

Université de Sherbrooke

**EXPRESSION ET SIGNALISATION DES INTÉGRINES DES CELLULES
GLOMÉRULÉES DE LA GLANDE SURRÉNALE DE RAT : IMPLICATION
DE COMPOSANTES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE,
D'HORMONES ET DE CANAUX IONIQUES.**

Par

Shirley Campbell

Département de Physiologie et Biophysique

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé

en vue de l'obtention du grade de

Philosophiae doctor (Ph.D.) en Physiologie (Biophysique)

Membres du jury :

Professeure Nuria Basora (Présidente du jury)	Département de Physiologie et Biophysique Université de Sherbrooke
Professeure Michèle Brochu (Membre du jury)	Département d'Obstétrique et Gynécologie Université de Montréal
Professeure Nathalie Fauchoux (Membre du jury)	Département de Génie Chimique Université de Sherbrooke
Professeure Nicole Gallo-Payet (Membre du jury)	Service d'Endocrinologie Université de Sherbrooke
Professeur Marcel Daniel Payet (Directeur de thèse)	Département de Physiologie et Biophysique Université de Sherbrooke

Sherbrooke, Québec, Canada

Juillet 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-28269-4
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-28269-4

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	1
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	4
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	6
LISTE DES PUBLICATIONS.....	7
RÉSUMÉ.....	8
1. INTRODUCTION	11
1.1. LES INTÉGRINES	11
1.1.1. Structure des intégrines.....	12
1.1.1.1. Sous-unité alpha	13
1.1.1.2. Sous-unité bêta	14
1.1.1.3. Domaine de liaison aux cations et aux ligands.....	15
1.2. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE.....	16
1.2.1. Les Collagènes	18
1.2.1.1. Structure	18
1.2.1.2. Biosynthèse et formation de la matrice de collagènes.....	22
1.2.1.3. Intégrines liant les collagènes.....	24
1.2.2. Les laminines	24
1.2.2.1. Structure	24
1.2.2.2. Formation de la matrice de laminine	25
1.2.2.3. Intégrines liant les laminines.....	27
1.2.3. Les fibronectines	27
1.2.3.1 Structure	29
1.2.3.2. Domaines de liaison présents sur la fibronectine	29
1.2.3.3. Formation de la matrice de fibronectine	31
1.2.3.4. Intégrines liant la fibronectine.....	33
1.3. FORMATION DE POINTS FOCaux ET VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR L'ACTIVATION DES INTÉGRINES.....	36
1.3.1. Signalisation « outside-in ».....	36
1.3.1.1. Intégrines : formation de points focaux	36
1.3.1.2. Phosphatidylinositides	39
1.3.1.3. Intégrines et calcium intracellulaire.....	40

1.4 RÔLES PHYSIOLOGIQUES DES INTÉGRINES.....	44
1.4.1. Intégrines et prolifération cellulaire	44
1.4.2. Intégrines et migration cellulaire.....	45
1.4.3. Intégrines, mort cellulaire (apoptose) et survie cellulaire.....	46
1.4.4. Intégrines et expression de gènes	48
1.4.5. Intégrines et sécrétion d'hormones.....	48
1.5. LA GLANDE SURRÉNALE	50
1.5.1. Structure.....	50
1.5.2. L'aldostérone et son contrôle	53
1.5.2.1. L'Angiotensine II (Ang II) et sa signalisation.....	55
1.5.2.2. L'ACTH et sa signalisation.....	57
1.5.3. La corticostérone et son contrôle.....	58
1.5.4. Liens entre les intégrines et les autres récepteurs de la glande surrénale	60
1.6. NOTRE MODÈLE D'ÉTUDE	62
2. BUTS DU PROJET	63
3. MATÉRIELS ET MÉTHODES	64
3.1 AGENTS CHIMIQUES	64
3.2 PRÉPARATION DES CELLULES GLOMÉRULÉES.....	64
3.3 RT-PCR	65
3.4 IMMUNOHISTOCHIMIE	66
3.5 TIRF (TOTAL INTERNAL REFLECTION FLUORESCENCE).....	67
3.6 IMMUNOCYTOCHIMIE INDIRECTE.....	68
3.7 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN BLOT	68
3.8 IMMUNOCYTOCHIMIE DIRECTE et DOUBLE IMMUNOCYTOCHIMIE ..	69
3.9 MESURE D'ALDOSTERONE	70
4. RÉSULTATS.....	71
4.1. Article #1: Expression of extracellular matrix components and their integrins receptors in the adult rat adrenal gland: a role in cell proliferation and secretion.....	71
4.2 AUTRES RÉSULTATS (1)	112
4.2.1. Expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 1$ dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte.....	112
4.2.2. Expression de l'intégrine $\alpha 8$ dans la glande surrénale de rat adulte.....	113

4.2.3. Expression de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte par la méthode du TIRF.....	114
4.2.4. Production et arrangement de composantes de la MEC (matrice extracellulaire) par les cellules glomérulées.....	114
4.2.5. Effet d'un anticorps $\alpha 5\beta 1$ sur la sécrétion de composantes de la MEC par les cellules glomérulées	119
4.2.6. Effet d'inhibiteurs des voies p42/44 ^{mapk} , Junk et p38 MAPK sur la sécrétion de fibronectine par les cellules glomérulées.....	120
4.2.7. Effet de l'Ang II et production de fibronectine par les cellules glomérulées	121
4.3. Article #2: Fibronectin activates a TRPC3/6/7 channel in rat adrenal glomerulosa cells in culture.....	123
4.4. AUTRES RÉSULTATS (2)	160
4.4.1 Stimulation de la sécrétion d'aldostérone par l'OAG (1-oleoyl-2-acétylglycérol)	160
4.4.2. Expression de canaux potassiques par les cellules glomérulées	161
5. DISCUSSION.....	165
5.1. MEC/Intégrines et prolifération cellulaire.....	165
5.2. MEC/Intégrines et sécrétion de stéroïdes	166
5.3. Production de composantes de la MEC.....	167
5.4. Rôles de l'interaction intégrines-canaux	171
6. CONCLUSION.....	176
7. REMERCIEMENTS.....	179
8. RÉFÉRENCES	180

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Tableau 1. Membres de la superfamille des intégrines.....	13
Tableau 2. Membres de la superfamille des collagènes.....	20
Figure 1. Schéma représentatif d'un hétérodimère d'intégrines.	17
Figure 2. Formation de la suprastructure formée par le collagène de type IV.....	21
Figure 3. Synthèse du collagène	23
Figure 4. Structure des laminines.	26
Figure 5. Schéma des étapes de l'incorporation de la laminine dans la membrane basale.	28
Figure 6. Schéma d'une molécule de fibronectine	34
Figure 7. Schéma représentant les étapes présumées de l'assemblage de molécules de fibronectine dans la matrice extracellulaire.....	35
Figure 8. Points focaux et adhésions fibrillaires.....	38
Figure 9. Complexe de signalisation retrouvé aux points d'ancrage.....	39
Figure 10. Structure des sous-unités des canaux TRP.	43
Figure 11. Mécanisme d'activation de certains canaux TRP.	44
Figure 12. Schéma d'une glande surrénale.	52
Figure 13. Schéma des voies de signalisation induites suite à l'activation du récepteur AT ₁ par l'Ang II.....	57
Figure 14. Schéma des voies de signalisation induites suite à l'activation du récepteur MC2 par l'ACTH.....	58
Figure 15. Présence de l'ARNm de la sous-unité d'intégrine α 1 dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte.	112
Figure 16. Expression de la sous-unité d'intégrine α 8 dans la glande surrénale de rat adulte.....	113
Figure 17. Expression de la sous-unité d'intégrine α 5 dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte par la méthode du TIRF.	114
Figure 18. Présence des ARNm de composantes de la MEC chez les cellules glomérulées.	115
Figure 19. Production de composantes de la MEC par les cellules glomérulées.	117

Figure 20. Production et arrangement de composantes de la MEC par les cellules glomérulées.	118
Figure 21. Colocalisation de la fibronectine et laminine-1 produites par les cellules glomérulées.	119
Figure 22. Effet de l'anticorps bloqueur anti- $\alpha 5\beta 1$ sur l'arrangement de la matrice de fibronectine.	120
Figure 23. Effet d'inhibiteurs de voies de signalisation intracellulaire sur la sécrétion de fibronectine par les cellules glomérulées.	121
Figure 24. Effet de l'Ang II sur la production de fibronectine par les cellules glomérulées.	122
Figure 25. Sécrétion d'aldostérone par les cellules glomérulées.	160
Figure 26. Expression du canal potassique BKCa dans la glande surrénale de rat adulte.	161
Figure 27. Expression du canal ether-a-gogo (Kv10.1) chez les cellules glomérulées.	163
Figure 28. Effet de la matrice de fibronectine et de l'ACTH sur l'expression du canal ether-a-gogo (Kv10.1) chez les cellules glomérulées.	164
Figure 29. Hypothèse sur la régulation de la localisation du canal ether-a-gogo par l'ACTH et la fibronectine.	175
Figure 30 : Schéma récapitulatif du rôle des interactions intégrines/MEC, hormones et canaux sur les fonctions des cellules de la glande surrénale de rat adulte.	178

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ACTH : Adrenocorticotropie hormone
ADN : Acide Désoxyribonucléique
Ang II : Angiotensine II
ARN : Acide ribonucléique
AT₁ : Récepteur AT₁ de l'Ang II
AT₂ : Récepteur AT₂ de l'Ang II
Ca²⁺ : ion calcium
Col I: Collagène de type I
Col IV: Collagène de type IV
FN: Fibronectine
LN: Laminine
OAG: 1-oleoyl-2-acétylglycérol
PLL: Poly-L-lysine
RGDS: peptide Arginine-Glycine-Aspartate-Serine
Sr²⁺ : ion strontium
TG: Thapsigargine

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles publiés :

- Campbell S, Otis M, Cote M, Gallo-Payet N, Payet MD.
Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: a role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium. *Endocrinology*. 2003 Apr;144(4):1486-1495.
- Cloutier M, Campbell S, Basora N, Proteau S, Payet MD, Rousseau E.
20-HETE inotropic effects involve the activation of a nonselective cationic current in airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003 Sep;285(3):L560-568.
- Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N.
Angiotensin II stimulates protein synthesis and inhibits proliferation in primary cultures of rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*. 2005 Feb;146(2):633-642.

Résumés publiés:

- Campbell S, Otis M, Gallo-Payet N, Payet MD.
Role of extracellular matrix components in adult rat adrenal gland homeostasis. *Endocr Res*. 2004 Nov;30(4):609-610.
- Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N.
Angiotensin II inhibits cell proliferation and stimulates protein synthesis in rat glomerulosa cells. *Endocr Res*. 2004 Nov;30(4):525-526.

Revue publiée:

- Campbell S, Otis M, Gallo-Payet N, Payet MD. Adrenal gland: Involvement of integrins, extracellular matrix and cytoskeleton in the functions of adrenocortical cells. *Recent Res. Devel. Endocrinol*. 2004 4: 115-140.

EXPRESSION ET SIGNALISATION DES INTÉGRINES DES CELLULES GLOMÉRULÉES DE LA GLANDE SURRÉNALE DE RAT : IMPLICATION DE COMPOSANTES DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE, D'HORMONES ET DE CANAUX IONIQUES.

Par

Shirley Campbell

RÉSUMÉ

Les intégrines sont des protéines transmembranaires formées d'une sous-unité alpha (α) et d'une sous-unité bêta (β). La liaison des intégrines à leurs ligands (les protéines de la matrice extracellulaire) active des voies de signalisation intracellulaire menant, entre autre, à la prolifération, à la migration et à la survie cellulaire. Parmi les composantes de la matrice extracellulaire (MEC), les plus étudiées, notons les collagènes, les laminines et les fibronectines. Suite aux résultats obtenus lors de ma maîtrise montrant l'activation de la voie p42/44^{mapk} et une augmentation de calcium intracellulaire suite à l'activation des certaines intégrines des cellules glomérulée de la glande surrénale de rat, le premier but de mon projet de doctorat était de vérifier la présence de différentes composantes de la MEC et des intégrines dans la glande surrénale de rat adulte. Des expériences d'immunofluorescence directe, indirecte et d'immunohistochimie ont permis d'identifier la distribution des collagène de type I (Col I) et de type IV (Col IV), ainsi que celle de la laminine-1 (LN-1) et de la fibronectine (FN) dans la glande surrénale de rat adulte. Les intégrines qui leur sont associées: $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha5\beta1$ et $\alpha8\beta1$ ont

aussi été localisées. La sous-unité $\alpha 1$ est surtout localisée au niveau de la médullosurrénale et les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ sont exprimées majoritairement au niveau du cortex surrénalien. La sous-unité $\alpha 8$ est retrouvée à la fois au niveau du cortex et de la médulla. Un deuxième objectif était de déterminer la capacité des cellules glomérulées à produire leur propre matrice extracellulaire. Des études de RT-PCR, d'immunobuvardage de type Western et d'immunocytochimie ont montré que les cellules glomérulées sécrètent les Col I et Col IV, de la LN-1 et de la FN, ces composantes restant intimement liées aux cellules. L'implication de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans l'arrangement de la FN par et autour des cellules glomérulées a été testée à l'aide d'un anticorps anti- $\alpha 5\beta 1$. Les résultats préliminaires indiquent que l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est non essentielle à l'arrangement de la FN par les cellules glomérulées. Les effets d'un traitement à l'angiotensine II (Ang II) sur la production de FN par les cellules glomérulées ont aussi été testés par immunocytochimie et immunobuvardage. Aucun changement dans la sécrétion et l'organisation de la FN n'a été décelé suite au traitement avec cette hormone. Des études d'immunocytochimie ont aussi montré que les cellules glomérulées étaient aptes à sécréter du Col I et Col IV ainsi que de la LN-1. Par la technique de double immunofluorescence indirecte et directe, nous avons montré que la LN-1 et la FN étaient sécrétées à la surface des cellules à proximité les unes des autres.

Suite à de précédents travaux montrant une relâche de calcium intracellulaire dans les cellules glomérulées ainsi qu'un influx calcique après activation des intégrines par la FN, nous avons étudié la présence potentielle de canaux TRPC (transient receptor potential classical) dans les cellules glomérulées. Ces canaux sont des canaux cationiques non sélectifs permettant un influx de sodium, calcium et de césium. Des expériences d'immunohistochimie ont montré la présence de TRPC1, 3, 4 et TRPC6

dans la glande entière de surrénale de rat. Des études d'immunocytochimie ont permis de montrer que les cellules glomérulées expriment les canaux TRPC3 et TRPC6 à la membrane plasmique et que pour TRPC6, la translocation à la membrane plasmique est modulée par différents stimuli tels que l'Ang II (angiotensine II) ($5 \times 10^{-7}M$), l'OAG (1-oleoyl-2-acétylglycérol) ($100 \mu M$) et la TG (Thapsigargine) ($2 \mu M$). Des mesures de calcium intracellulaire ont montré que les canaux TRPC sont activés suite à la stimulation des cellules glomérulées par la FN ($10^{-7}M$) et l'Ang II ($5 \times 10^{-7}M$). Ces expériences ont montré une entrée de strontium et de calcium suite à l'activation des intégrines par la FN. Finalement, des expériences préliminaires indiquent que la stimulation des cellules glomérulées avec de l'OAG ($100 \mu M$) augmente la sécrétion d'aldostérone. Ensemble, ces expériences laissent croire que l'influx de calcium induit par l'activation des intégrines par la FN pourrait être dû à l'activation des canaux TRPC et ainsi, contribuer à la sécrétion de stéroïdes par les cellules glomérulées.

1. INTRODUCTION

1.1. LES INTÉGRINES

L'interaction des cellules avec leur environnement (matrice extracellulaire ou MEC) s'effectue par de nombreuses protéines membranaires, dont les molécules d'adhésion. Parmi celles-ci, notons les cadhérines, les immunoglobulines, les sélectines et les intégrines (Juliano 2002). Les intégrines sont des protéines transmembranaires composées de deux sous-unités : alpha (α) et bêta (β) (pour revue, voir (Albelda et Buck 1990; Hynes 1992; Sastry et Horwitz 1993; Sonnenberg 1993; Aplin et al. 1998; Giancotti 2000; Humphries 2000)). Il existe 8 sous-unités β et 18 sous-unités α qui, en s'associant, forment plus de 24 isoformes d'intégrines chez l'homme (Hynes 2002). Le tableau 1 illustre quelques isoformes retrouvées jusqu'à maintenant et ceci, en fonction de leurs ligands et des séquences qu'elles reconnaissent sur ceux-ci (Mizejewski 1999; Hynes 2002). Le premier rôle décrit des intégrines a été leur habilité à promouvoir l'adhésion cellulaire (Albelda et Buck 1990; Cheresh 1992; Hynes 1992; Bosman 1993). Depuis maintenant quelques années, il est bien établi que l'activation des intégrines par les composantes de la MEC induit plusieurs voies de signalisation intracellulaire conduisant à la prolifération, à la différenciation et à la survie cellulaire (Haack et Hynes 2001; Vacca et al. 2001), pour revue, voir: (Schwartz 1992; Giancotti 1997; Giancotti 2000; Schwartz et Assoian 2001).

