adhesion in osteoblastic ROS 17/2.8 cells exposed to space-related conditions, *FASEB J.* **15**, 2036-2038
74. Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1999) Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior, *J. Cell Biol.* **147**, 1009-1022
75. Ushio-Fukai, M. (2006) Localizing NADPH oxidase-derived ROS, *Sci STKE* **2006**, re8
76. Moldovan, L., Mythreye, K., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Satterwhite, L. L. (2006) Reactive oxygen species in vascular endothelial cell motility. Roles of NAD(P)H oxidase and Rac1, *Cardiovasc. Res.* **71**, 236-246
77. Shinohara, M., Shang, W. H., Kubodera, M., Harada, S., Mitsushita, J., Kato, M., Miyazaki, H., Sumimoto, H., and Kamata, T. (2007) Nox1 redox signaling mediates oncogenic Ras-induced disruption of stress fibers and focal adhesions by down-regulating Rho, *J. Biol. Chem.* **282**, 17640-17648
78. Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M., and Werb, Z. (1998) Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change, *Science* **280**, 898-902

79. Schwartz, M. A. (1993) Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium, *J. Cell Biol.* **120**, 1003-1010
80. Ahlen, K., Berg, A., Stiger, F., Tengholm, A., Siegbahn, A., Gylfe, E., Reed, R. K., and Rubin, K. (1998) Cell interactions with collagen matrices in vivo and in vitro depend on phosphatidylinositol 3-kinase and free cytoplasmic calcium, *Cell Adhes. Commun.* **5**, 461-473
81. Pierschbacher, M. D., and Ruoslahti, E. (1984) Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule, *Nature* **309**, 30-33
82. Zhang, W. M., Kapyla, J., Puranen, J. S., Knight, C. G., Tiger, C. F., Pentikainen, O. T., Johnson, M. S., Farndale, R. W., Heino, J., and Gullberg, D. (2003) alpha 11beta 1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens, *J. Biol. Chem.* **278**, 7270-7277
83. Xu, Y., Gurusiddappa, S., Rich, R. L., Owens, R. T., Keene, D. R., Mayne, R., Hook, A., and Hook, M. (2000) Multiple binding sites in collagen type I for the integrins alpha1beta1 and alpha2beta1, *J. Biol. Chem.* **275**, 38981-38989
84. Knight, C. G., Morton, L. F., Peachey, A. R., Tuckwell, D. S., Farndale, R. W., and Barnes, M. J. (2000) The collagen-binding A-domains of integrins alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) recognize the same specific amino acid sequence, GFOGER, in native (triple-helical) collagens, *J. Biol. Chem.* **275**, 35-40
85. Yamaguchi, K., Ura, H., Yasoshima, T., Shishido, T., Denno, R., and Hirata, K. (2000) Establishment and characterization of a human gastric carcinoma cell line that is highly metastatic to lymph nodes, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **19**, 113-120
86. Xiao, G., Wang, D., Benson, M. D., Karsenty, G., and Franceschi, R. T. (1998) Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor, *J. Biol. Chem.* **273**, 32988-32994
87. Takeuchi, Y., Nakayama, K., and Matsumoto, T. (1996) Differentiation and cell surface expression of transforming growth factor-beta receptors are regulated by interaction with matrix collagen in murine osteoblastic cells, *J. Biol. Chem.* **271**, 3938-3944
88. Sato, M., Kojima, N., Miura, M., Imai, K., and Senoo, H. (1998) Induction of cellular processes containing collagenase and retinoid by integrin-binding to interstitial collagen in hepatic stellate cell culture, *Cell Biol. Int.* **22**, 115-125
89. Mizuno, M., and Kuboki, Y. (2001) Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen, *J Biochem* **129**, 133-138
90. Mizuno, M., Fujisawa, R., and Kuboki, Y. (2000) Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2beta1 integrin interaction, *J. Cell. Physiol.* **184**, 207-213
91. Buhusi, M., Midkiff, B. R., Gates, A. M., Richter, M., Schachner, M., and Maness, P. F. (2003) Close homolog of L1 is an enhancer of integrin-mediated cell migration, *J. Biol. Chem.* **278**, 25024-25031
92. Sjaastad, M. D., and Nelson, W. J. (1997) Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium, *Bioessays* **19**, 47-55
93. McCann, T. J., Terranova, G., Keyte, J. W., Papaioannou, S. S., Mason, W. T., Meikle, M. C., and McDonald, F. (1998) An analysis of Ca<sup>2+</sup> release by DGEA: mobilization of two functionally distinct internal stores in Saos-2 cells, *Am. J. Physiol.* **275**, C33-41
94. McCann, T. J., Mason, W. T., Meikle, M. C., and McDonald, F. (1997) A collagen peptide motif activates tyrosine kinase-dependent calcium signalling pathways in human osteoblast-like cells, *Matrix Biol.* **16**, 273-283
95. König HL, K. A., Lang S, Sönning W. (1981) *Biological Effects of Environmental Electromagnetism.*, Springer-Verlag New-York
96. Dolezalek, H. (1979) *Atmospheric Electricity*, CRC Press Inc, Boca Ralton
97. Bullard, E. (1948) The magnetic Field within the Earth *Mon Not R Astron Soc Geophys Supp* **5**, 248-258