1.1.1. Structure des intégrines

La plupart des isoformes d'intégrines sont composées d'une grande région extracellulaire (environ 1200 acides aminés pour la sous-unité α et 800 acides aminés pour la sous-unité β) et d'une région intracellulaire généralement courte (environ 50 acides aminés) (Albelda et Buck 1990; Hynes 1992; Sastry et Horwitz 1993; Green et al. 1998) (Figure 1). Cependant, une particularité existe pour la sous-unité $\beta 4$ qui renferme plus de 1000 acides aminés dans sa portion intracellulaire (Green et al. 1998). Les sous-unités α et β sont reliées entre elles par des liens non covalents, puisque l'utilisation de détergents ioniques est suffisante pour dissocier les deux sous-unités (Humphries 2000). En raison des modifications post-transcriptionnelles, la structure de certaines sous-unités varie selon le type cellulaire qui l'exprime (Sonnenberg 1993). Toutes les sous-unités d'intégrines sont glycosylées et différents types de glycosylation, qui dépendent des types cellulaires, amènent une variation de la structure et de la fonction des intégrines (Sonnenberg 1993; Gu et Taniguchi 2004). La diversité dans la structure des intégrines peut aussi être engendrée par des processus protéolytiques de la sous-unité α en chaînes lourdes et légères (Sonnenberg 1993). Il est maintenant connu que l'épissage alternatif des transcrits primaires est un autre mécanisme par lequel différents variants des sous-unités d'intégrines peuvent être générés (Sonnenberg 1993; Giancotti 2000; van der Flier et Sonnenberg 2001; Armulik 2002). Les deux sous-unités sont essentielles à la liaison au ligand (Mizejewski 1999; Humphries et al. 2004). Plusieurs sous-unités α sont en mesure de lier la même sous-unité β (Tableau 1). Ainsi, c'est la sous-unité α qui détermine la spécificité de la liaison au ligand.

Intégrines	Ligands	Sites de reconnaissance
$\alpha 1\beta 1$	LN, Col	YIGSR, RHDS
$\alpha 2\beta 1$	Col, PTL, LN, cellules-cellules	DGEA, RHDS
$\alpha 3\beta 1$	FN, Col, INV, $\alpha 2\beta 1, \alpha 3\beta 1$	RGD
$\alpha 4\beta 1$	FN, VCAM-1	EILDV, IDAPS, REDV
$\alpha 5\beta 1$	FN, INV, PLT	LDV, RGD , PHSRN
$\alpha 6\beta 1$	LN, INV, PLT, EPL	VIGSR?
$\alpha 7\beta 1$	LN	VGVPAG, YIGSR
$\alpha 8\beta 1$	BAL, TEN	IGD, LDV, IDA
$\alpha 9\beta 1$	MER, TEN	IGD, LDV, IDA
$\alpha V\beta 1$	FN, VTN	RGD
$\alpha 1\beta 2$	ICAM	KELLPGNNRKY
$\alpha V\beta 3$	BSP, FIB, VTN, FN	RGD , RYD
$\alpha 6\beta 4$	LN, KAL, MER	VGVPAG?, YIGSR?
$\alpha V\beta 5$	VTN, FN, PBP, TAT	RGD
$\alpha V\beta 6$	FN	RGD
$\alpha 4\beta 7$	FN, VCAM, MADCAM	EILDV

Tableau 1. Membres de la superfamille des intégrines. Abréviations : BAL = lame basale; BSP = sialoprotéine osseuse; Col = collagène; EPL = épiligrine; FIB = fibrinogène; FN = fibronectine; KAL= kallikreine; ICAM = molécule d'adhérence intercellulaire; INV= invasine; LN = laminine; MADCAM = mucosal adherens in cell adhesion molecules; MER = merosine; PBP = base du penton de l'adénovirus; PLT = plaquettes; TAT = protéine tat du HIV; TEN = tenascine; VCAM = molécule d'adhérence des cellules vasculaires; VNT = vitronectine (modifié de Mizejewski, 1999).

1.1.1.1. Sous-unité alpha

La sous-unité α est composée d'une grande partie extracellulaire contenant sept domaines répétitifs homologues formant une structure en hélice- β , une région

transmembranaire unique et une région intracellulaire courte (Sonnenberg 1993; Gonzalez-Amaro et Sanchez-Madrid 1999). Dans le cas de certaines sous-unités α , une petite région transmembranaire (chaîne légère) reste liée à la partie extracellulaire (chaîne lourde) par un pont disulfure (Fig.1) (Mizejewski 1999). La sous-unité α contient de trois à quatre sites de liaison à des ions calcium (Ginsberg et al. 1990; Sonnenberg 1993; Loftus et al. 1994). Le rôle de ces sites de liaison sera discuté plus loin. En plus de ces domaines de liaison aux cations, certaines sous-unités α possèdent un domaine d'insertion (inserted domain), appelé domaine I (I-domain) ou domaine A (A-domain) (Plow et al. 2000) formant des motifs MIDAS (« metal ion-dependent adhesion site »). Le domaine I est formé de sept hélices regroupées autour d'un feuillet- β . Le rôle physiologique de ces cations est encore inconnu, mais ces derniers semblent être importants dans les différents états d'activation des intégrines. Les sous-unités α possèdent une certaine homologie dans leur séquence d'acides aminés, mais celle-ci est moindre par rapport aux sous-unités β (D'Souza et al. 1991).

1.1.1.2. Sous-unité bêta

Les sous-unités β des intégrines sont formées par une grande région extracellulaire contenant 48-56 résidus de cystéine, la plupart étant regroupés en quatre domaines répétitifs. Ces quatre domaines riches en cystéines sont reliés par des liens disulfures internes (Figure 1) (Sonnenberg 1993; Mizejewski 1999). La sous-unité β contient un domaine I similaire à celui des sous-unité α (« I-like domain ») (Leitinger et al. 2000). Les sous-unités β possèdent une homologie d'environ 40% dans leur séquence d'acides aminés et les domaines de résidus cystéines font partie des régions contenant le plus de similarité (D'Souza et al. 1991). Certaines sous-unités β telles que $\beta 1$, $\beta 3$ et $\beta 4$ peuvent subir de l'épissage alternatif dans la région cytoplasmique, ce qui pourrait jouer un rôle

dans la régulation de la signalisation par les intégrines (Green et al. 1998). Ainsi, la sous-unité $\beta 1$ comporte 4 membres : $\beta 1A$, $\beta 1B$, $\beta 1C$ et $\beta 1D$ ayant des rôles différents dans la signalisation intracellulaire (Giancotti 2000; Armulik 2002).

1.1.1.3. Domaine de liaison aux cations et aux ligands

Chaque hétérodimère d'intégrines contient trois à cinq sites de liaison à des cations ayant une affinité relativement faible (μM^{-1} à mM^{-1}) (Plow et al. 2000). Collectivement, ces cations divalents peuvent agir soit comme effecteurs, facilitant la liaison au ligand ; soit comme antagonistes, en inhibant la liaison du ligand ; mais aussi en tant que modulateurs, pouvant changer la spécificité de liaison au ligand (Plow et al. 2000). La liaison des intégrines à leurs ligands est généralement stimulée par le Mg^{2+} et le Mn^{2+} et inhibée par les ions Ca^{2+} , comme il a été initialement montré chez l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Gailit et Ruoslahti 1988). Des analyses de séquences primaires suggèrent la possibilité de quatre types de régions possibles sur lesquelles des cations divalents pourraient se lier ; a) le domaine αA (ou domaine I), situé sur la sous-unité α ; b) le domaine βA (I-like domain), situé sur la sous-unité β ; c) des séquences EF-hand-like dans une hélice- β de la sous-unité α (un motif de liaison au ions divalents composé de 13 résidus, semblable à celui retrouvé dans la calmoduline) et ; d) un site dans le cœur central de l'hélice- β de la sous-unité α (Humphries 2000). Ces motifs sont désignés comme des sites d'adhésion dépendants d'ions métalliques (metal ion-dependent adhesion site, MIDAS) (Humphries 2000; Plow et al. 2000). La cristallisation de la structure des domaines- αA a établi la présence d'un site de liaison aux cations dans ce module (Humphries 2000). Un motif semblable est aussi retrouvé dans les domaines- βA . Des études *in silico* ont illustré que les séquences EF-hand-like pouvaient lier les cations (Tuckwell et al. 1992). Malgré la forte influence des ions divalents sur l'adhésion

cellulaire et la liaison du ligand aux intégrines, l'information sur le rôle actuel des sites de liaisons aux ions reste limitée. Cependant, il existe des informations claires chez les ostéoclastes. Les ostéoclastes adhèrent à la surface de l'os par les intégrines $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ et l'adhésion à la surface osseuse doit être régulée étroitement afin de prévenir la résorption excessive (Ross et al. 1993). Lorsque l'os minéralisé se résorbe, la concentration de Ca^{2+} libre devient élevée, ceci induit le détachement des ostéoclastes et la résorption cesse.

Bien que les intégrines puissent effectuer des liaisons homophiliques (intégrine-intégrine), les principaux ligands des intégrines sont les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) (Hynes 1992).

1.2. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

La matrice extracellulaire (MEC) est un réseau structuré en trois dimensions composé de protéines de structure et d'adhésion, de substance fondamentale, mais aussi de sels et d'eau. La MEC constitue un soutien aux tissus et permet le maintien de l'intégrité cellulaire et tissulaire. Loin d'être statique ou inanimée, la MEC est sans cesse en réorganisation. Parmi les protéines de structure les plus importantes, notons les Cols et les laminines. La FN constitue la protéine d'adhésion la plus étudiée (pour revue, voir (Mosher 1984; Pankov et Yamada 2002)). La sécrétion et le remodelage des éléments de la MEC sont effectués par les cellules intimement liées à celle-ci, souvent les fibroblastes (Stefanovic et al. 2005; Berthod et al. 2006; Qi et al. 2006).

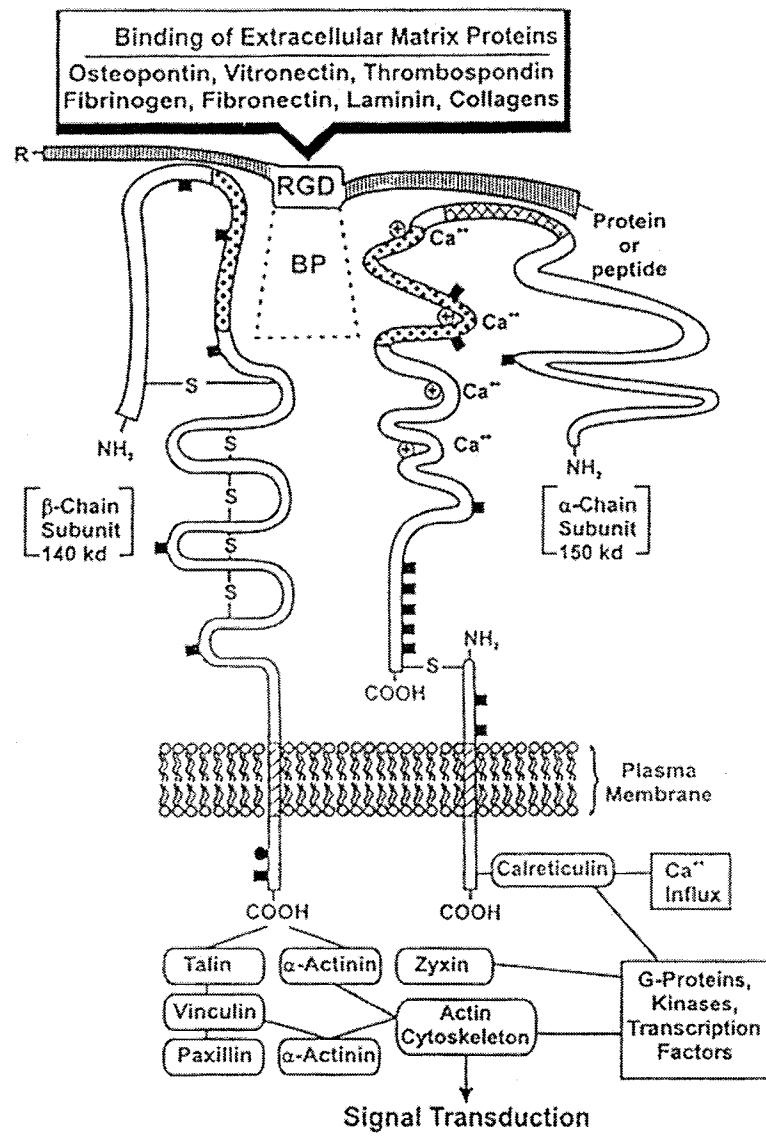


Figure 1. Schéma représentatif d'un hétérodimère d'intégrines. Les chaînes α et β sont reliées entre elles par des liaisons non-covalentes. Les deux sous-unités possèdent une grande portion extracellulaire et généralement une petite portion intracellulaire. Les deux sous-unités sont responsables de la liaison au ligand; l'hypothèse d'une région de liaison (binding pocket) a été proposée. Abréviations : COOH = extrémité carboxy-terminale; NH₂ = extrémité amino-terminale; BP = binding pocket; RGD = Arg-Gly-Asp ; Ca²⁺ = sites de liaison aux cations divalents tels que calcium, manganèse ou magnésium; S = pont disulfure; carrés noirs= sites de glycosylation ; ronds noirs = sites de phosphorylation (Tiré de (Mizejewski 1999)).

1.2.1. Les Collagènes

1.2.1.1. Structure

Les Cols sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères où ils représentent plus de 25 % des protéines totales. Jusqu'à présent, 27 isoformes de Cols ont été décrites et celles-ci peuvent être classées selon différents groupes. Jadis, on retrouvait les Cols fibrillaires, non-fibrillaires et les Cols associés aux fibrilles. Les Cols peuvent désormais être classés en : Cols fibrillaires (90% de tous les Cols), Cols associés aux fibrilles (FACIT), Cols formant des réseaux, Cols formant des fibrilles d'ancrage, Cols transmembranaires, Cols des membranes basales et les autres Cols avec fonction unique (Tableau 2) (Aumailley et Gayraud 1998; Bosman et Stamenkovic 2003). Les isoformes les plus communes sont le Col I et IV. Le Col I est retrouvé dans les tendons, les ligaments, la peau, les os et les cartilages (Birk et al. 1988; Mayne 1989; Gelse et al. 2003). Le Col IV est essentiellement retrouvé dans les membranes basales (Prockop et Kivirikko 1995; Ottani et al. 2001; Bosman et Stamenkovic 2003; Gelse et al. 2003). En plus des 20 isoformes décrites, la complexité et la variété de Cols sont de plus augmentées par la présence de variants d'épissage (Ryan et Sandell 1990; Elamaa et al. 2003).

Les Cols sont formés par la liaison de trois sous-unités alpha (α) selon un mécanisme encore peu connu. Les chaînes α peuvent être identiques (homotrimères) comme dans le cas des Cols II, III, VII et X ou différentes pour former des hétérotrimères tels que les Cols I et IV (Aumailley et Gayraud 1998). Toutes les isoformes de Cols sont caractérisées par la présence de répétitions du triplet (Gly-X-Y) $_n$ (X étant fréquemment la proline et Y l'hydroxyproline) dans la séquence d'acides aminés menant à la formation de la triple hélice de Col (Figure 2) (van der Rest et Garrone 1991; Aumailley

et Gayraud 1998; Hulmes 2002). Cette portion (Gly-X-Y) constitue le domaine « collagenous » de la protéine. En plus de la région (Gly-X-Y) caractéristique des Cols, d'autres portions sont aussi essentielles à leur formation. Ainsi, des domaines « non-collagenous » (exempts de répétions (Gly-X-Y)) sont retrouvés de part à d'autre de la région « collagenous ». Le C-propeptide participerait à la formation de la triple-hélice et le N-propeptide pourrait intervenir dans la régulation du diamètre des fibrilles (Hulmes 2002). D'autres régions, telles que les télépeptides pourraient être impliquées dans la formation de lien entre différents Cols et aussi à d'autres molécules de la matrice environnante (Lucic et al. 2003; Malone et al. 2004; Malone et Veis 2004). De façon plus précise, le Col de type I, appartenant à la famille des Cols formant des fibrilles, est formé par des hétérotrimères ; deux chaînes $\alpha 1(I)$ identiques et une chaîne $\alpha 2(I)$. Dans le cas du Col de type IV, le Col des membranes basales, la structure est caractérisée par trois domaines distincts ; le domain 7S N-terminale, le domain globulaire C-terminal (NC1) et son hélice centrale dans laquelle des interruptions de la séquence (Gly-X-Y) permettant une flexibilité de la protéine (Silver et al. 2002). Six sous-unités de chaîne pouvant former le Col de type IV ont été identifiées : $\alpha 1(IV)$ à $\alpha 6(IV)$. Plusieurs combinaisons sont ainsi possibles, mais notons la forme prédominante des membranes basales : $\alpha 1(IV)_2\alpha 2(IV)$.

Type	Chains	Molecular composition
Fibril-forming collagens		
I	$\alpha_1(\text{I}), \alpha_2(\text{I})$	$[\alpha_1(\text{I})]_2\alpha_2(\text{I})$
II	$\alpha_1(\text{II})$	$[\alpha_1(\text{II})]_3$
III	$\alpha_1(\text{III})$	$[\alpha_1(\text{III})]_3$
V	$\alpha_1(\text{V}), \alpha_2(\text{V}), \alpha_3(\text{V})$	$[\alpha_1(\text{V})]_2\alpha_2(\text{V}) [\alpha_1(\text{V})\alpha_2(\text{V})\alpha_3(\text{V})]$
XI	$\alpha_1(\text{XI}), \alpha_2(\text{XI}), \alpha_3(\text{XI})$	$[\alpha_1(\text{XI})\alpha_2(\text{XI})\alpha_3(\text{XI})]$ and chimers between $\alpha(\text{V})$ and $\alpha(\text{XI})$
Basement membrane collagens		
IV	$\alpha_1(\text{IV}), \alpha_2(\text{IV})$ $\alpha_3(\text{IV}), \alpha_4(\text{IV})$ $\alpha_5(\text{IV}), \alpha_6(\text{IV})$	$[\alpha_1(\text{IV})]_2\alpha_2(\text{IV})$? ?
FACIT		
IX	$\alpha_1(\text{IX}), \alpha_2(\text{IX}), \alpha_3(\text{IX})$	$[\alpha_1(\text{IX})\alpha_2(\text{IX})\alpha_3(\text{IX})]$
XII	$\alpha_1(\text{XII})$	$[\alpha_1(\text{XII})]_3$
XIV	$\alpha_1(\text{XIV})$	$[\alpha_1(\text{XIV})]_3$
XVI	$\alpha_1(\text{XVI})$	$[\alpha_1(\text{XVI})]_3$
XIX	$\alpha_1(\text{XIX})$?
Multiplexins		
XV	$\alpha_1(\text{XV})$?
XVIII	$\alpha_1(\text{XVIII})$?
Orphans		
VI	$\alpha_1(\text{VI}), \alpha_2(\text{VI}), \alpha_3(\text{VI})$	$[\alpha_1(\text{VI})\alpha_2(\text{VI})\alpha_3(\text{VI})]$
VII	$\alpha_1(\text{VII})$	$[\alpha_1(\text{VII})]_3$
VIII	$\alpha_1(\text{VIII}), \alpha_2(\text{VIII})$	$[\alpha_1(\text{VIII})]_2\alpha_2(\text{VIII})$
X	$\alpha_1(\text{X})$	$[\alpha_1(\text{X})]_3$
XIII	$\alpha_1(\text{XIII})$?
XVII	$\alpha_1(\text{XVII})$	$[\alpha_1(\text{XVII})]_3$

Tableau 2. Membres de la superfamille des collagènes. (Tiré de (Aumailley et Gayraud 1998)).

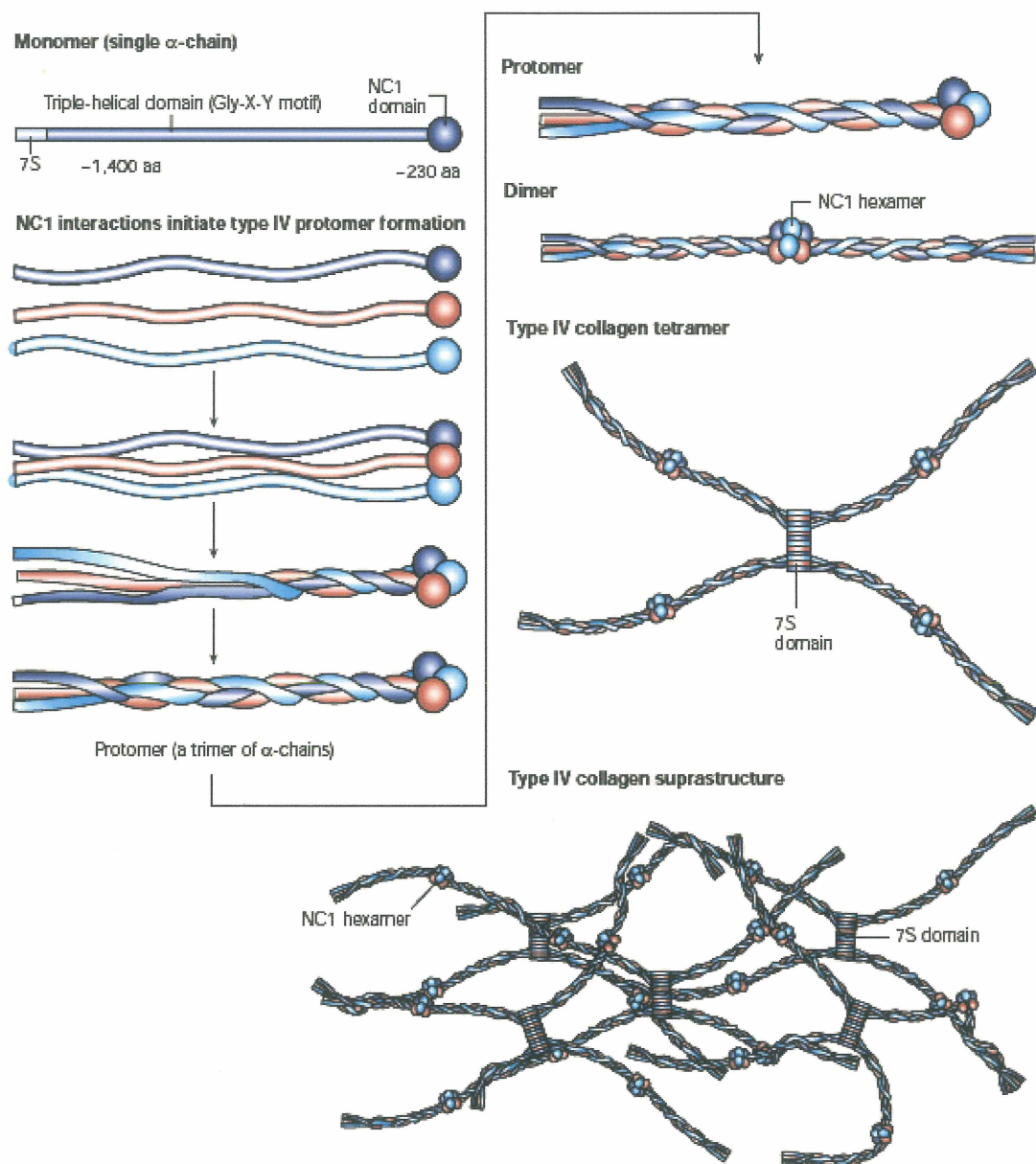


Figure 2. Formation de la suprastructure formée par le collagène de type IV. (Tiré de (Kalluri 2003)).

1.2.1.2. Biosynthèse et formation de la matrice de collagènes

Plusieurs types cellulaires sont en mesure de produire et de sécréter différentes isoformes de Col dans leur milieu. Par exemple, les fibroblastes de la peau sécrètent du Col de type I et III (Chan et al. 1990) et les chondrocytes sécrètent du Col II (Muir 1995; Oesser et Seifert 2003). La transcription des gènes des Cols peut être initiée par différents stimuli; entre autres, le TGF- β (« Transforming Growth Factor beta ») (Ignatz et Massague 1986; Roberts et al. 1986) et l'IGF (« insulin-like growth factor ») (Granot et al. 1991). Suite à la transcription des différentes chaînes α (pré-pro-Col), celles-ci s'assemblent dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) sous forme de pro-Col. Dans l'appareil de Golgi, les molécules subissent plusieurs modifications post-transcriptionnelles (hydroxylation des résidus proline et lysine, glycosylation). Après l'assemblage des triples hélices, les pro-Cols sont emmagasinés dans des vésicules de sécrétion de l'appareil de Golgi et sont ensuite sécrétés. La portion C-propeptide est clivée par les pro-Cols C-proteinases et le N-propeptide est clivé par des pro-Cols N-proteinases, enzymes appartenant à la famille des métalloprotéinases (Figure 3) (Kadler et al. 1996; Hulmes 2002).

Les Cols de la famille de Cols fibrillaires (Col I, II, III, V, XI) s'assemblent de façon spontanée afin de former des structures fibrillaires. Cette caractéristique naît de par leur structure, qui permet des interactions hydrophobes et électrostatiques entre les monomères de Cols, mais aussi entre les molécules (Li et al. 2003; Keresztes et al. 2006). De plus, les liens covalents viennent accroître la stabilité des fibrilles de Cols. Généralement, le réseau de Col est formé par plusieurs types de Cols, ainsi, la peau est constituée de Col I et II et le cartilage de fibrilles de Col de type II et XI (Canty et Kadler 2005). La P4Hs (Collagen prolyl 4-hydroxylases) est une enzyme ayant un rôle primordial à la biosynthèse des Cols, car les résidus 4-hydroxyproline sont essentiels à

la formation de la triple hélice (Myllyharju 2003). La formation de la supra structure formée par le Col IV a été revue récemment (Figure 2) (Kalluri 2003).

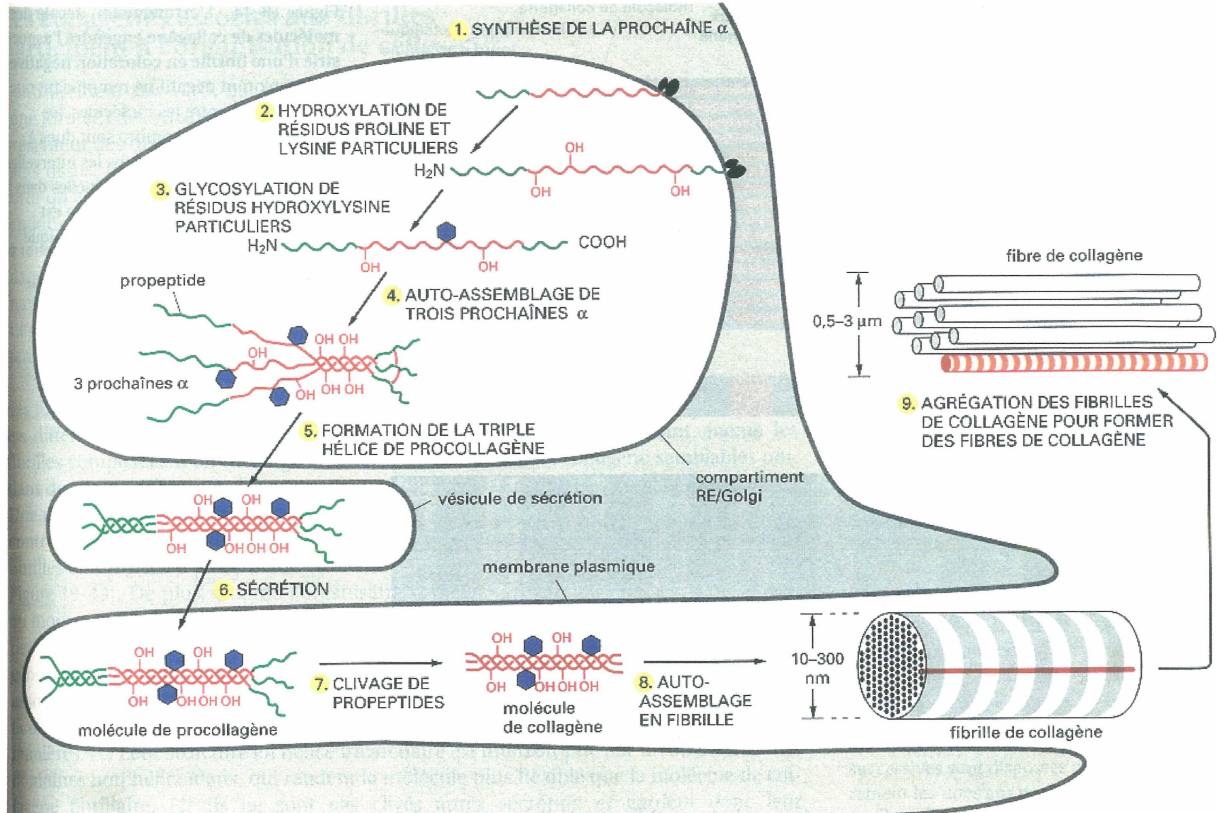


Figure 3. Synthèse du collagène. (Tiré de (Alberts et al. 1994)).

1.2.1.3. Intégrines liant les collagènes

Une caractéristique importante des Cols est leur capacité de se lier aux cellules par des intégrines spécifiques. Il a été montré que les intégrines $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$ et $\alpha\nu\beta1$ peuvent lier les Cols par différents sites de reconnaissance (Tableau 1) (Gonzalez-Amaro et Sanchez-Madrid 1999; van der Flier et Sonnenberg 2001; White et al. 2004).

1.2.2. Les laminines

1.2.2.1. Structure

Les LNs forment un gros complexe (environ 800 kDa) flexible constitué de trois longues chaînes polypeptidiques nommées alpha (α), bêta (β) et gamma (γ) (Tunggal et al. 2000; Miner et Yurchenco 2004). Cinq chaînes α ($\alpha1$ – $\alpha5$), trois β ($\beta1$ – $\beta3$), et deux γ ($\gamma1$ – $\gamma2$) ont été clonées et séquencées (Aumailley et Gayraud 1998). Ces chaînes sont disposées en forme de croix asymétrique (un bras long et deux bras courts) (Figure 4) et sont unies par des ponts disulfures formant plus de 12 types de LN (Bosman et Stamenkovic 2003). Toutes les chaînes formant les LNs possèdent des régions communes, parmi elles, des domaines globulaires (domaines G), impliqués dans la polymérisation des chaînes. Les domaines G, retrouvés en C-terminal, sur les chaînes $\alpha1$ de la LN- I, confèrent à la chaîne α environ 400 kDa, comparativement à 200 kDa pour les chaînes $\beta1$ et $\gamma1$ (Tunggal et al. 2000). Ces grands domaines globulaires en C-terminal sont aussi responsables de la liaison à d'autres composantes de la MEC, mais aussi aux intégrines (Aumailley et Gayraud 1998; Colognato et Yurchenco 2000; Ghosh et Stack 2000; Hohenester et Engel 2002). D'autres domaines sont aussi présents dans les différentes chaînes ; 1) des domaines I et II forment des hélices- α pouvant intervenir

dans l'assemblage des molécules de LNs, 2) le domaine B qui est spécifique à la chaîne β , 3) les domaines III et V au rôle peu connu, mais possédant des répétitions « epidermal growth factor-like » contenant les domaines de liaison au nidogen (Bosman et Stamenkovic 2003; Kalluri 2003) (c'est le nidogen qui permet l'interaction des LNs avec le Col IV dans la formation des membranes basales); 4) le domaine IV peu caractérisé et finalement; 5) le domaine VI présent dans les bras courts des LNs. Les chaînes β et γ partagent des similarités avec les chaînes α , mais ne contiennent aucun domaine G.

Avec le Col IV et autres molécules, le rôle majeur des LNs est la constitution des lames basales de différents tissus. Toutefois, les LNs sont aussi impliquées dans l'adhésion cellulaire, la migration et la différenciation cellulaire (Timpl et Brown 1996; Bosman et Stamenkovic 2003). Les LNs contiennent des domaines fonctionnels, tels que des domaines liant le Col IV, l'héparane sulfate, l'entactine ainsi que des domaines liant les récepteurs de la LN, les intégrines (Kalluri 2003).

1.2.2.2. Formation de la matrice de laminine

Tout comme pour les Cols, les LNs sont sécrétées par plusieurs types cellulaires. Les cellules épithéliales (Yang et al. 2004), les cellules de muscles lisses (Stiemer et al. 1993), les cellules de Schwann (Cornbrooks et al. 1983), ainsi que les astrocytes (DiProspero et al. 1997) sont toutes en mesure de produire des LNs. Toutefois, le mécanisme par lequel les différentes chaînes s'associent est peu connu. Les processus post-transcriptionnels, ayant lieu dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi se déroulent probablement de la même façon que pour toutes protéines sécrétées, avec les isoformes des chaînes de LN contenant un signal peptidique de transport pour le transfert au RE. Les chaînes subissent des N- et O- glycosylations, mais le rôle de ces

modifications dans les fonctions biologiques des LNs n'est pas connu (Tunggal et al. 2000).

Suite à leur sécrétion à l'extérieur de la cellule, les molécules de LN s'assemblent en polymère selon un mécanisme d'auto-assemblage similaire aux Cols et faisant intervenir les régions N-terminales des chaînes de la molécule. La polymérisation des molécules de LNs ferait aussi intervenir des récepteurs tels que les intégrines et l' α -dystroglycane (Tunggal et al. 2000). L'incorporation de la LN dans la membrane basale a été récemment décrite (Figure 5) (Kalluri 2003).

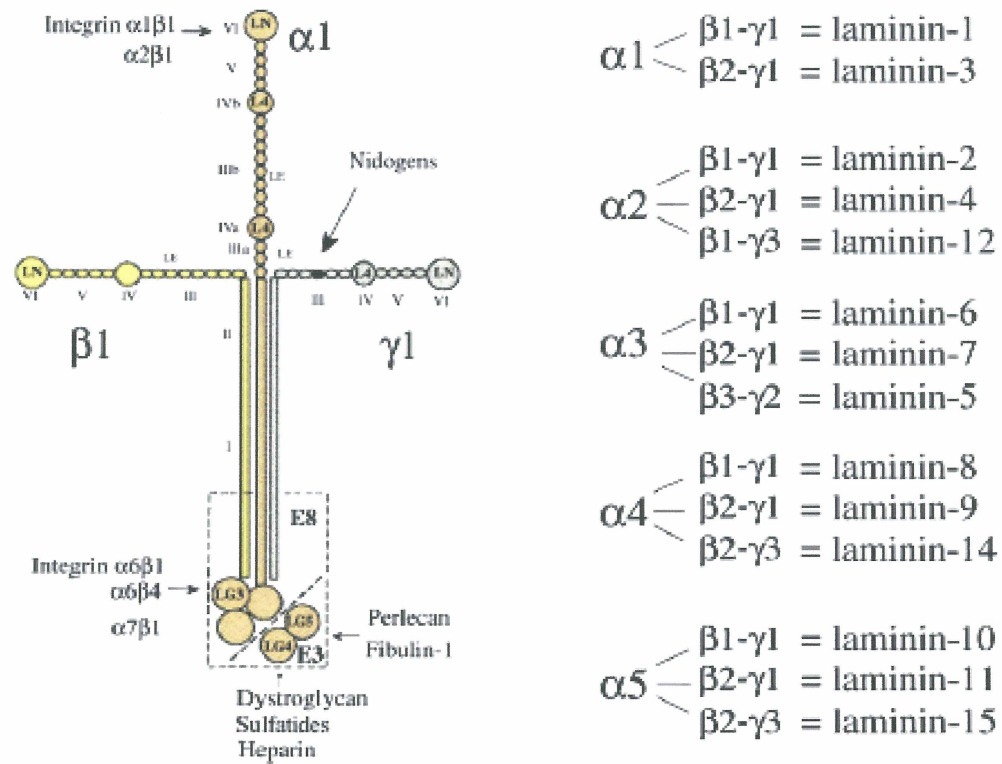


Figure 4. Structure des laminines. Les LNs sont composées de trois chaînes s'associant pour former une structure en forme de croix. Les domaines fonctionnels, retrouvés sur les différentes chaînes, sont responsables de la liaison aux intégrines, ou à d'autres molécules de la matrice extracellulaire. (Tiré de (Ekblom et al. 2003)).