98. OMS. (2007) Extremely Low Magnetic Fields. Organisation Mondiale de la Santé
99. Wertheimer, N., and Leeper, E. (1979) Electrical wiring configurations and childhood cancer, *Am. J. Epidemiol.* **109**, 273-284
100. Milham, S., Jr. (1985) Mortality in workers exposed to electromagnetic fields, *Environ. Health Perspect.* **62**, 297-300
101. Repacholi, M. H., and Greenebaum, B. (1999) Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs, *Bioelectromagnetics* **20**, 133-160
102. Kaiser, F. (1996) Extracellular signals and internal oscillation dynamics: biophysical aspects and modelling approaches for interactions of weak electromagnetic fields at the cellular level, *Bioelectromagnetics and Bioenergetics* **41**, 3-18
103. Bezrukov, S. M., and Vodyanoy, I. (1997) Stochastic resonance in non-dynamical systems without response thresholds, *Nature* **385**, 319-321
104. Astumian, R. D., Adair, R. K., and Weaver, J. C. (1997) Stochastic resonance at the single-cell level, *Nature* **388**, 632-633
105. Walleczek, J., and Budinger, T. F. (1992) Pulsed magnetic field effects on calcium signaling in lymphocytes: dependence on cell status and field intensity, *FEBS Lett.* **314**, 351-355
106. Lindstrom, E., Lindstrom, P., Berglund, A., Mild, K. H., and Lundgren, E. (1993) Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field, *J. Cell. Physiol.* **156**, 395-398
107. Liburdy, R. P. (1992) Calcium signaling in lymphocytes and ELF fields. Evidence for an electric field metric and a site of interaction involving the calcium ion channel, *FEBS Lett.* **301**, 53-59
108. Luben, R. (1994) In vitro systems for study of electromagnetic fields on bone and connective tissues. in *Biological effects of electric and magnetic fields* (Carpenter DO, A. S. ed., San Diego: Academic Press Ed.
109. Holian, O., Astumian, R. D., Lee, R. C., Reyes, H. M., Attar, B. M., and Walter, R. J. (1996) Protein kinase C activity is altered in HL60 cells exposed to 60 Hz AC electric fields, *Bioelectromagnetics* **17**, 504-509
110. Korzh-Sleptsova, I. L., Lindstrom, E., Mild, K. H., Berglund, A., and Lundgren, E. (1995) Low frequency MFs increased inositol 1,4,5-trisphosphate levels in the Jurkat cell line, *FEBS Lett.* **359**, 151-154
111. Dibirdik, I., Kristupaitis, D., Kurosaki, T., Tuel-Ahlgren, L., Chu, A., Pond, D., Tuong, D., Luben, R., and Uckun, F. M. (1998) Stimulation of Src family protein-tyrosine kinases as a proximal and mandatory step for SYK kinase-dependent phospholipase Cgamma2 activation in lymphoma B cells exposed to low energy electromagnetic fields, *J. Biol. Chem.* **273**, 4035-4039
112. Lin, H., Opler, M., Head, M., Blank, M., and Goodman, R. (1997) Electromagnetic field exposure induces rapid, transitory heat shock factor activation in human cells, *J. Cell. Biochem.* **66**, 482-488
113. Lin, H., Blank, M., and Goodman, R. (1999) A magnetic field-responsive domain in the human HSP70 promoter, *J. Cell. Biochem.* **75**, 170-176
114. Karabakhtsian, R., Broude, N., Shalts, N., Kochlatyi, S., Goodman, R., and Henderson, A. S. (1994) Calcium is necessary in the cell response to EM fields, *FEBS Lett.* **349**, 1-6
115. Goodman, R., and Blank, M. (1998) Magnetic field stress induces expression of hsp70, *Cell Stress Chaperones* **3**, 79-88
116. Saffer, J. D., and Thurston, S. J. (1995) Short exposures to 60 Hz magnetic fields do not alter MYC expression in HL60 or Daudi cells, *Radiat. Res.* **144**, 18-25
117. Saunders, R. D., and Jefferys, J. G. (2007) A neurobiological basis for ELF guidelines, *Health Phys.* **92**, 596-603
118. Simko, M., and Mattsson, M. O. (2004) Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation, *J. Cell. Biochem.* **93**, 83-92