1.2.2.3. Intégrines liant les laminines

Les intégrines liant les LNs incluent $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$ et $\alpha6\beta4$ (Tableau 1) (pour revue, voir: (Gonzalez-Amaro et Sanchez-Madrid 1999; Mizejewski 1999; van der Flier et Sonnenberg 2001)).

1.2.3. Les fibronectines

La FN existe dans le plasma sous forme soluble et dans la MEC sous forme insoluble (Mosher 1984; Ruoslahti 1988; Aota et Yamada 1995; Romberger 1997). Tout comme la LN, la FN contient des domaines spécifiques pouvant interagir avec d'autres protéines de la MEC ainsi qu'avec les cellules *via* les intégrines (Mosher 1984). On distingue plusieurs isoformes de FN ; l'une, appelée FN plasmatique, est soluble et circule dans le sang et autres fluides du corps. Elle serait associée à l'activation de la coagulation sanguine, la phagocytose et la cicatrisation (Ruoslahti 1988). Les autres isoformes de FN sont assemblées à la surface des cellules et sont déposées dans la matrice extracellulaire en filaments insolubles.

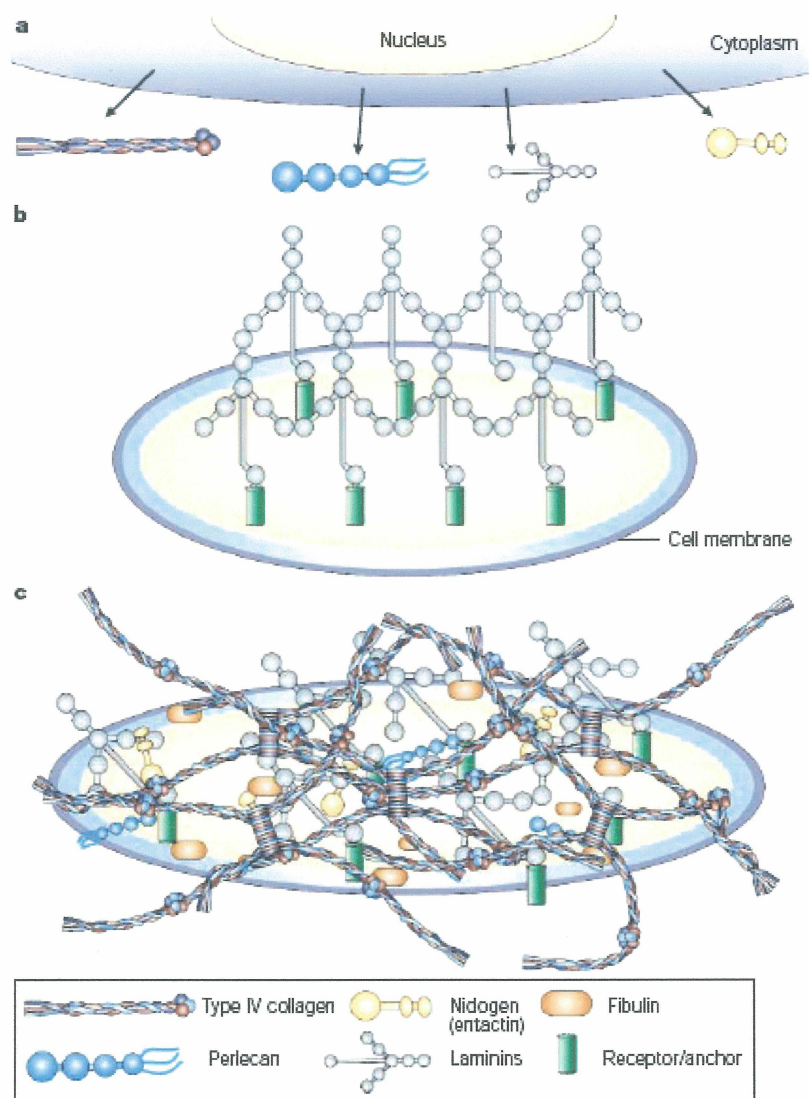


Figure 5. Schéma des étapes de l'incorporation de la laminine dans la membrane basale. Les molécules de LN seraient les premières composantes incorporées dans la MEC et d'autres molécules s'y attacheraient (Tiré de (Kalluri 2003)).

1.2.3.1 Structure

La FN est composée de deux monomères de 200-250 kDa liés par deux ponts disulfures près de leurs extrémités carboxy-terminales (Figure 6). Chaque sous-unité est repliée en une série de domaines globulaires séparés par des segments de chaînes polypeptidiques flexibles. Les domaines sont constitués de modules plus petits, chacun d'eux répété en série et codé par des exons différents, suggérant que le gène de la FN, comme les gènes du Col, a évolué par de multiples duplications d'exons (Ruoslahti 1988). Une molécule de FN contient trois types d'unités de répétition de base : type I, II et III (Johansson et al. 1997; Miyamoto et al. 1998) (Figure 6).

Toutes les isoformes de FN sont codées par un grand gène unique d'environ 50 kilobases et qui contient environ 50 exons de tailles similaires (George et al. 1993). La transcription produit une seule grande molécule d'ARN qui peut subir un épissage alternatif dans trois régions, selon le type cellulaire et le stade de développement (George et al. 1993). On suppose que ce mécanisme d'épissage alternatif permet à la cellule de produire le type de FN requis pour les besoins du tissu (Alberts et al. 1994). Les deux formes majeures étant la FN plasmatique (sécrétée majoritairement par les hépatocytes) retrouvée dans le sang et la forme cellulaire sécrétée par les fibroblastes et autres types cellulaires et qui est déposée dans la matrice extracellulaire (pour une revue récente, voir (Mao et Schwarzbauer 2005)).

1.2.3.2. Domaines de liaison présents sur la fibronectine

Dans plusieurs ligands protéiques, dont la FN, les sites de reconnaissance des intégrines consistent en une courte séquence d'acides aminés, comme par exemple, la séquence peptidique Arginine-Glycine-Aspartate (RGD). Cette séquence a été la première caractérisée (Pierschbacher et Ruoslahti 1984). Elle est présente dans plusieurs

composantes de la matrice, dont la FN, mais la séquence RGD est masquée dans quelques-unes des composantes empêchant l'interaction avec les intégrines (Sonnenberg 1993). Historiquement, des fragments protéolytiques ont été utilisés afin de localiser les sites d'adhésion cellulaire retrouvés chez la FN (Aota et Yamada 1995).

L'unité de répétition de type III de la FN est un motif protéique retrouvé dans plusieurs protéines incluant les récepteurs des hormones de croissance et autres protéines de la matrice extracellulaire comme la ténascine. Le motif RGD correspond approximativement à la dixième unité de cette répétition de type III de la FN (Aota et Yamada 1995). Des peptides synthétiques contenant la séquence RGD peuvent mimer ou inhiber par compétition la propriété d'adhésion cellulaire du domaine RGD de la FN ou autres protéines contenant cette séquence (Gehlsen et al. 1988; D'Souza et al. 1991). Près de la moitié des 24 membres de la famille des intégrines est connue comme pouvant interagir avec la séquence RGD de leurs protéines-cibles, incluant les intégrines $\alpha 5\beta 1$, $\alpha \text{IIb}\beta 3$ et $\alpha \text{v}\beta 3$. Cependant, ces intégrines lient leurs ligands, FN, vitronectine ou fibrinogène avec une affinité et une spécificité différente. Par exemple, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ est le principal récepteur des domaines de liaison de la FN dans plusieurs types cellulaires, mais ne lie que faiblement la vitronectine (Aota et Yamada 1995).

Outre le domaine central de liaison cellulaire (« central cell-binding domain »), contenant la séquence RGD, d'autres domaines de la FN sont aussi responsables de l'adhésion des cellules (Haas et Plow 1994; Kuhn et Eble 1994), tel que le domaine LDV (Leu-Asp-Val) contenu dans la région IIICS (« type III connecting sequence ») produit par épissage alternatif de la FN (Yamada 1991; Aota et Yamada 1995). Cette région IIICS est un autre domaine majeur d'adhésion cellulaire de la FN. Elle peut prendre plusieurs formes, qui originent de différents précurseurs d'ARNm, et ne

contient aucune homologie avec le motif répétitif de type III. De plus, une séquence Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser (EILDVPS) est localisée dans la région CS1 et peut lier l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (Guan et Hynes 1990; Mould et al. 1990). Il a aussi été montré qu'une séquence Arg-Glu-Asp-Val (REDV) de la région CS5 détient une activité de liaison pour l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (Mould et Humphries 1991). Une troisième séquence, Ile-Asp-Ala-Pro-Ser (IDAPS) localisée près de la région de liaison à l'héparine peut aussi reconnaître l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ (Wayner et al. 1989; Mould et al. 1991). Même si le domaine central de la liaison cellulaire de la FN, le plus important pour l'adhésion, permet l'attachement de plusieurs types cellulaires, la région IIIICS peut aussi permettre l'adhésion cellulaire et la migration de types cellulaires, tels que les cellules de la crête neurale et autres cellules impliquées dans la formation du système nerveux central (Dufour et al. 1988; Garcia-Pardo et al. 1990).

Comme il a été mentionné plus haut, la FN, en plus d'interagir avec les cellules, peut se lier à d'autres macromolécules de la matrice extracellulaire. Ainsi, des domaines de liaison à l'héparine, au Col, à la gélatine et à la fibrine sont retrouvés sur la FN (Figure 6) (Mosher 1984; Pankov et Yamada 2002).

1.2.3.3. Formation de la matrice de fibronectine

Comme mentionné précédemment, les macromolécules sont principalement sécrétées par les fibroblastes dans la plupart des tissus conjonctifs. Mais il existe plusieurs types cellulaires aptes à produire la FN. Par exemple, il a été montré que les cellules musculaires lisses (Farhadian et al. 1996), les astrocytes (DiProspero et al. 1997), les cellules de type B (Iwanaga et al. 2000), les cellules du cortex surrénalien (Williams et Allen-Hoffmann 1990), les cellules épithéliales de poulet (Richiert et Ireland 1999) de même que plusieurs lignées cellulaires cancéreuses (Lynagh et al. 2000) peuvent

produire de la FN. De plus, les cellules de Schwann synthétisent de la FN *in vitro* et la déposent en fibrilles dans la matrice après un traitement à l'acide ascorbique (Chernousov et Carey 2000).

Contrairement à d'autres protéines de la MEC (LNs et Cols), la FN ne se polymérise pas spontanément après sa sécrétion dans le milieu extracellulaire. Le processus d'assemblage peut être séparé en deux phases : l'initiation et l'extension, qui sont toutes deux peu connues. Une seule étude rapporte que la croissance des fibrilles s'effectue en une extrémité, suggérant que les fibrilles sont polarisées (Winklbauer et Stoltz 1995). La FN est initialement sécrétée en dimère sous forme soluble et s'assemble subséquentement en fibrilles insolubles à la surface cellulaire (Figure 7). Sous forme soluble, la FN est retrouvée sous une forme compacte dans une conformation ne permettant pas l'assemblage en fibrilles (Wierzbicka-Patynowski et Schwarzbauer 2003). L'activation ou le changement de conformation de la FN semble requérir une interaction avec les récepteurs à la surface cellulaire, généralement l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$. L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ a été la première intégrine impliquée dans le processus. $\alpha 5 \beta 1$ est localisée aux sites où les fibrilles de FN sont en contact avec la cellule (Roman et al. 1989) et l'utilisation d'anticorps contre les sous-unités $\alpha 5$ ou $\beta 1$ peut inhiber l'assemblage de la FN dans des fibroblastes en culture (Fogerty et al. 1990). De plus, la surexpression de la sous-unité $\alpha 5$ dans les cellules CHO (« Chinese Hamster Ovary Cells ») augmente le dépôt de FN dans la matrice (Giancotti et Ruoslahti 1990). Plusieurs régions de la FN sont impliquées dans une ou l'autre des phases de polymérisation, par la liaison à des composants membranaires ou à d'autres molécules de FN. La reconnaissance spécifique de la fibronectin par $\alpha 5 \beta 1$ nécessite la séquence de liaison RGD dans le module III₉, mais aussi la séquence synergique localisée dans le module III₁₀ adjacent. La liaison à la séquence RGD par les intégrines pourrait être

l'évènement initial induisant les réactions subséquentes, possiblement par un changement de conformation de la FN. Plusieurs autres domaines présents sur la FN (section 1.2.3.3) ont aussi un rôle dans l'assemblage de la FN (pour revue, voir (Mao et Schwarzbauer 2005)).

Les intégrines α IIb β 3 et α V β 3 possèdent aussi cette propriété, mais avec une efficacité moins grande que α 5 β 1 (Wu et al. 1995; Wennerberg et al. 1996). L'expression de α v β 1 (Zhang et al. 1993) ou α 4 β 1 dans les cellules CHO ne permet pas l'assemblage de la FN, suggérant que la liaison seule de la FN à la surface de la cellule par les intégrines n'est pas suffisante. Une connexion de la sous-unité β aux filaments d'actine est requise pour la formation de fibrilles de FN à la surface cellulaire (Mautner et Hynes 1977; Wu et al. 1995). L'activité de la protéine Rho est aussi importante dans l'assemblage de la matrice de FN et dans sa dynamique (Wierzbicka-Patynowski et Schwarzbauer 2003).

1.2.3.4. Intégrines liant la fibronectine

L'intégrines α 5 β 1 est une isoforme spécifique pour la FN, mais les intégrines α 3 β 1, α 4 β 1, α x β 2, α v β 3 et α v β 6 peuvent aussi lier la FN (Tableau 1) (Wayner et al. 1989; Guan et Hynes 1990; Mould et al. 1990; Mould et Humphries 1991; Mould et al. 1991); (pour revue, voir: (Sonnenberg 1993; Gonzalez-Amaro et Sanchez-Madrid 1999; Mizejewski 1999; van der Flier et Sonnenberg 2001)).

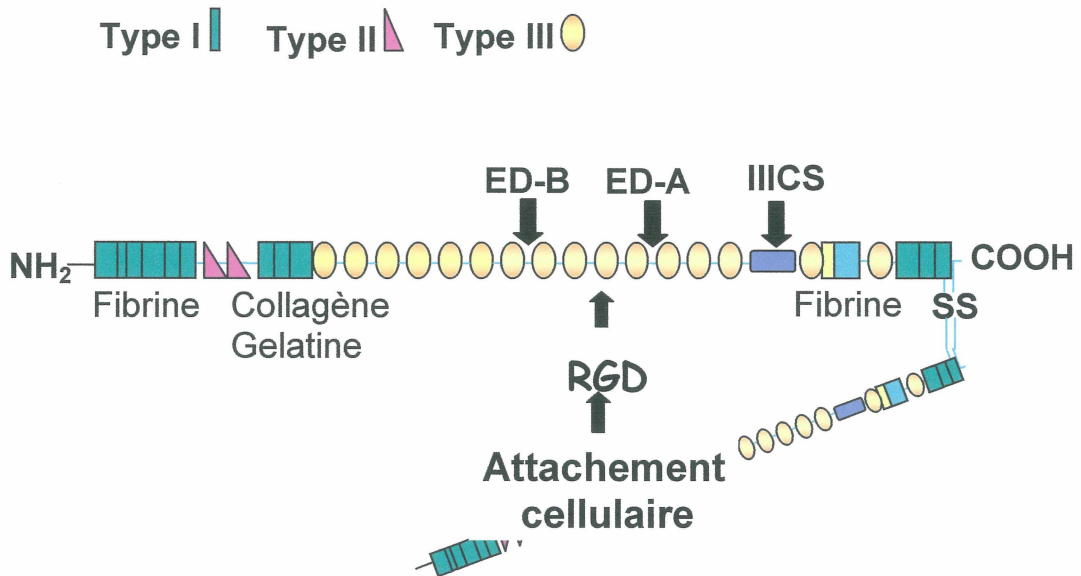


Figure 6. Schéma d'une molécule de fibronectine. La FN comprend trois types de motifs structuraux nommés : types I, II et III. Les domaines de liaison présents sur la FN sont représentés sur le schéma. De l'épissage alternatif peut se produire dans les régions ED-B, ED-A et CS. Le site de liaison cellulaire principal est présent près du centre de la molécule (contient le tripeptide RGD). Un second site de liaison aux cellules est localisé dans une région d'épissage alternatif appelé CS ou V. Abréviations : NH₂ = extrémité amino-terminale; COOH = extrémité carboxy-terminale; SS= ponts disulfures (Modifié de (Miyamoto et al. 1998)).

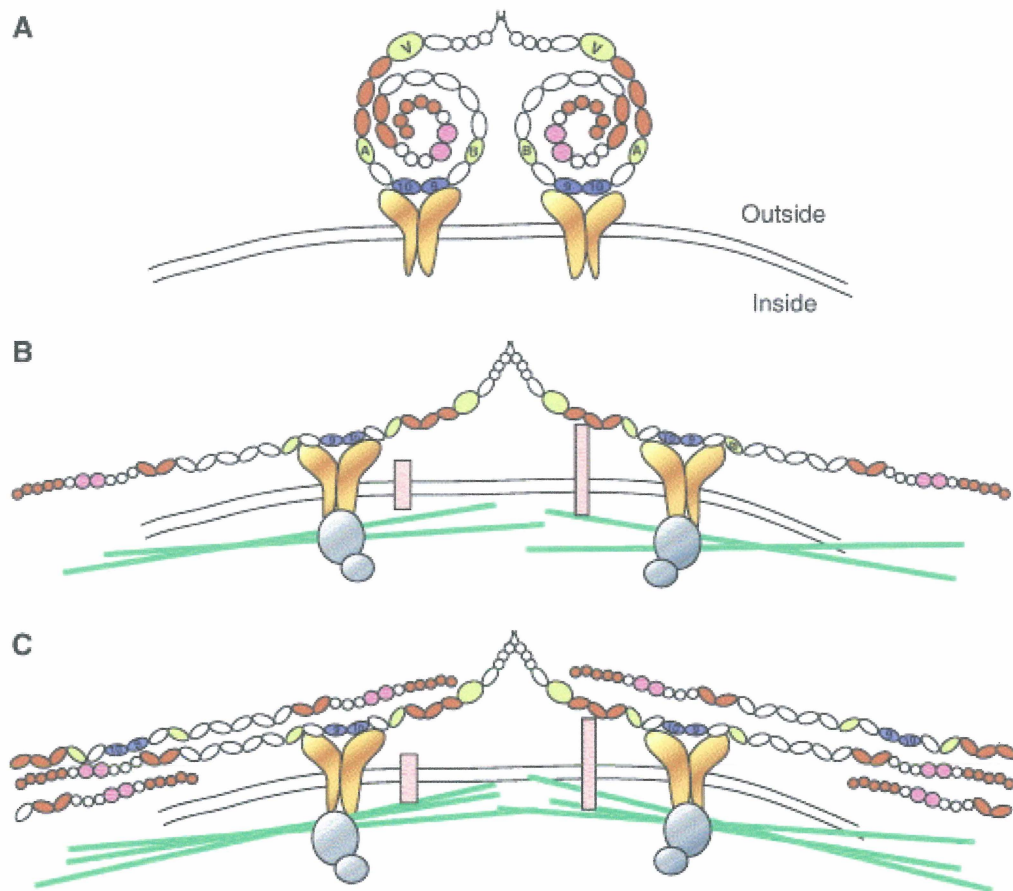


Figure 7. Schéma représentant les étapes présumées de l'assemblage de molécules de fibronectine dans la matrice extracellulaire. A) La FN compacte soluble se lie aux intégrines $\alpha 5 \beta 1$ sur la membrane cellulaire. B) La FN liée aux intégrines et à d'autres récepteurs (barres roses) provoque une réorganisation du cytosquelette d'actine (lignes vertes) et provoque le recrutement de protéines intracellulaires (cercles gris). La contraction de la cellule aide le dépliement de la molécule de FN exposant les domaines de liaison à d'autres molécules. C) Fibrilles formées par les interactions FN-FN (Tiré de (Mao et Schwarzbauer 2005)).

1.3. FORMATION DE POINTS FOCaux ET VOIES DE SIGNALISATION INDUITES PAR L'ACTIVATION DES INTÉGRINES.

En plus de leur rôle dans l'adhésion cellulaire, les intégrines sont responsables de la propagation de signaux intracellulaires dans plusieurs types cellulaires (Schwartz et al. 1995; Aplin et al. 1998; Dedhar 1999; Giancotti 2000). Les intégrines régulent une multitude de fonctions cellulaires telles que la migration (Giancotti et Ruoslahti 1999), la prolifération (Stallmach et al. 2001; Vacca et al. 2001), l'apoptose et l'expression de gènes (LaFlamme et Auer 1996). Il existe deux types de voie de signalisation induite par les intégrines. La première et la plus étudiée est la signalisation induite par l'activation des intégrines par leur ligand extracellulaire (« outside-in »); des signaux extracellulaires provoquent l'activation des intégrines et des cascades de signalisation s'en suivent. Le deuxième type de signalisation (« inside-out ») est toutefois moins connu ; certains signaux intracellulaires peuvent provoquer l'activation des intégrines menant à des changements dans l'adhésion aux ligands (affinité ou avidité) (Felding-Habermann et Cheresch 1993; Schwartz et Denninghoff 1994; Akiyama et al. 1995; Dedhar 1995). La signalisation « inside-out » ne sera pas discutée dans cette thèse, mais pour revue, voir (Hughes et Pfaff 1998; Calderwood et al. 2000; Shattil et Newman 2004; Ginsberg et al. 2005; Kinashi 2005).

1.3.1. Signalisation « outside-in »

1.3.1.1. Intégrines : formation de points focaux

Comme leur nom l'indique, les intégrines jouent un rôle d'intégration entre l'environnement extracellulaire et le milieu intracellulaire. Ce rôle est accompli par de

multiples protéines intracellulaires que lient les intégrines. La signalisation « outside-in » débute par la liaison de composantes de la matrice extracellulaire (ex. FN) aux intégrines qui leur sont spécifiques. Cette liaison provoque un changement de conformation des deux sous-unités d'intégrines (Hato et al. 1998); cette explication reste toutefois hypothétique. L'équipe de Mizejewski (1999) propose l'hypothèse d'une poche de liaison (« binding pocket ») formée par les deux sous-unités des intégrines (Mizejewski 1999). Suite au changement de conformation, la portion intracellulaire de la sous-unité β se lie à différentes protéines du cytosquelette afin de former deux types distincts d'assemblage de protéines : des points d'adhésion focaux (« focal adhesion ») ou des adhésions fibrillaires (Wierzbicka-Patynowski et Schwarzbauer 2003) (Figure 8). Plusieurs protéines se retrouvent dans ces points d'ancrage. La paxilline et la vinculine se retrouvent dans les points d'adhésion focaux, contrairement aux points adhésions fibrillaires qui sont riches en tensine, mais non en paxilline et vinculine (Miyamoto et al. 1995; Guan 1997; Guan 1997; Hanks et Polte 1997; Turner 1998; Cary et Guan 1999; Turner 2000; Wierzbicka-Patynowski et Schwarzbauer 2003; Zaidel-Bar et al. 2004). De plus, ces protéines possèdent des domaines de liaison pouvant interagir avec les microfilaments du cytosquelette, formant ainsi le lien entre les intégrines (et les composantes de la matrice) et le cytosquelette (Schlaepfer et al. 1999). Parmi les protéines les plus étudiées, notons la kinase d'adhésion focale (FAK), pouvant se lier à la paxilline, qui joue aussi un rôle dans la signalisation intracellulaire (Schaller et Parsons 1993; Schlaepfer et Hunter 1998; Defilippi et al. 1999; Giancotti 2000; McLean et al. 2003). La nature des protéines retrouvées dans les points d'adhésion focaux et fibrillaires peut varier selon le type cellulaire, mais aussi selon le type d'intégrines rencontré (Figure 9) (Giancotti 2000).

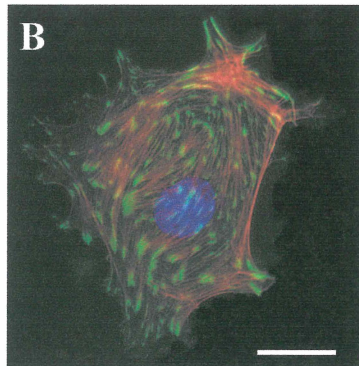
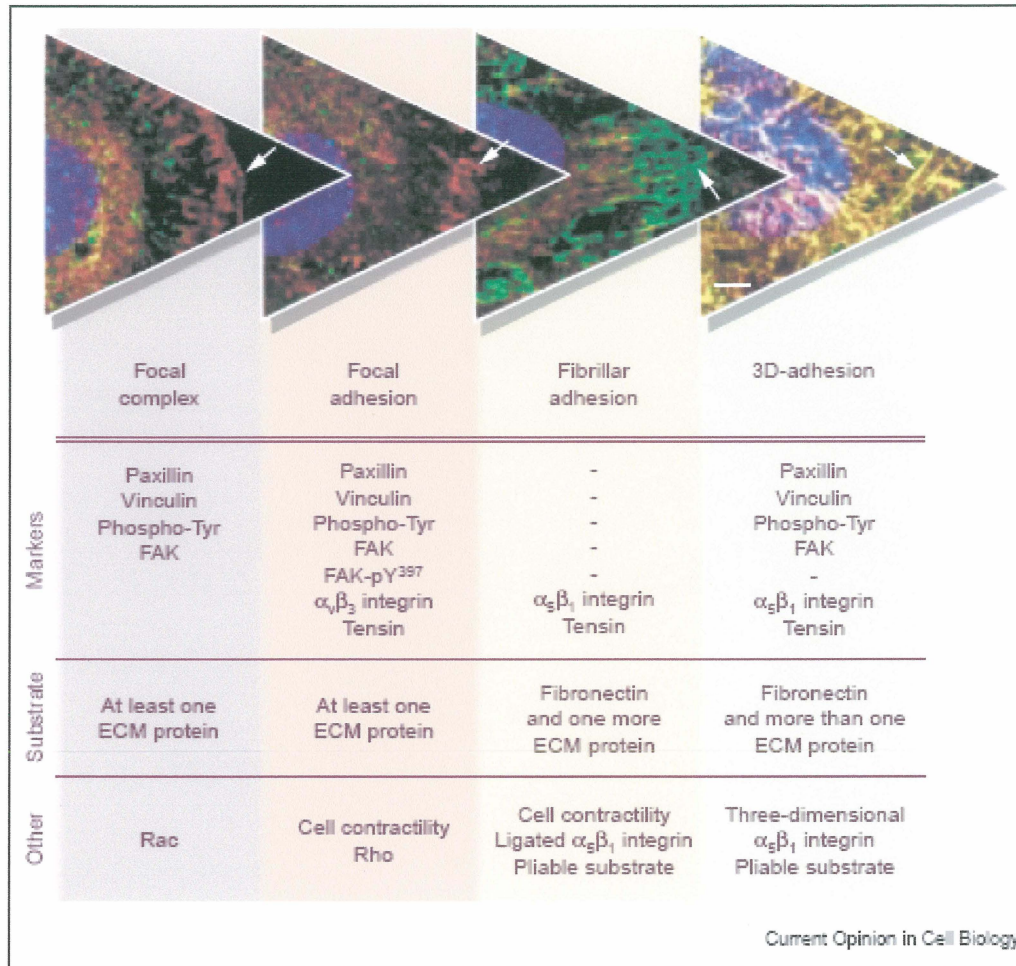


Figure 8. Points focaux et adhésion fibrillaires. A. Étapes de la maturation de complexe focaux en adhésion fibrillaire (Tiré de (Cukierman et al. 2002)). B) Paxilline (Alexa-488) et filaments d'actine (Phalloidine-594) d'une cellule glomérulée de la glande surrénale de rat en culture sur une matrice de FN.

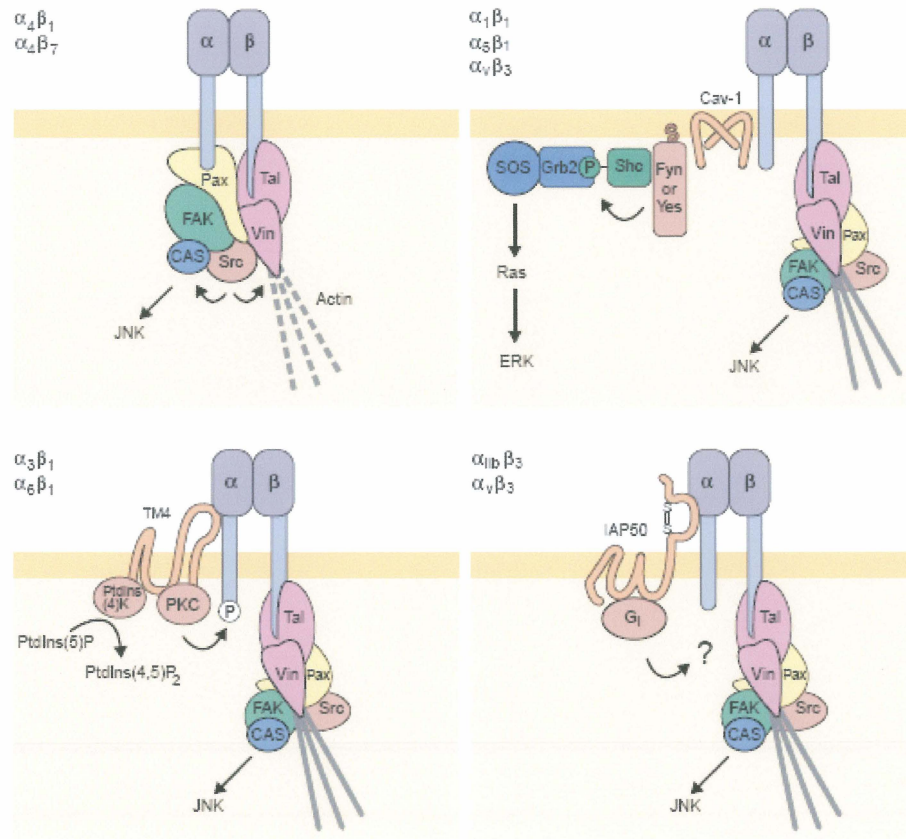


Figure 9. Complexe de signalisation retrouvé aux points d'ancrage. Dépendamment des isoformes d'intégrines et du type cellulaire, différentes protéines sont recrutées aux sites d'adhésion. Il s'en suit l'activation de voies de signalisation multiples (Tiré de (Giancotti 2000)).

1.3.1.2. Phosphatidylinositides

Les phosphatidylinositols et leurs enzymes, en particulier la PI3-kinase, sont fortement impliqués dans les changements du cytosquelette et la migration cellulaire provoqués par les intégrines. L'adhésion de cellules par les intégrines provoque une augmentation rapide des niveaux de phosphatidylinositols (PIP2) (McNamee et al. 1993). Le PIP2 est généré par la phosphorylation du phosphatidylinositol 4-phosphate *via* la phosphatidylinositol 5-kinase (PI5K). La PI5K forme un complexe avec Rho de façon

GTP-indépendante, ce qui mène à son activation (Chong et al. 1994; Ren et al. 1996). Le PIP2 lie la profiline, libérant les monomères d'actine de cette dernière qui sont disponibles à l'élongation du filament d'actine et la gelsoline, une protéine bloquant la polymérisation. La dissociation de la gelsoline des filaments d'actine par le PIP2 peut faciliter l'assemblage du cytosquelette d'actine (Lassing et Lindberg 1985; Janmey et Stossel 1987; Stossel 1989). Le PIP2 lie aussi l' α -actinine et la vinculine, protéines retrouvées dans les contacts focaux (Fukami et al. 1992; Fukami et al. 1994). L'interaction du PIP2 avec la vinculine induit un changement de conformation de cette dernière, menant à une augmentation de l'affinité de liaison pour la taline et l'actine (Gilmore et Burridge 1996). La vinculine procure un lien direct entre les queues cytoplasmiques des intégrines *via* la taline et le cytosquelette par l'actine. L'hydrolyse du PIP2 par la phospholipase C γ (PLC γ) (Kanner et al. 1993; Daniel et al. 1994) mène à la production d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycérol (DAG) qui sont des seconds messagers impliqués dans la régulation du calcium intracellulaire et l'activation de certaines isoformes de la protéine kinase C (PKC).

1.3.1.3. Intégrines et calcium intracellulaire

En plus de fournir un lien entre les composantes de la matrice extracellulaire et le cytosquelette, il a aussi été montré que les intégrines pouvaient contrôler la production de seconds messagers dans la cellule. Par exemple, il a été montré que les intégrines régulaient les concentrations intracellulaires d'ions hydrogène (ou le pH intracellulaire) *via* un échangeur Na⁺/H⁺ (Schwartz et al. 1989; Schwartz et al. 1991). L'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire ([Ca²⁺]_i) semble être un élément constitutif de la signalisation par les intégrines (Pardi et al. 1989; Ginsberg et al. 1990; Kirchhofer et al. 1991; Ng-Sikorski et al. 1991; Leavesley et al. 1993; Schwartz 1993). En général, les

intégrines liant le domaine RGD jouent un rôle dans la mobilisation du calcium. Des peptides RGD immobilisés sur des billes ou des lamelles sont capables d'induire une augmentation de calcium intracellulaire dans plusieurs clones de cellules épithéliales de reins, probablement par la liaison des intégrines $\alpha\beta3$ et/ou $\alpha\beta5$ au motif RGD (Sjaastad et al. 1994). Le Ca^{2+} fonctionne comme second messenger en contrôlant l'activation d'une multitude de protéines kinases, phosphatases et autres enzymes (Berridge 1993; Clapham 1995). Dans les cellules endothéliales, l'élévation de Ca^{2+} par les intégrines est dépendante de la liaison des intégrines αv mais pas des autres isoformes (Schwartz et Denninghoff 1994). Cette élévation de calcium intracellulaire semble être aussi dépendante d'une protéine associée de 50 kDa qui pourrait peut-être agir comme canal calcique (Schwartz 1993).