119. Boland, A., Delapierre, D., Mossay, D., Dresse, A., and Seutin, V. (2002) Effect of intermittent and continuous exposure to electromagnetic fields on cultured hippocampal cells, *Bioelectromagnetics* **23**, 97-105
120. Adair, R. K. (1994) Constraints of thermal noise on the effects of weak 60-Hz magnetic fields acting on biological magnetite, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 2925-2929
121. Ivancsits, S., Diem, E., Jahn, O., and Rudiger, H. W. (2003) Intermittent extremely low frequency electromagnetic fields cause DNA damage in a dose-dependent way, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **76**, 431-436
122. Scarfì, M. R., Sannino, A., Perrotta, A., Sarti, M., Mesirca, P., and Bersani, F. (2005) Evaluation of genotoxic effects in human fibroblasts after intermittent exposure to 50 Hz electromagnetic fields: a confirmatory study, *Radiat. Res.* **164**, 270-276
123. Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling, *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 11-21
124. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 517-529
125. Liboff, A. R., Cherng, S., Jenrow, K. A., and Bull, A. (2003) Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase activity is altered by 20 microT magnetostatic fields, *Bioelectromagnetics* **24**, 32-38
126. Walleczek, J., and Liburdy, R. P. (1990) Nonthermal 60 Hz sinusoidal magnetic-field exposure enhances  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in rat thymocytes: dependence on mitogen activation, *FEBS Lett.* **271**, 157-160
127. Lindstrom, E., Lindstrom, P., Berglund, A., Lundgren, E., and Mild, K. H. (1995) Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities, *Bioelectromagnetics* **16**, 41-47
128. Lindstrom, E., Berglund, A., Mild, K. H., Lindstrom, P., and Lundgren, E. (1995) CD45 phosphatase in Jurkat cells is necessary for response to applied ELF magnetic fields, *FEBS Lett.* **370**, 118-122
129. Vergano, D. (1999) Scientific misconduct. EMF researcher made up data, ORI says, *Science* **285**, 23, 925
130. Liburdy, R. P. (1999) Calcium and EMFs: graphing the data, *Science* **285**, 337
131. Wey, H. E., Conover, D. P., Mathias, P., Toraason, M., and Lotz, W. G. (2000) 50-Hertz magnetic field and calcium transients in Jurkat cells: results of a research and public information dissemination (RAPID) program study, *Environ. Health Perspect.* **108**, 135-140
132. Mattsson, M. O., Lindstrom, E., Still, M., Lindstrom, P., Mild, K. H., and Lundgren, E. (2001)  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise in Jurkat E6-1 cell lines from different sources as a response to 50 Hz magnetic field exposure as a reproducible effect and independent of poly-L-lysine treatment, *Cell Biol. Int.* **25**, 901-907
133. McCreary, C. R., Thomas, A. W., and Prato, F. S. (2002) Factors confounding cytosolic calcium measurements in Jurkat E6.1 cells during exposure to ELF magnetic fields, *Bioelectromagnetics* **23**, 315-328
134. Aldinucci, C., Garcia, J. B., Palmi, M., Sgaragli, G., Benocci, A., Meini, A., Pessina, F., Rossi, C., Bonechi, C., and Pessina, G. P. (2003) The effect of strong static magnetic field on lymphocytes, *Bioelectromagnetics* **24**, 109-117
135. Aldinucci, C., Garcia, J. B., Palmi, M., Sgaragli, G., Benocci, A., Meini, A., Pessina, F., Rossi, C., Bonechi, C., and Pessina, G. P. (2003) The effect of exposure to high flux density static and pulsed magnetic fields on lymphocyte function, *Bioelectromagnetics* **24**, 373-379
136. Reinbold, K. A., and Pollack, S. R. (1997) Serum plays a critical role in modulating  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  of primary culture bone cells exposed to weak ion-resonance magnetic fields, *Bioelectromagnetics* **18**, 203-214
137. Loschinger, M., Thumm, S., Hammerle, H., and Rodemann, H. P. (1999) Induction of intracellular calcium oscillations in human skin fibroblast populations by sinusoidal extremely low-frequency

- magnetic fields (20 Hz, 8 mT) is dependent on the differentiation state of the single cell, *Radiat. Res.* **151**, 195-200
138. Craviso, G. L., Poss, J., Lanctot, C., Lundback, S. S., Chatterjee, I., and Publicover, N. G. (2002) Intracellular calcium activity in isolated bovine adrenal chromaffin cells in the presence and absence of 60 Hz magnetic fields, *Bioelectromagnetics* **23**, 557-567
  139. Ikehara, T., Park, K. H., Houchi, H., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Shono, M., Minakuchi, K., Tamaki, T., Kinouchi, Y., Yoshizaki, K., and Miyamoto, H. (1998) Effects of a time-varying strong magnetic field on transient increase in cytosolic free Ca<sup>2+</sup> induced by bradykinin in cultured bovine adrenal chromaffin cells, *FEBS Lett.* **435**, 229-232
  140. Ikehara, T., Park, K. H., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Houchi, H., Azuma, M., Minakuchi, K., Kashimoto, H., Kitamura, M., Kinouchi, Y., Yoshizaki, K., and Miyamoto, H. (2002) Effects of a time varying strong magnetic field on release of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> from intracellular stores in cultured bovine adrenal chromaffin cells, *Bioelectromagnetics* **23**, 505-515
  141. Shahidain, R., Mullins, R. D., and Sisken, J. E. (2001) Calcium spiking activity and baseline calcium levels in ROS 17/2.8 cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields (ELF EMF), *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 241-248
  142. Thumm, S., Loschinger, M., Glock, S., Hammerle, H., and Rodemann, H. P. (1999) Induction of cAMP-dependent protein kinase A activity in human skin fibroblasts and rat osteoblasts by extremely low-frequency electromagnetic fields, *Radiat. Environ. Biophys.* **38**, 195-199
  143. Zhou, J., Yao, G., Zhang, J., and Chang, Z. (2002) CREB DNA binding activation by a 50-Hz magnetic field in HL60 cells is dependent on extra- and intracellular Ca(2+) but not PKA, PKC, ERK, or p38 MAPK, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 1013-1018
  144. Jin, M., Blank, M., and Goodman, R. (2000) ERK1/2 phosphorylation, induced by electromagnetic fields, diminishes during neoplastic transformation, *J. Cell. Biochem.* **78**, 371-379
  145. Nie, K., and Henderson, A. (2003) MAP kinase activation in cells exposed to a 60 Hz electromagnetic field, *J. Cell. Biochem.* **90**, 1197-1206
  146. Berridge, M. J. (1990) Calcium oscillations, *J. Biol. Chem.* **265**, 9583-9586
  147. Shuttleworth, T. J., Thompson, J. L., and Mignen, O. (2004) ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry, *Physiology (Bethesda)* **19**, 355-361
  148. Putney, J. W., and Bird, G. S. (2008) Cytoplasmic calcium oscillations and store-operated calcium influx, *J Physiol* **586**, 3055-3059
  149. Berridge, M. J. (2008) Smooth muscle cell calcium activation mechanisms, *J Physiol* **586**, 5047-5061
  150. Brandman, O., and Meyer, T. (2008) Feedback loops shape cellular signals in space and time, *Science* **322**, 390-395
  151. Zmyslony, M., Palus, J., Dziubaltowska, E., Politsanski, P., Mamrot, P., Rajkowska, E., and Kamedula, M. (2004) Effects of in vitro exposure to power frequency magnetic fields on UV-induced DNA damage of rat lymphocytes, *Bioelectromagnetics* **25**, 560-562
  152. Takashima, Y., Ikehata, M., Miyakoshi, J., and Koana, T. (2003) Inhibition of UV-induced G1 arrest by exposure to 50 Hz magnetic fields in repair-proficient and -deficient yeast strains, *Int. J. Radiat. Biol.* **79**, 919-924
  153. Kumlin, T., Alhonen, L., Janne, J., Lang, S., Kosma, V. M., and Juutilainen, J. (1998) Epidermal ornithine decarboxylase and polyamines in mice exposed to 50 Hz magnetic fields and UV radiation, *Bioelectromagnetics* **19**, 388-391
  154. Kumlin, T., Heikkinen, P., Kosma, V. M., Alhonen, L., Janne, J., and Juutilainen, J. (2002) p53-independent apoptosis in UV-irradiated mouse skin: possible inhibition by 50 Hz magnetic fields, *Radiat. Environ. Biophys.* **41**, 155-158
  155. Ruiz-Gomez, M. J., and Martinez-Morillo, M. (2005) Enhancement of the cell-killing effect of ultraviolet-C radiation by short-term exposure to a pulsed magnetic field, *Int. J. Radiat. Biol.* **81**, 483-490