Il y a deux moyens par lesquels les niveaux de calcium intracellulaire peuvent être augmentés : par des influx de calcium extracellulaire par le biais de canaux de la membrane plasmique et/ou par une relâche de calcium des réserves intracellulaires (Schwartz 1993; Sjaastad et al. 1994). Ces influx de calcium pourraient être responsables d'un rétrocontrôle positif sur l'activation des intégrines (Sjaastad et al. 1994), et seraient aussi importants pour la migration cellulaire (Marks et al. 1991; Hendey et Maxfield 1993; Leavesley et al. 1993). L'intégrine $\alpha\beta3$ induit aussi une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ dans les ostéoclastes (Shankar et al. 1993). Les intégrines $\beta2$ peuvent également induire une élévation de $[Ca^{2+}]_i$ à la fois par des influx de calcium extracellulaire et par la mobilisation du calcium des réserves intracellulaires (Pardi et al. 1989; Pfau et al. 1995).

Une propriété qui semble générale chez toutes les isoformes d'intégrines est la régulation d'échangeurs. Contrairement à cela, ce ne sont pas toutes les intégrines qui possèdent la capacité de contrôler le $[Ca^{2+}]_i$. Par exemple, bien que les intégrines $\alpha2\beta1$

et $\alpha v\beta 3$ activent un échangeur dans les cellules endothéliales, seule $\alpha v\beta 3$ déclenche une augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ (Leavesley et al. 1993; Schwartz et Denninghoff 1994). Ces observations montrent que la régulation du pH et du calcium intracellulaire dépend de deux voies de signalisation séparées.

Comme mentionné plus haut, l'élévation de calcium intracellulaire peut aussi être le résultat d'influx de calcium par des protéines de la membrane plasmique. Plusieurs mécanismes sont responsables de cette entrée de calcium. Notons les canaux dépendants du voltage (canaux de types L, N, T, P et Q), et des processus indépendants du voltage tels que les canaux-récepteurs purinergiques (P2XR). Certains canaux appartenant à ce dernier mécanisme sont activés suite à une diminution du calcium des réserves intracellulaires; on les nomme SOC (« store-operated Ca^{2+} channel »). Ainsi, l'activation des récepteurs à IP3 des réserves intracellulaires de calcium mène à une augmentation des niveaux de calcium intracellulaire résultant en l'activation de certains canaux de la membrane plasmique (SOC). Les canaux de type TRP (Transient Receptor Potential Channel) sont des canaux cationiques non-sélectifs qui sont exprimés de façon ubiquitaire chez les mammifères. Les gènes *trp* et *trpl* (Transient Receptor Potential-Like Channel) d'abord localisés chez la drosophile (Garcia et Schilling 1997), sont des candidats à cette entrée capacitative de calcium (« capacitative Ca^{2+} entry ») (Clapham et al. 2003), mais cela reste controversé. Les trois principales sous-familles sont les TRPV, TRPCM et TRPC (Figure 10) (Hofmann et al. 2000; Zitt et al. 2002; Clapham et al. 2003). Dans les cellules de mammifères, la sous-famille des TRPC est composée de 7 membres subdivisés en 4 groupes (Montell et al. 2002). Les TRPC sont activés par les récepteurs couplés aux protéines G et par les récepteurs à activité tyrosine kinase (Figure 11) (Clapham et al. 2003). Les membres du groupe 3 (TRPC3/6/7) sont activés par le DAG et ses analogues (Hofmann et al. 1999; Okada et

al. 1999; Basora et al. 2003; Trebak et al. 2003). On retrouve ces canaux dans plusieurs tissus, dont le foie, le poumon, le cœur, les reins et les glandes surrénales et le cerveau (Garcia et Schilling 1997; Elliott 2001; Nilius et Droogmans 2001). Le rôle de ces canaux sur les fonctions des cellules glomérulées est discuté dans l'article #2 inclus dans cette thèse.

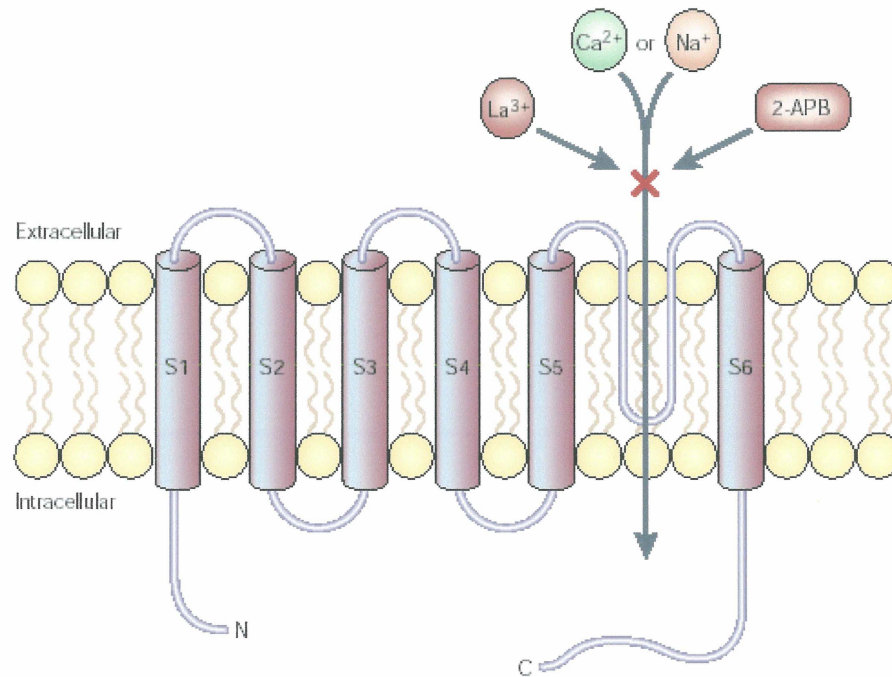


Figure 10. Structure des sous-unités des canaux TRP. Les sous-unités sont formées de six domaines transmembranaires (S1 à S6). Les ions lanthanum (La^{3+}) et le borate 2-aminodiethyldiphenyl (2-APB) peuvent bloquer ces canaux de façon non-spécifique. Des domaines ankyrines sont retrouvés dans la région N-terminale (Tiré de (Clapham et al. 2001)).

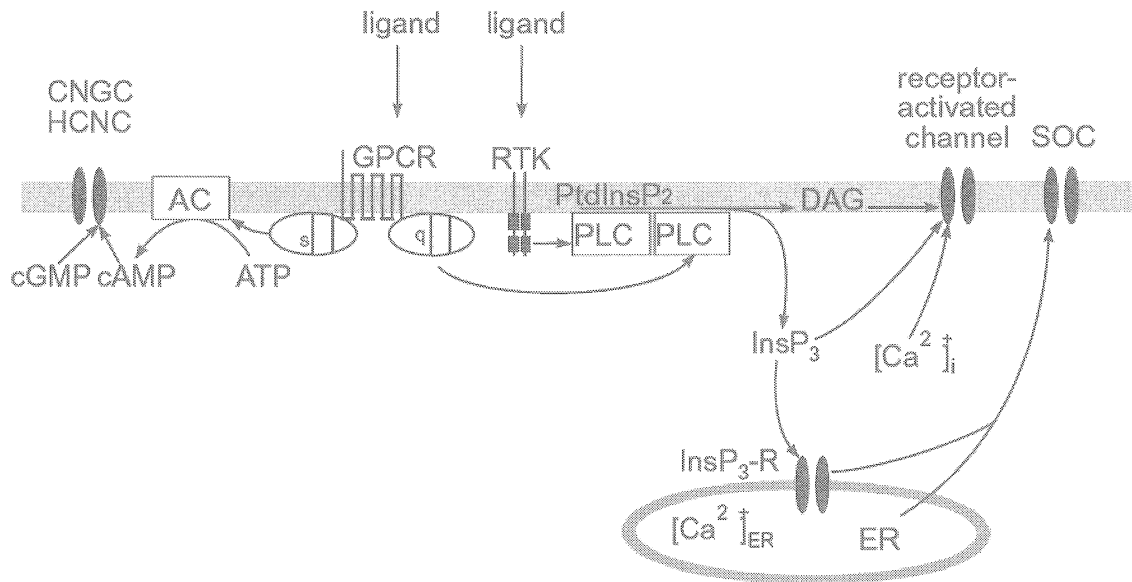


Figure 11. Mécanisme d'activation de certains canaux TRP. Certains TRPC sont activés par les récepteurs couplés aux protéines G et par les récepteurs à activité tyrosine kinase. Le calcium intracellulaire libéré par la liaison de l'inositol 3-phosphate (InsP3) à ses récepteurs (InsP3-R) active des récepteurs « Store-operated channels » (SOC) à la membrane plasmique (Tiré de (Hofmann et al. 2000)).

1.4 RÔLES PHYSIOLOGIQUES DES INTÉGRINES

1.4.1. Intégrines et prolifération cellulaire

Les intégrines sont impliquées dans la prolifération de plusieurs types cellulaires (Davey et al. 1999; Morla et Mogford 2000; Haack et Hynes 2001; Schwartz et Assoian 2001; Vacca et al. 2001; Le Bellego et al. 2002). Les protéines p42/44^{mapk} (ERK1/2) sont parmi les plus importantes de ces protéines de signalisation (Chen et al. 1994; Morino et al. 1995; Zhu et Assoian 1995; Campbell et al. 2003). L'activation de cette voie est impliquée dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Cowley et al.

1994; Hill et Treisman 1995; Hunter 1995; Marshall 1995). L'activation des intégrines, soit en cultivant les cellules sur des composantes de la MEC ou par des anticorps activateurs, résulte en une activation des p42/p44^{mapk} dans plusieurs types cellulaires (Chen et al. 1994; Morino et al. 1995; Zhu et Assoian 1995). Dans les cellules glomérulées de glande surrénale de rat adulte, nous avons montré que les cellules cultivées sur FN proliféraient plus rapidement que les cellules cultivées sur un substrat de poly-L-lysine. L'augmentation de prolifération induite par la FN est dépendante de l'activation de la voie p42/p44^{mapk} puisque l'ajout de PD98059 (un inhibiteur de MEK) réduisait le taux de prolifération au niveau contrôle (Campbell et al. 2003). De plus, la stimulation des cellules cultivées sur poly-L-lysine avec le peptide RGDS active la voie p42/44^{mapk}, suggérant un rôle de l'activation des intégrines dans la prolifération des cellules glomérulées (Campbell et al. 2003).

1.4.2. Intégrines et migration cellulaire

La migration cellulaire est un phénomène essentiel lors de l'embryogenèse, la réponse immunitaire et la réparation tissulaire, mais une migration cellulaire incontrôlée survient lors de pathologies telles que l'inflammation chroniques, les maladies vasculaires et la formation de métastases. La migration cellulaire implique des changements dynamiques dans l'adhésion cellulaire, l'organisation du cytosquelette et dans la transduction de signaux intracellulaires. Le processus de migration peut se diviser en étapes spécifiques : la protusion du front de migration (leading edge), la formation de nouveaux points d'adhésion, la contraction cellulaire (polymérisation et dépolymérisation de l'actine) et le détachement de l'arrière de la cellule (rear) (Lauffenburger et Horwitz 1996; Sheetz et al. 1998; Ridley et al. 2003; Carragher et

Frame 2004). Plusieurs voies de signalisation intracellulaires influencent la dynamique du cytosquelette d'actine, celles-ci incluent les protéines de la famille des Rho GTPases, la kinase d'adhésion focale (FAK), la kinase Src, les voies ERK et JNK et la PI3-kinase (Juliano et al. 2004). Les intégrines activent plusieurs des voies mentionnées précédemment, ainsi le rôle des intégrines dans la migration s'effectue tant sur l'aspect structural (point d'ancrage) que sur l'aspect signalisation.

Puisque la glande surrénale est sous régénération constante, cela implique une prolifération cellulaire et une migration contrôlée (Pellerin et al. 1997; Wolkersdorfer et Bornstein 1998). Les études de Feige et al. suggèrent que la LN serait importante dans la migration des cellules adrénocorticales de la capsule vers le centre de la glande (Feige et al. 1998). De plus, il a été démontré que la thrombospondine-2 inhibe la migration des cellules adrénocorticales. Finalement, chez le bovin, la LN et la FN augmentent la migration cellulaire (Pellerin et al. 1997). Chez l'humain, aucune étude n'a encore caractérisé le rôle des différentes composantes de la MEC sur la migration cellulaire. Toutefois, la gradient d'expression de la FN dans la glande surrénale fœtale humain suggère que la FN serait impliquée dans les processus de migration lors du développement (Chamoux et al. 2001).

1.4.3. Intégrines, mort cellulaire (apoptose) et survie cellulaire

L'adhésion aux composantes de la MEC est indispensable à la croissance et la survie de plusieurs types cellulaires. Des résultats indiquent que l'activation des intégrines déclenche des signaux qui inhibent l'apoptose (Meredith et al. 1993; Howlett et al. 1995; Grossmann 2002). Ces signaux n'ont pas encore clairement été identifiés;

cependant, il apparaît que l'occupation des intégrines par leurs ligands ne soit pas suffisante pour générer ces signaux. Des changements dans la morphologie cellulaire peuvent aussi être nécessaires, comme ceux survenant lors de l'étalement d'une cellule (Re et al. 1994). La prévention de l'apoptose par les composantes de la MEC est dépendante de l'expression et de la fonction d'hétérodimères particuliers d'intégrines et ces exigences semblent être spécifiques au type cellulaire. Par exemple, chez des embryons de poulet, lorsque l'intégrine $\alpha v \beta 3$ est bloquée durant l'angiogénèse, à l'aide d'anticorps spécifiques, la prolifération cellulaire est inhibée et il y a induction de l'apoptose. Par contre, un traitement avec des anticorps anti- $\beta 1$ bloquant la fonction de cette sous-unité d'intégrine ne provoquent pas l'apoptose (Brooks et al. 1994). La protéine FAK semble aussi jouer un rôle important dans l'induction des signaux de survie cellulaire des composantes de la matrice (Hanks et Polte 1997; Schlaepfer et al. 1999; Hanks et al. 2003; Wozniak et al. 2004).

Durant le développement fœtal, il a été suggéré que les cellules de la zone définitive migrent vers la zone fœtale pour finalement mourir par apoptose au centre de la glande (Chamoux et al. 1999; Spencer et al. 1999) (for review, see (Mesiano et Jaffé 1997)). Dans les cellules fœtales de la glande surrénale humaine, Chamoux et al. (Chamoux et al. 2002) ont montré que les cellules placées sur une matrice de FN ont des niveaux plus élevés d'apoptose que les cellules placées sur des Pétri de polystyrène (plastique). Une matrice de LN diminue l'apoptose et le Col IV n'a aucun effet sur l'apoptose des cellules fœtales de la glande surrénale humaine. Ces résultats nous laissent croire que la FN et les autres composantes de la MEC sont impliquées dans le développement de la glande surrénale.

1.4.4. Intégrines et expression de gènes

Il existe plusieurs exemples démontrant que les composantes de la matrice extracellulaire, par l'activation des intégrines, peuvent affecter l'expression de gènes (Hynes 1992; Adams et Watt 1993). Chez les monocytes, la signalisation *via* l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ contrôle la production de médiateurs inflammatoires tel que IL-1 β (Yurochko et al. 1992). Il a aussi été établi que la signalisation par les intégrines contrôle l'expression de métalloprotéinases, protéines impliquées dans la dégradation de la MEC. La production de métalloprotéinases dans les fibroblastes synoviaux est réglée par des signaux antagonistes des intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$ (Huhtala et al. 1995). Dans la glande surrénale humaine, Chamoux et al., ont étudié le rôle de différentes composantes de la MEC sur l'expression d'enzyme de la stéroïdogénèse. Une matrice de LN augmente les niveaux d'ARN de la 3β HSD et diminue celle de la P450C17 comparativement au plastique. De plus, la FN, LN et Col IV semble moduler l'effet de l'Ang II et de l'ACTH sur l'expression de ces deux enzymes (Chamoux et al. 2002).

1.4.5. Intégrines et sécrétion d'hormones

Parmi les rôles physiologiques résultant de l'activation des intégrines, notons la sécrétion d'hormones. Par exemple, le Col IV et son récepteur $\alpha 1\beta 1$ régule la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas fœtales (Kaido et al. 2004). Aussi, Huet et al. (Huet et al. 2001) ont observé que la LN et le Col I avaient des effets différents sur la sécrétion de stéroïdes par les cellules granulaires d'ovaire de bovins, puisque le Col I augmentait la sécrétion d'estradiole et diminuait la sécrétion de progestérone et qu'une matrice de LN diminuait la sécrétion d'estradiol et augmentait la sécrétion de

progestérone (Huet et al. 2001). Des études ont aussi été réalisées sur les cellules de la glande surrénale. Par exemple, il a été montré que les cellules glomérulées sécrétaient de l'aldostérone pour une plus grande période lorsque les cellules étaient cultivées dans un gel de Col (Fujiyama et al. 1993). L'utilisation de matrice de FN ou LN augmente la sécrétion de DHEA et DHEAS suite à une stimulation avec de l'ACTH chez les cellules fœtales de la glande surrénale humaine en culture. De plus, une matrice de Col IV augmente les niveaux de DHEAS et de cortisol et la stimulation des cellules surrénales fœtales humaines par l'Ang II est augmentée lorsque les cellules sont placées sur Col IV (Chamoux et al. 2002). Dans un article précédant, nous avons montré que la stimulation des cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte par une matrice de FN seule ou par la stimulation des cellules avec le peptide RGDS augmentait la sécrétion d'aldostérone. De plus, une stimulation de la sécrétion d'aldostérone induite par l'Ang II ou l'ACTH était augmentée lorsque les cellules glomérulées étaient cultivées sur une matrice de FN (Campbell et al. 2003). Ces résultats suggèrent que l'activation des intégrines pourrait être impliquée dans la réponse des cellules glomérulées à différents stimulants et potentialiser les actions sur la sécrétion d'aldostérone. Les effets additionnels d'une matrice de FN et de l'ACTH ou l'Ang II sur la sécrétion hormonale retrouvée chez les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte pourraient impliquer l'activation de plusieurs isoformes d'intégrine. Un phénomène de signalisation intracellulaire commun « cross-talk signaling » entre les intégrines et les multiples récepteurs membranaires a été observé dans plusieurs types cellulaires (Juliano 1996; Miyamoto et al. 1996; Renshaw et al. 1997; Schneller et al. 1997; Guilherme et al. 1998), cela sera décrit plus loin.