156. Dicarlo, A. L., Hargis, M. T., Penafiel, L. M., and Litovitz, T. A. (1999) Short-term magnetic field exposures (60 Hz) induce protection against ultraviolet radiation damage, *Int. J. Radiat. Biol.* **75**, 1541-1549
157. Di Carlo, A. L., White, N. C., and Litovitz, T. A. (2001) Mechanical and electromagnetic induction of protection against oxidative stress, *Bioelectrochemistry* **53**, 87-95
158. Mannerling, A. C., Mild, K. H., and Mattsson, M. O. (2007) Extremely low-frequency magnetic field exposure and protection against UV-induced death in chicken embryos, *Electromagn Biol Med* **26**, 73-81
159. Debacq-Chainiaux, F., Borlon, C., Pascal, T., Royer, V., Eliaers, F., Ninane, N., Carrard, G., Friguet, B., de Longueville, F., Boffe, S., Remacle, J., and Toussaint, O. (2005) Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway, *J. Cell Sci.* **118**, 743-758
160. Chainiaux, F., Magalhaes, J. P., Eliaers, F., Remacle, J., and Toussaint, O. (2002) UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 1331-1339
161. Freedberg I. E. A., Wolff K, Austen F, Goldsmith L, Katz S. (2003) *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, McGraw-Hill
162. Seite, S., Colige, A., Deroanne, C., Lambert, C., Piquemal-Vivenot, P., Montastier, C., Fourtanier, A., Lapiere, C., and Nusgens, B. (2004) Changes in matrix gene and protein expressions after single or repeated exposure to one minimal erythemal dose of solar-simulated radiation in human skin in vivo, *Photochem. Photobiol.* **79**, 265-271
163. Rittie, L., and Fisher, G. J. (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging, *Ageing Res Rev* **1**, 705-720
164. Young, A. R., Potten, C. S., Nikaido, O., Parsons, P. G., Boenders, J., Ramsden, J. M., and Chadwick, C. A. (1998) Human melanocytes and keratinocytes exposed to UVB or UVA in vivo show comparable levels of thymine dimers, *J. Invest. Dermatol.* **111**, 936-940
165. Young, A. R., Chadwick, C. A., Harrison, G. I., Nikaido, O., Ramsden, J., and Potten, C. S. (1998) The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema, *J. Invest. Dermatol.* **111**, 982-988
166. Young, A. R., Chadwick, C. A., Harrison, G. I., Hawk, J. L., Nikaido, O., and Potten, C. S. (1996) The in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II, *J. Invest. Dermatol.* **106**, 1307-1313
167. Xu, G., Snellman, E., Bykov, V. J., Jansen, C. T., and Hemminki, K. (2000) Effect of age on the formation and repair of UV photoproducts in human skin in situ, *Mutat. Res.* **459**, 195-202
168. Rabe, J. H., Mamelak, A. J., McElgunn, P. J., Morison, W. L., and Sauder, D. N. (2006) Photoaging: mechanisms and repair, *J. Am. Acad. Dermatol.* **55**, 1-19
169. Weinberg, R. (2007) *The biology of CANCER*, Garland Science, New-York
170. Warmuth, I., Harth, Y., Matsui, M. S., Wang, N., and DeLeo, V. A. (1994) Ultraviolet radiation induces phosphorylation of the epidermal growth factor receptor, *Cancer Res.* **54**, 374-376
171. Sachsenmaier, C., Radler-Pohl, A., Zinck, R., Nordheim, A., Herrlich, P., and Rahmsdorf, H. J. (1994) Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response, *Cell* **78**, 963-972
172. Fisher, G. J., and Voorhees, J. J. (1998) Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 61-68
173. Dy, L. C., Pei, Y., and Travers, J. B. (1999) Augmentation of ultraviolet B radiation-induced tumor necrosis factor production by the epidermal platelet-activating factor receptor, *J. Biol. Chem.* **274**, 26917-26921
174. Rosette, C., and Karin, M. (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors, *Science* **274**, 1194-1197

175. Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A., and Herrlich, P. (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents, *EMBO J.* **15**, 5314-5325
176. Zheng, Z. S., Chen, R. Z., and Prystowsky, J. H. (1993) UVB radiation induces phosphorylation of the epidermal growth factor receptor, decreases EGF binding and blocks EGF induction of ornithine decarboxylase gene expression in SV40-transformed human keratinocytes, *Exp. Dermatol.* **2**, 257-265
177. Xu, Y., Voorhees, J. J., and Fisher, G. J. (2006) Epidermal growth factor receptor is a critical mediator of ultraviolet B irradiation-induced signal transduction in immortalized human keratinocyte HaCaT cells, *Am. J. Pathol.* **169**, 823-830
178. van der Geer, P., Hunter, T., and Lindberg, R. A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways, *Annu. Rev. Cell Biol.* **10**, 251-337
179. Herrlich, P., Karin, M., and Weiss, C. (2008) Supreme EnLIGHTenment: damage recognition and signaling in the mammalian UV response, *Mol. Cell* **29**, 279-290
180. Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation, *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 240-246
181. Angel, P., and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation, *Biochim. Biophys. Acta* **1072**, 129-157
182. Fisher, G. J., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1997) Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light, *N. Engl. J. Med.* **337**, 1419-1428
183. Fisher, G. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1996) Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism, *Nature* **379**, 335-339
184. Fisher, G. J., Choi, H. C., Bata-Csorgo, Z., Shao, Y., Datta, S., Wang, Z. Q., Kang, S., and Voorhees, J. J. (2001) Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo, *J. Invest. Dermatol.* **117**, 219-226
185. Yoshizumi, M., Nakamura, T., Kato, M., Ishioka, T., Kozawa, K., Wakamatsu, K., and Kimura, H. (2008) Release of cytokines/chemokines and cell death in UVB-irradiated human keratinocytes, HaCaT, *Cell Biol. Int.* **32**, 1405-1411
186. Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N. E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J. Cell Biol.* **106**, 761-771
187. Sharrard, W. J. (1990) A double-blind trial of pulsed electromagnetic fields for delayed union of tibial fractures, *J. Bone Joint Surg. Br.* **72**, 347-355
188. Griffin, X. L., Warner, F., and Costa, M. (2008) The role of electromagnetic stimulation in the management of established non-union of long bone fractures: what is the evidence?, *Injury* **39**, 419-429
189. Di Carlo, A., White, N., Guo, F., Garrett, P., and Litovitz, T. (2002) Chronic electromagnetic field exposure decreases HSP70 levels and lowers cytoprotection, *J. Cell. Biochem.* **84**, 447-454
190. Czyz, J., Nikolova, T., Schuderer, J., Kuster, N., and Wobus, A. M. (2004) Non-thermal effects of power-line magnetic fields (50 Hz) on gene expression levels of pluripotent embryonic stem cells—the role of tumour suppressor p53, *Mutat. Res.* **557**, 63-74
191. Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006) VEGF receptor signalling - in control of vascular function, *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 359-371
192. Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. (1997) The biology of vascular endothelial growth factor, *Endocr. Rev.* **18**, 4-25
193. Otrock, Z. K., Makarem, J. A., and Shamseddine, A. I. (2007) Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review, *Blood Cells. Mol. Dis.* **38**, 258-268



194. Rosenthal, R. A., Megyesi, J. F., Henzel, W. J., Ferrara, N., and Folkman, J. (1990) Conditioned medium from mouse sarcoma 180 cells contains vascular endothelial growth factor, *Growth Factors* **4**, 53-59
195. Kowanzetz, M., and Ferrara, N. (2006) Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective, *Clin. Cancer Res.* **12**, 5018-5022
196. Yuan, F., Chen, Y., Dellian, M., Safabakhsh, N., Ferrara, N., and Jain, R. K. (1996) Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14765-14770
197. Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation, *J. Biol. Chem.* **273**, 30336-30343
198. Gerber, H. P., Dixit, V., and Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells, *J. Biol. Chem.* **273**, 13313-13316
199. Benjamin, L. E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., and Keshet, E. (1999) Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal, *J. Clin. Invest.* **103**, 159-165
200. Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., and Keshet, E. (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity, *Nat. Med.* **1**, 1024-1028
201. Fujio, Y., and Walsh, K. (1999) Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner, *J. Biol. Chem.* **274**, 16349-16354
202. Gerber, H. P., Hillan, K. J., Ryan, A. M., Kowalski, J., Keller, G. A., Rangell, L., Wright, B. D., Radtke, F., Aguet, M., and Ferrara, N. (1999) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice, *Development* **126**, 1149-1159
203. Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P. C., Pan, Y. C., Olander, J. V., Connolly, D. T., and Stern, D. (1990) Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration, *J. Exp. Med.* **172**, 1535-1545
204. Broxmeyer, H. E., Cooper, S., Li, Z. H., Lu, L., Song, H. Y., Kwon, B. S., Warren, R. E., and Donner, D. B. (1995) Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor, *Int. J. Hematol.* **62**, 203-215
205. Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science* **219**, 983-985
206. Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., and Dvorak, A. M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis, *Am. J. Pathol.* **146**, 1029-1039
207. Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Granger, H. J., and Bicknell, R. (1997) Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis, *J. Clin. Invest.* **99**, 2625-2634
208. Parenti, A., Morbidelli, L., Cui, X. L., Douglas, J. G., Hood, J. D., Granger, H. J., Ledda, F., and Ziche, M. (1998) Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium, *J. Biol. Chem.* **273**, 4220-4226
209. Morbidelli, L., Chang, C. H., Douglas, J. G., Granger, H. J., Ledda, F., and Ziche, M. (1996) Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium, *Am. J. Physiol.* **270**, H411-415

210. Yla-Herttuala, S., Rissanen, T. T., Vajanto, I., and Hartikainen, J. (2007) Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine, *J. Am. Coll. Cardiol.* **49**, 1015-1026
211. Terman, B. I., Dougher-Vermazen, M., Carrion, M. E., Dimitrov, D., Armellino, D. C., Gospodarowicz, D., and Bohlen, P. (1992) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 1579-1586
212. Quinn, T. P., Peters, K. G., De Vries, C., Ferrara, N., and Williams, L. T. (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7533-7537
213. Millauer, B., Wизigmann-Voos, S., Schnurch, H., Martinez, R., Moller, N. P., Risau, W., and Ullrich, A. (1993) High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis, *Cell* **72**, 835-846
214. Shen, H., Clauss, M., Ryan, J., Schmidt, A. M., Tijburg, P., Borden, L., Connolly, D., Stern, D., and Kao, J. (1993) Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes, *Blood* **81**, 2767-2773
215. Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Rockl, W., Waltenberger, J., and Risau, W. (1996) The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis, *J. Biol. Chem.* **271**, 17629-17634
216. Kendall, R. L., and Thomas, K. A. (1993) Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10705-10709
217. Tjoa, M. L., Levine, R. J., and Karumanchi, S. A. (2007) Angiogenic factors and preeclampsia, *Front. Biosci.* **12**, 2395-2402
218. Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2001) VEGF receptor signal transduction, *Sci STKE* **2001**, RE21
219. Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor, *Cell* **92**, 735-745
220. Gerber, H. P., Vu, T. H., Ryan, A. M., Kowalski, J., Werb, Z., and Ferrara, N. (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation, *Nat. Med.* **5**, 623-628
221. Basset, D. (1943) The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle, *Am. J. Anat.* **73**, 251-291
222. Becker, C. M., and D'Amato, R. J. (2007) Angiogenesis and antiangiogenic therapy in endometriosis, *Microvasc. Res.* **74**, 121-130
223. Lambrechts, D., Storkebaum, E., and Carmeliet, P. (2004) VEGF: necessary to prevent motoneuron degeneration, sufficient to treat ALS?, *Trends Mol Med* **10**, 275-282
224. Greenberg, D. A., and Jin, K. (2005) From angiogenesis to neuropathology, *Nature* **438**, 954-959
225. Fruttiger, M. (2008) VEGF Gene Regulation. in *VEGF in Development* (Ruhrberg, C. ed., Landes Bioscience and Springer Science+Business Media Ed.
226. Nabors, L. B., Gillespie, G. Y., Harkins, L., and King, P. H. (2001) HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs, *Cancer Res.* **61**, 2154-2161
227. Pages, G., Berra, E., Milanini, J., Levy, A. P., and Pouyssegur, J. (2000) Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability, *J. Biol. Chem.* **275**, 26484-26491
228. Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., and Persico, G. (1996) Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3, *Circulation* **93**, 1493-1495

229. Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., and Abraham, J. A. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing, *J. Biol. Chem.* **266**, 11947-11954
230. Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D. W. (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA, *Mol. Endocrinol.* **5**, 1806-1814
231. Bates, D. O., Cui, T. G., Doughty, J. M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J. D., Peat, D., Gillatt, D., and Harper, S. J. (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma, *Cancer Res.* **62**, 4123-4131
232. Robinson, C. J., and Stringer, S. E. (2001) The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors, *J. Cell Sci.* **114**, 853-865
233. Lauer, G., Sollberg, S., Cole, M., Krieg, T., and Eming, S. A. (2002) Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165 variant by a site-directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site, *FEBS Lett.* **531**, 309-313
234. Lee, S., Jilani, S. M., Nikolova, G. V., Carpizo, D., and Iruela-Arispe, M. L. (2005) Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors, *J. Cell Biol.* **169**, 681-691
235. von Wronski, M. A., Raju, N., Pillai, R., Bogdan, N. J., Marinelli, E. R., Nanjappan, P., Ramalingam, K., Arunachalam, T., Eaton, S., Linder, K. E., Yan, F., Pochon, S., Tweedle, M. F., and Nunn, A. D. (2006) Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor, *J. Biol. Chem.* **281**, 5702-5710
236. Cebe Suarez, S., Pieren, M., Cariolato, L., Arn, S., Hoffmann, U., Bogucki, A., Manlius, C., Wood, J., and Ballmer-Hofer, K. (2006) A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2, *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2067-2077
237. Houck, K. A., Leung, D. W., Rowland, A. M., Winer, J., and Ferrara, N. (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms, *J. Biol. Chem.* **267**, 26031-26037
238. Park, J. E., Keller, G. A., and Ferrara, N. (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF, *Mol. Biol. Cell* **4**, 1317-1326
239. Keyt, B. A., Berleau, L. T., Nguyen, H. V., Chen, H., Heinsohn, H., Vandlen, R., and Ferrara, N. (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency, *J. Biol. Chem.* **271**, 7788-7795
240. Claffey, K. P., Senger, D. R., and Spiegelman, B. M. (1995) Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF, *Biochim. Biophys. Acta* **1246**, 1-9
241. Li, H., Yonekura, H., Kim, C. H., Sakurai, S., Yamamoto, Y., Takiya, T., Futo, S., Watanabe, T., and Yamamoto, H. (2004) Possible participation of p1Cln in the regulation of angiogenesis through alternative splicing of vascular endothelial growth factor receptor mRNAs, *Endothelium* **11**, 293-300
242. Dowhan, D. H., Hong, E. P., Auboeuf, D., Dennis, A. P., Wilson, M. M., Berget, S. M., and O'Malley, B. W. (2005) Steroid hormone receptor coactivation and alternative RNA splicing by U2AF65-related proteins CAPERalpha and CAPERbeta, *Mol. Cell* **17**, 429-439
243. Cohen, C. D., Doran, P. P., Blattner, S. M., Merkle, M., Wang, G. Q., Schmid, H., Mathieson, P. W., Saleem, M. A., Henger, A., Rastaldi, M. P., and Kretzler, M. (2005) Sam68-like mammalian protein 2, identified by digital differential display as expressed by podocytes, is induced in proteinuria and involved in splice site selection of vascular endothelial growth factor, *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1958-1965
244. Nowak, D. G., Woolard, J., Amin, E. M., Konopatskaya, O., Saleem, M. A., Churchill, A. J., Ladomery, M. R., Harper, S. J., and Bates, D. O. (2008) Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors, *J. Cell Sci.* **121**, 3487-3495