1.5. LA GLANDE SURRÉNALE

1.5.1. Structure

Les glandes surrénales, impliquées dans l'homéostasie des fluides et dans la réponse au stress, sont localisées au-dessus des reins. La glande surrénale est composée de deux régions distinctes par leur fonction et leur origine ; le cortex surrénalien (portion externe) et la médullosurrénale (portion interne) (Figure 12). Le cortex, appelé corticosurrénale, est la portion la plus volumineuse, et il entoure la médulla; il provient du mésoderme embryonnaire. La médulla, appelée médullosurrénale, dérive de la crête neurale ; fonctionnellement, elle appartient au système nerveux sympathique. La corticosurrénale constitue 78% du poids total de la glande surrénale. Les cellules corticales, chargées de lipides, sont disposées en trois zones concentriques (Figure 12). Sous la capsule, la zone la plus externe contient les cellules glomérulées (ZG). Elles sont de plus petite taille que les cellules fasciculées et sont disposées en glomérules autour des capillaires sanguins. Ces cellules produisent les minéralocorticoïdes, des hormones qui assurent l'équilibre hydro-électrolytique de sang; l'aldostérone étant le plus important et sera abordé dans la section suivante. Au milieu, les cellules de la zone fasciculée, les plus volumineuses, forment des cordons plus ou moins rectilignes et sont séparées par des sinusoides. Elles sécrètent les glucocorticoïdes, hormones métaboliques impliquées dans plusieurs voies; le cortisol chez l'homme et la corticostérone chez le rat. Enfin, les cellules de la zone réticulée, à l'intérieur, sont de petites tailles et sont contiguës à la médullo-surrénale et sont disposées en réseaux ; chez l'homme, elles produisent le DHEA (désydroépiandrostérone) et son dérivé sulfaté, le DHEAS et chez les rongeurs, ces cellules sécrètent des corticostéroïdes

(Idelman 1970; Reed et James 1989), (pour revue, voir (Vinson 2003; Auchus et Rainey 2004; Vinson 2004; Williams 2005). Si toutes les cellules du cortex chez les rongeurs ont la capacité de produire de la corticostérone, la ZG est la seule à posséder la propriété de produire de l'aldostérone. Contrairement à la ZF, contrôlée principalement par l'ACTH, la ZG est sous un contrôle multifactoriels, i.e. ACTH, Ang II, potassium et plusieurs neuropeptides (Ehrhart-Bornstein et al. 1998). Finalement, dans la région la plus interne, la médullosurrénale, les cellules sécrètent des catécholamines et des neuropeptides.

Chez la souris, une zone "X" a été identifiée entre la ZR et la médullosurrénale des femelles gestantes et les jeunes souris, mais le rôle de cette zone est encore peu connu. Il a aussi été montré qu'une zone dite « intermédiaire » existait entre la ZG et la ZF. L'hypothèse que cette zone soit considérée comme la zone progénitrice des cellules de la ZG reste controversé (Mitani et al. 2003; Vinson 2003).

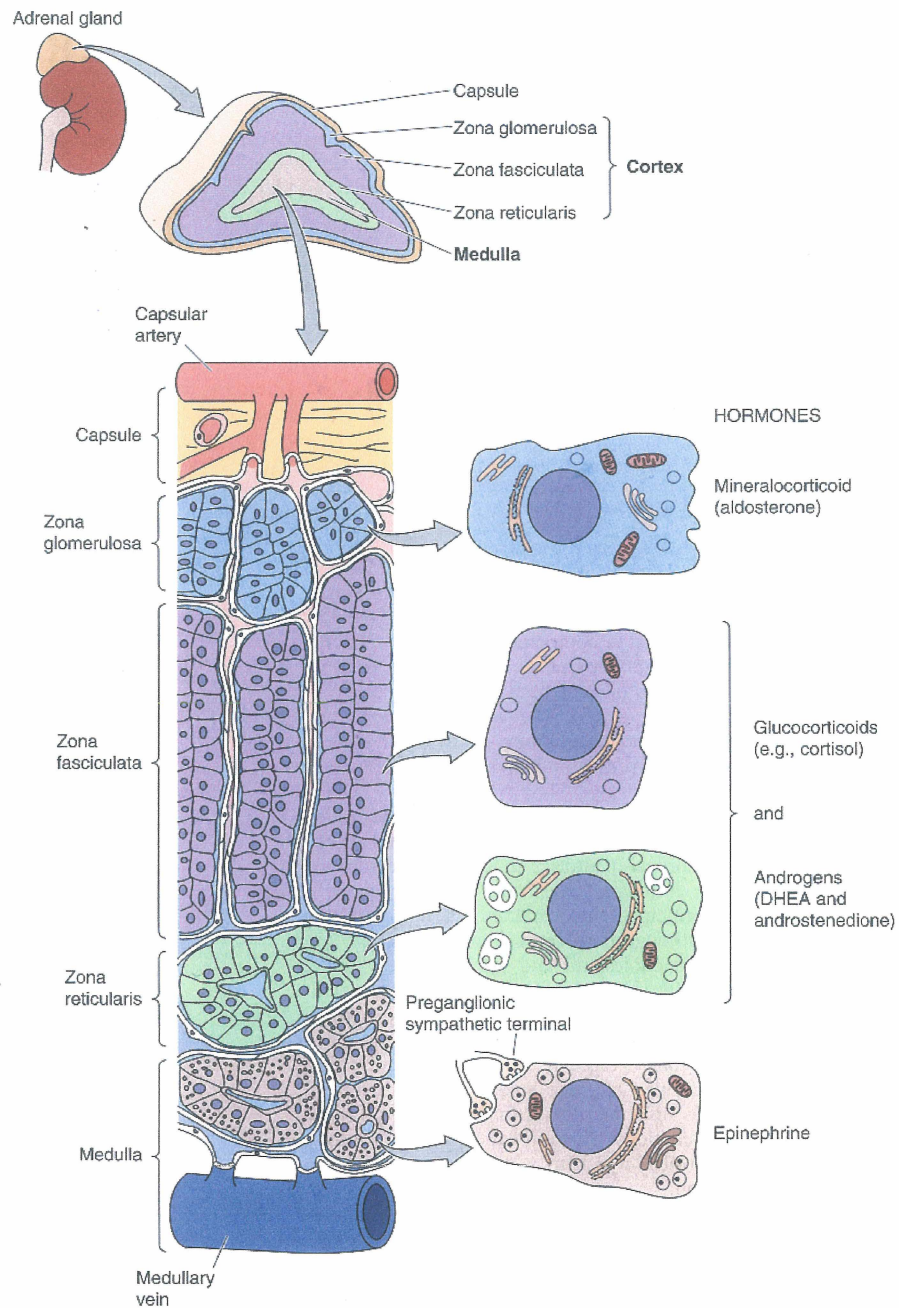


Figure 12. Schéma d'une glande surrénale. La glande surrénale comprend deux régions : la médullosurrénale et la corticosurrénale. La corticosurrénale est divisée en trois zones; la zone glomérulée située sous la capsule, la zone fasciculée et la zone réticulée près de la médulla. Chacune des cellules de ces zones sécrètent des hormones et molécules spécifiques. (Schéma tiré de (Boron et Boulpaep 2003)).

1.5.2. L'aldostérone et son contrôle

La principale fonction des minéralocorticoïdes est la régulation des concentrations d'électrolytes (sels minéraux) et particulièrement celle des ions sodium et potassium dans le sang. Bien qu'il existe plusieurs minéralocorticoïdes, l'aldostérone est le plus puissant et le plus abondant (plus de 95% de la production de minéralocorticoïdes). La synthèse de l'aldostérone et de toutes les hormones de la stéroïdogénèse commence avec la mobilisation du cholestérol dans les gouttelettes lipidiques puis son transport dans les mitochondries. Il subit ensuite plusieurs actions enzymatiques dans les mitochondries, mais aussi dans le réticulum endoplasmique (Idelman 1970; Lumbers 1999; Vinson 2004). Afin d'effectuer ses actions, l'aldostérone lie son récepteur dans le cytosol. Le complexe hormone-récepteur subit ensuite une translocation au noyau et se lie à l'élément de réponse aux minéralocorticoïdes sur l'ADN.

À noter que les minéralocorticoïdes peuvent lier à la fois les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). De plus, l'élément de réponse sur l'ADN est le même. Les effets spécifiques de l'aldostérone sont préservés car le cortisol est détruit par l'enzyme 11-bêta-hydroxystéroïde déshydrogénase dans les cellules-cibles de l'aldostérone. Cette enzyme convertit le cortisol en cortisone qui a peu d'affinité pour le MR.

Comme leur nom l'indique, les minéralocorticoïdes jouent un rôle critique dans la régulation de la concentration de certains minéraux, en particulier, le sodium et le potassium dans les fluides extracellulaires. La cible majeure de l'aldostérone est le tubule distal du rein où elle stimule l'échange sodium-potassium. Des effets similaires sont aussi retrouvés dans les glandes salivaires, les glandes sudoripares et le colon. Plus précisément, suite à une stimulation par l'aldostérone, on remarque une augmentation

de la réabsorption du sodium provoquant une augmentation de la réabsorption d'eau. La conséquence étant une augmentation du volume des fluides extracellulaires. L'aldostérone provoque aussi une augmentation de l'excrétion du potassium par le rein. Ces effets sont médiés par la transcription du gène codant pour l'ATPase sodium-potassium conduisant à une augmentation du nombre de pompes au côté basolatéral des membranes des cellules épithéliales tubulaires (Boron et Boulpaep 2003). De plus, l'aldostérone stimule aussi l'expression de canaux sodiques qui facilitent la réabsorption du sodium (Booth et al. 2002).

La régulation de la sécrétion d'aldostérone est sous le contrôle de plusieurs composantes. Premièrement, une augmentation du potassium plasmatique et une diminution du taux sanguin de sodium mènent à une augmentation de la sécrétion d'aldostérone du cortex surrénalien afin d'amener une augmentation de l'excrétion du potassium et une réabsorption du sodium. Une deuxième voie de contrôle implique le système rénine-angiotensine. Par exemple, une perte de sodium et d'eau induit une diminution du volume plasmatique qui amène divers phénomènes : une augmentation de l'activité des nerfs sympathiques rénaux, une diminution de la pression artérielle et une diminution du débit à la macula densa, ce qui a pour effet de diminuer la concentration de NaCl dans celle-ci. Ces trois événements provoquent une augmentation de la sécrétion de rénine des cellules juxtaglomérulaires rénales. L'augmentation de rénine plasmatique induit une augmentation d'Ang II plasmatique qui stimule la sécrétion d'aldostérone (Mulrow 1999). Le mécanisme d'action le plus connu de l'Ang II s'effectue par sa liaison à un récepteur (AT₁) qui sera décrit ci-dessous.

1.5.2.1. L'Angiotensine II (Ang II) et sa signalisation

L'Ang II circulante est le principal effecteur du système rénine-angiotensine (RAS) et est impliquée dans la régulation de la pression sanguine, la régulation des fluides et dans la balance des électrolytes (Touyz et Berry 2002; Boron et Boulpaep 2003). Le précurseur de l'Ang II est l'angiotensinogène qui est produit dans le foie. L'angiotensinogène clivé par la rénine issue du rein devient l'Ang I. C'est l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) (principalement retrouvée dans le poumon) qui catalyse la conversion du décapeptide Ang I inactif en Ang II (octapeptide). D'autres peptidases peuvent catalyser la conversion de l'Ang I en Ang II. Pour de plus amples détails sur le système rénine-angiotensine, voir (Mulrow 1999; Kurdi et al. 2005). On retrouve aussi le RAS au niveau tissulaire. Tous les éléments du RAS ont été retrouvés dans les cardiomyocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. L'ACE est exprimée chez les monocytes sanguins et dans les macrophages. Les pré-adipocytes humains possèdent un RAS fonctionnel et des évidences existent quant à la présence du RAS dans le pancréas humain (Engeli et al. 2000; Fleming et al. 2006). Finalement, toutes les composantes du RAS sont aussi exprimées par les cellules de la corticosurrénale (Bader et al. 2001).

L'Ang II lie deux principaux récepteurs présents sur les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat; les récepteurs AT₁ (R-AT₁) et AT₂ (R-AT₂) de l'Ang II. Le R-AT₁ à sept domaines transmembranaires est le récepteur majoritaire du cortex surrénalien en particulier des cellules glomérulées. Le R-AT₁ est couplé à une protéine Gq. Suite à son activation par l'Ang II, l'activation subséquente d'une PLC provoque la production de DAG et d'IP₃ responsable de la libération de calcium intracellulaire, impliqué dans la sécrétion de l'aldostérone (pour revue, voir (Mulrow 1999; Touyz et Berry 2002)).

Plusieurs voies de signalisation sont induites suite à l'activation du récepteur AT₁ de l'Ang II (Figure 13). Les p42/44^{mapk} sont activées par plusieurs signaux extracellulaires incluant les facteurs de croissance, les cytokines, les hormones et les neurotransmetteurs. Par exemple, dans le cas de l'activation de cette voie par l'Ang II, la liaison de cette hormone à son récepteur AT₁ induit le recrutement de la protéine adaptatrice Grb2. Grb2 se lie par des domaines SH3 à la protéine Sos. Sos se retrouve près de la membrane et agit comme un facteur d'échange des guanines-nucléotides (GEF). La protéine Ras ancrée à la membrane et liée au GTP recrute la protéine effectrice Raf-1 à la membrane. L'activation de Raf-1 par la phosphorylation de résidus tyrosines mène à la phosphorylation des MAPK kinases (MEK1 et MEK2). L'activation des p42/44^{mapk} à lieu suite à la phosphorylation de résidus thréonine et tyrosine (202 et 204 chez l'humain et 183 et 185 chez le rat) par les MAPK kinases (MEKs) (Sturgill et al. 1988; Payne et al. 1991). Gendron et al. (1999) a montré que la voie p42/44^{mapk} peut aussi être activée d'une façon Ras-indépendante dans les cellules NG108-15 (Gendron et al. 1999). Bien que dans plusieurs types cellulaires l'Ang II semble stimuler la prolifération cellulaire, nous avons montré, dans un article récent, que l'Ang II a un effet anti-prolifératif chez les cellules glomérulées de glande surrénale de rat adulte (Otis et al. 2005).

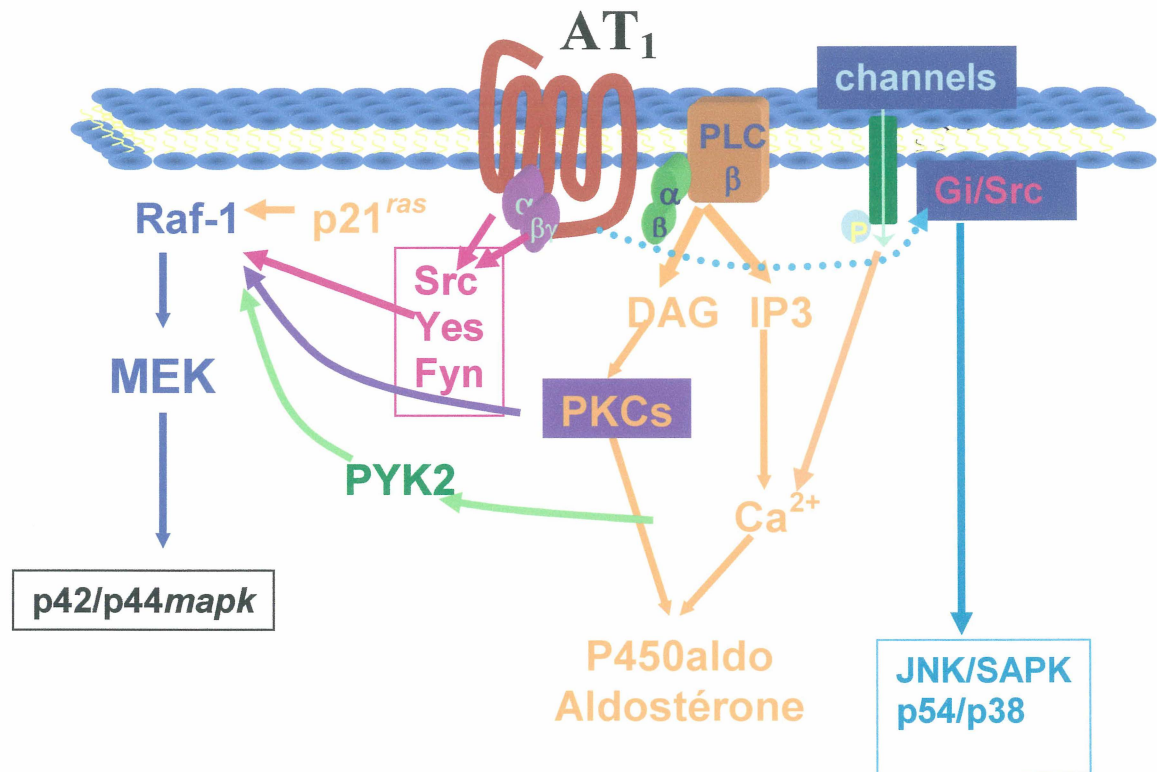


Figure 13. Schéma des voies de signalisation induites suite à l'activation du récepteur AT₁ par l'Ang II. (Schéma conçu par Mélissa Otis, M.Sc.)