245. Jiang, W., Lu, Y., Chen, Z., Chen, S., Zhang, M., Jin, L., Lou, J., and He, J. (2008) Studying the genotoxicity of vincristine on human lymphocytes using comet assay, micronucleus assay and TCR gene mutation test in vitro, *Toxicology* **252**, 113-117
246. Digue, L., Orsiere, T., De Meo, M., Mattei, M. G., Depetris, D., Duffaud, F., Favre, R., and Botta, A. (1999) Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* **34**, 269-278
247. Jaspers, N. G., Gatti, R. A., Baan, C., Linssen, P. C., and Bootsma, D. (1988) Genetic complementation analysis of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome: a survey of 50 patients, *Cytogenet. Cell Genet.* **49**, 259-263
248. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage, *Science* **282**, 1497-1501
249. Chen, W., and Bowden, G. T. (2000) Role of p38 mitogen-activated protein kinases in ultraviolet-B irradiation-induced activator protein 1 activation in human keratinocytes, *Mol. Carcinog.* **28**, 196-202
250. Adler, V., Schaffer, A., Kim, J., Dolan, L., and Ronai, Z. (1995) UV irradiation and heat shock mediate JNK activation via alternate pathways, *J. Biol. Chem.* **270**, 26071-26077

## *Liste de publications personnelles*

Lambert ChA, **Mineur P**, Nusgens BV. (2008) VEGF111 : Dr Jekyll et Mr Hyde ? Médecine Sciences, 24 (6-7), 579-580. (sur invitation)

Belaid Choucair Z, Lepelletier Y, Thiry A, Humblet C, Maachi M, Poncin G, Schneider E, Briquet A, **Mineur P**, Lambert ChA, Mendes-Das-Cruz D, Ahui ML, Bertho JM, Asnafi V, Dy M, Boniver J, Nusgens BV, Hermine O, Defresne. (2008) Adipocytes block Granulopoiesis through Neuropilin-1 induced G-CSF inhibition. Stem Cells, Jun; 26(6):1556-64.

**Mineur P**, Colige AC, Deroanne CF, Dubail J, Kesteloot F, Habraken Y, Noel A, Vöö S, Waltenberger J, Lapière ChM, Nusgens BV, Lambert ChA. (2007) Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. J. Cell Biol. 179:1261-1273.

Lambert ChA, Deroanne C, Servotte S, **Mineur P**, Lapière ChM and Nusgens BV (2005) Cell survival and preservation of siRNA-mediated protein knock-down upon serum-free cryopreservation (-80°C). Gravitational and Space Biology 18: 103-104.

Kato Y, Lambert ChA, Colige AC, **Mineur P**, Noel A, Frankenne F, Foidart JM, Baba M, Hata R, Miyazaki K, Tsukuda M (2005) Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. J. Biol. Chem. 280: 10938 – 10944.

Nusgens BV, Chometon G, Guignandon A, HO G, Lambert ChA, **Mineur P**, Servotte S, Zhang Z, Deroanne C, Eckes B, Vico L, Krieg T, Aumailley M, Lapière ChM (2005) Role of the RhoGTPases in the cellular receptivity and reactivity to mechanical signals including microgravity. J. Gravitational Physiol. 12:P269-P270.

**Mineur P**, Guignandon A, Lambert ChA, Lapière ChM and Nusgens BV (2005) RGDS and DGEA-induced  $[Ca^{2+}]_i$  signalling in human dermal fibroblasts. Biochem Biophys Acta – Molecular Cell Research : 1746 :28-37.