1.5.2.2. L'ACTH et sa signalisation

L'hormone corticotrope (ACTH), sécrétée dans l'hypophyse sous le contrôle de l'hormone hypothalamique CRH (« corticotropin-releasing hormone »), est le principal stimulus ayant une fonction de régulation sur le cortex surrénalien. L'ACTH possède particulièrement un rôle dans la régulation du cortisol sécrété par les cellules de la ZF, mais ne contribue que faiblement à la régulation d'aldostérone. Cependant, *in vitro*, l'ACTH parvient à induire une stimulation d'aldostérone plus puissante que celle provoquée par l'Ang II (Gallo-Payet et Escher 1985; Gallo-Payet et al. 1996). Les actions de l'ACTH ont lieu suite à la liaison à un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine Gs (Figure 14). L'activation de l'enzyme

adénylate cyclase induit une augmentation d'AMPc et l'activation de protéine dépendante de l'AMPc (PKA) impliquée dans la sécrétion d'aldostérone. Bien que les mélanocortines comptent plusieurs récepteurs (MC1 à MC5), le MC2, liant l'ACTH, est le principal récepteur exprimé par les cellules glomérulées de la glande surrénale (Mountjoy et al. 1992; Liakos et al. 1998; Reincke et al. 1998).

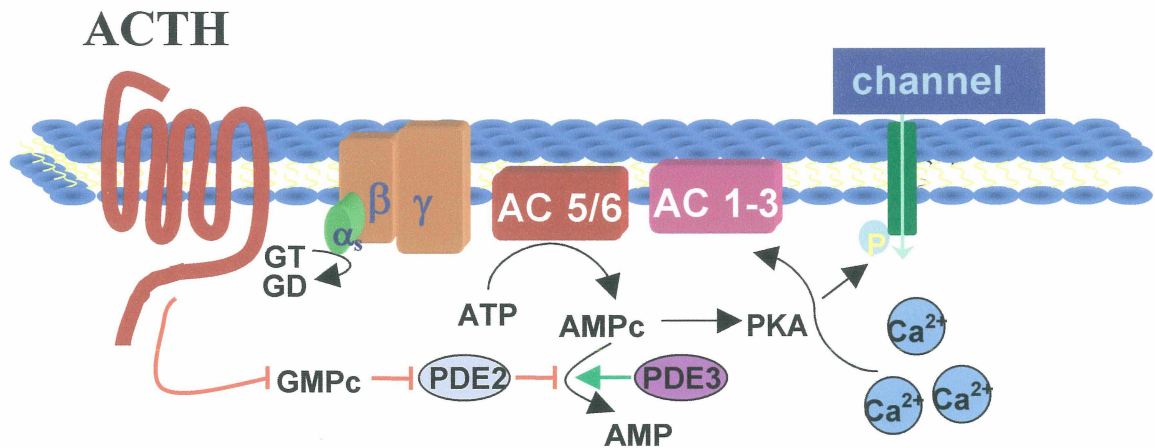


Figure 14. Schéma des voies de signalisation induites suite à l'activation du récepteur MC2 par l'ACTH. (Schéma conçu par Mélissa Otis, M.Sc.)

1.5.3. La corticostérone et son contrôle

Le nom glucocorticoïde vient des observations du rôle de ces hormones sur le métabolisme du glucose. Le cortisol stimule plusieurs processus qui collectivement servent à augmenter ou maintenir des concentrations normales de glucose dans le sang. Ces principaux rôles physiologiques sont ; la stimulation de la gluconéogenèse, la mobilisation des acides aminés des tissus extrahépatiques, l'inhibition de la réabsorption du glucose dans les muscles et les tissus adipeux ; la stimulation du « fat breakdown » du tissu adipeux. Les glucocorticoïdes ont aussi d'autres effets, par exemple au niveau

du système immunitaire, les glucocorticoïdes ont des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. La famille des glucocorticoïdes comprend plusieurs membres. Parmi les plus importants, notons le cortisol et la corticostérone. Le cortisol est le plus abondant chez l'humain. Chez les rongeurs, l'absence de l'enzyme 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 (P450c17) empêche la production de cortisol et la corticostérone est ainsi le glucocorticoïde produit. Les ovins, porcins et canins produisent ces deux glucocorticoïdes (Buckingham 2006).

Tout comme l'aldostérone, le cortisol lie son récepteur dans le cytoplasme et le complexe hormone-récepteur est transloqué dans le noyau cellulaire où il lie son élément de réponse sur l'ADN et module la transcription d'une multitude de gènes. Seulement 10% du cortisol se retrouve sous forme libre. La majorité de l'hormone circule liée à une protéine plasmatique, en particulier, la transcortine ou la globuline liant les corticostéroïdes (« corticosteroid-binding globulin ») (Sapolsky et al. 2000; de Kloet 2003; Buckingham 2006).

Le cortisol et les autres glucocorticoïdes sont produits et sécrétés sous stimulation principale de l'ACTH. De plus, les stress physiques et mentaux résultent en une élévation des concentrations de cortisol dans le sang due à une augmentation de la sécrétion de CRH dans l'hypothalamus. Dans les situations de stress chronique, des niveaux élevés et prolongés de cortisol dans la sang peuvent avoir des effets négatifs tels que : suppression de fonctions thyroïdiennes, hyperglycémie, diminution de la densité osseuse, diminution de la masse musculaire, pression sanguine élevée et diminution du système immunitaire (Sapolsky et al. 2000; de Kloet 2003; Seematter et al. 2004; Buckingham 2006).

Les stéroïdes produits par la glande surrénale régulent l'homéostasie à plusieurs niveaux. Comme mentionné précédemment, l'aldostérone est régulée par plusieurs

facteurs tout comme les corticostéroïdes (pour revue, voir (Ehrhart-Bornstein et al. 1998; Lumbers 1999; Gallo-Payet et Payet 2003; Spat et Hunyady 2004)). Plusieurs études ont montré que l'environnement cellulaire pouvait modifier les fonctions cellulaires (Arteaga-Solis et al. 2000; Bornstein et Sage 2002; Schroeder et al. 2003; Properzi et Fawcett 2004). Dans le premier article, nous verrons comment différentes protéines de la matrice extracellulaire peuvent modifier la production d'aldostérone et de corticostérone par les cellules du cortex surrénalien de rat adulte.

1.5.4. Liens entre les intégrines et les autres récepteurs de la glande surrénale

Il est maintenant connu que les intégrines peuvent collaborer avec des facteurs de croissance afin d'induire certains signaux intracellulaires (Plopper et al. 1995; Diaz-Gonzalez et al. 1996; Juliano 1996; Miyamoto et al. 1996). Bien qu'un des mécanismes décrits implique le système de signalisation des phosphatidylinositols (McNamee et al. 1993), d'autres mécanismes existent vraisemblablement. Un mécanisme relativement direct implique l'aggrégation des récepteurs des facteurs de croissance induite par les intégrines, l'hyperphosphorylation des récepteurs de l'EGF (« epidermal growth factor ») ou du PDGF (« platelet-derived growth factor ») en présence des ligands, en plus de l'aggrégation et l'occupation des intégrines amenant à l'augmentation de la signalisation par les p42/p44^{mapk} (Miyamoto et al. 1996). Une étude récente décrit un autre type de coopération ; dans un cas où il y a perte d'adhésion prolongée avec les protéines de la matrice, p44^{mapk} est inhibée au niveau des MEK et la cellule devient incapable de produire des signaux *via* les facteurs de croissance tant que le lien cellule-matrice n'est pas restauré (Renshaw et al. 1997). Une collaboration des intégrines avec

d'autres récepteurs existe comme l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, par exemple, qui peut collaborer avec le récepteur à l'insuline pour augmenter l'adhésion cellulaire (Guilherme et al. 1998). Bien que plusieurs études aient montré une régulation de l'expression ou de la localisation de certaines intégrines (Berry et al. 2000; Dominguez-Jimenez et al. 2001; Thibault et al. 2001) et de composantes de la MEC (Eto et al. 2003; Liang et al. 2003) par l'Ang II, seulement quelques groupes ont étudié une interaction croisée possible dans la signalisation intracellulaire suite à l'activation des intégrines et des récepteurs à l'Ang II (Shikata et al. 1999; Hein 2005; Stawowy et al. 2005). Suite aux résultats qui seront exposés plus loin, nous posons l'hypothèse que certaines molécules recrutées suite à l'activation des intégrines pourraient interagir (ou être communes) avec les voies de signalisation induites par les récepteurs à l'ACTH et à l'Ang II dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte.

1.6. NOTRE MODÈLE D'ÉTUDE

Les cellules glomérulées de la glande surrénale de rats Long Evans sont utilisées depuis plusieurs années dans les laboratoires Payet et Gallo-Payet (Payet et Lehoux 1980; Payet et al. 1995; Chorvatova et al. 2000). Ces études ont fourni des informations originales sur l'implication de l'activité des canaux ioniques dans la synthèse et la sécrétion de stéroïdes, ainsi que sur les cascades de signalisation induites par différentes hormones, telles que l'ACTH et l'Ang II, fournissant des données importantes sur le phénomène de couplage excitation-sécrétion.

Il est maintenant connu que les composantes de la MEC influencent plusieurs fonctions cellulaires par l'activation des intégrines. Toutefois, le rôle précis de ces composantes sur les fonctions des cellules glomérulées n'a pas encore été élucidé. Feige et ses collaborateurs ont montré que la LN, sous le contrôle de l'ACTH, permet une différenciation et une régénération adéquate du cortex surrénalien et favorise la migration des cellules du cortex surrénalien bovines (Pellerin et al. 1997). De plus, compte tenu de l'expression différentielle de la FN dans la glande surrénale, il semble que cette protéine soit responsable de la migration des cellules du cortex surrénalien vers le centre de la glande (Feige et al. 1998). Basés sur une étude précédente dans laquelle nous avons démontré qu'une matrice de FN augmente le niveau de prolifération des cellules glomérulées et influence la sécrétion d'aldostérone en réponse à l'Ang II et l'ACTH (Campbell et al. 2003), nous voulions, dans ce projet, approfondir l'effet de certaines composantes de la MEC sur les cellules glomérulées.

Une description détaillée des objectifs de mon projet de doctorat est contenue dans la prochaine section.

2. BUTS DU PROJET

La liaison des intégrines aux composantes de la matrice extracellulaire provoque l'activation de plusieurs voies de signalisation chez plusieurs types cellulaires. Nous avons voulu vérifier le rôle des composantes de la matrice extracellulaire dans la réponse des cellules glomérulées de la glande surrénale de rat. Une emphase particulière sera mise sur la fibronectine et ses récepteurs. Nous voulions :

- 1) déterminer les composantes de la matrice extracellulaire présentes dans la glande surrénale entière de rat adulte,
- 2) déterminer les types d'intégrines présentes dans la glande surrénale de rat adulte entière,
- 3) déterminer l'effet de différentes matrices (Col I, Col IV, LN-1 et FN) sur la sécrétion d'aldostérone (ZG) et corticostérone (ZF),
- 4) déterminer l'effet de différentes matrices (Col I, Col IV, LN-1 et FN) sur la prolifération cellulaire (ZG et ZF),
- 5) déterminer quels sont les canaux ioniques impliqués dans l'influx de calcium provoqué par l'activation des intégrines des cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte en culture.
- 6) déterminer les composantes de la MEC (Col I, Col IV, LN-1 et FN) sécrétées par les cellules glomérulées en culture.

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Les matériels et méthodes utilisés dans les articles joints sont décrits dans la section : *Material and Methods* propre à chaque article. Les matériels et méthodes des expériences ne faisant pas partie de ces articles sont retrouvés ci-dessous.

3.1 AGENTS CHIMIQUES

Les produits chimiques utilisés dans cette étude proviennent des compagnies suivantes: DNase de Sigma (St-Louis, MO), collagénase, milieux MEM-Eagle-Medium et OPTI-MEM de GIBCO (Burlington, ONT, Canada). Les Pétris et lamelles de verre recouvertes de matrices de BD-VWR Canlab (Ville Mont-Royal, QUE, Canada). Le kit d'extraction d'ARN de Ambion (Texas). Les anticorps anti-BKCa et anti-Kv10.1 ont été obtenus de Alomone (Austin, TX) et l'anticorps anti-intégrine $\alpha 8$ nous a généreusement été donné par le Dr. Gaétan Thibault (Laboratoire de Biologie Cellulaire de l'hypertension, Institut Clinique de Montréal, Québec, Canada).

3.2 PRÉPARATION DES CELLULES GLOMÉRULÉES

Les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat ont été obtenues comme décrit précédemment (Gallo-Payet et Payet 1989). Des rates Long Evans (200-250 g) ont été décapitées et les glandes surrénales ont été prélevées. Les protocoles animaux ont été approuvés par le comité animal de l'Université de Sherbrooke et suivis selon le guide d'éthique du Conseil canadien de protection des animaux. Les étapes suivantes pour l'isolation des cellules glomérulées ont été faites dans du milieu MEM Eagle. Après une

incubation de 20 min à 37 C dans du milieu MEM Eagle contenant de la collagénase (2 mg/ml, 4 glomerulosa/ml) plus déoxyribonucléase (25 µg/ml), les cellules ont été séparées de la capsule par aspiration avec une pipette stérile de 10ml, filtrées (22 µm) et centrifugées pendant 10min à 100 x g. Le culot de cellules a été resuspendu dans du milieu OPTI-MEM supplémenté avec 2% de sérum de bovin fœtal, 100 U/ml pénicilline et 100 µg/ml streptomycine. Les cellules ont été cultivées à différentes densités, dépendamment des expériences, sur des Pétris de 35 mm ou des lamelles de verre recouvertes de poly-L-lysine et maintenues à 37 C dans un atmosphère humide de 95 % air / 5% CO₂ et utilisées entre 1 et 3 jours de culture (Gallo-Payet et Payet 1989). Les cellules ont été examinées tous les jours en contraste de phase et des images ont été prises à l'aide d'un microscope Leica Corp. (Deerfield, IL) équipé d'un objectif 32x .

3.3 RT-PCR

Les cellules glomérulées ont été isolées comme décrit précédemment et mises en culture à une densité de 5×10^5 cellules dans des Pétris de plastique (polystyrène traité pour la culture cellulaire) de 35 mm. Les cellules ont été lysées dans 350 µl de solution *Lysis/binding solution* dans des tubes de type Eppendorff et brassées par inversion. L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide de la méthode RNAqueous selon le guide du manufacturier (Ambion, Texas). L'ARN a été isolé avec 160 µl de la solution d'élution et précipité en présence 0.1 volume (16 µl) d'acétate d'ammonium (5 M) et 0.01 volume (1.6 µl) d'acrylamine linéaire. L'ARN a ensuite été dissous dans la solution d'élution et la concentration a été déterminée par densité optique (260 nm). La même quantité d'ARN pour chaque préparation a été convertie en cDNA à l'aide de 5 µg d'ARN, oligo d(T) (5 U), dNTP (10 mM) de Amersham, Pharmacia Biotech (NJ,

USA), DTT (0.1 M), M-MLV, First 5X M-MLV buffer et RNasine (tous de Promega, WI). Le cDNA a été utilisé pour chaque réaction de PCR qualitatif en utilisant les amorces de séquences publiées ou conçues à partir des séquences GeneBank. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :1) intégrine $\alpha 1$: sense: 5' CTA CAA GAT GGA GGA TGG G'3; anti: 5' GCC TCA GTG AAT CAA GGG'3; 2) GAPDH,: sense: 5'CGC TGA GTA CGT CGT GGA GTC'3; anti: 5' TTG GTG GTG CAG GAG GCA TTG C'3. GAPDH a été utilisé comme contrôle de l'intégrité de l'ARN. Les réactions de PCR ont été réalisées à l'aide de: 4 μ l of cDNA, dNTP (10 mM), Taq Polymerase (Amersham, Pharmacia Biotech, NJ) et 10X Taq Polymerase PCR buffer (Amersham). L'amplification a été réalisée avec un appareil Perkin-Elmer amplification system. Pour visualisation, 10 μ l du produit de PCR a été mis sur gel d'agarose 2% dans du tampon TRIS-acetate-EDTA (TAE) avec bromure d'éthidium 0.1 μ g/ml. Après électrophorèse, le gel a été scanné par Fluorimager.

3.4 IMMUNOHISTOCHEMIE

Pour les expériences d'immunohistochimie, des coupes paraffines, fixées au formol ou zinc, de 5 μ m ont été déparaffinées et réhydratées avec des solutions décroissantes d'éthanol. Les coupes ont été rincées dans de l'eau et submergées dans une solution « unmasking antigen solution » (Vector Laboratories). Les coupes ont ensuite été incubées dans 0.3% H₂O₂/H₂O pendant 30 min à 4 C afin de détruire l'activité peroxidase endogène. Après lavage dans du PBS (136.89 mM NaCl; 2.68 mM KCl; 18.88 mM Na₂HPO₄ et 1.76 mM KH₂PO₄, pH. 7.4), les coupes ont été incubées dans une solution de avidin/biotin pendant 30 min. L'incubation des coupes dans du « normal serum 1.5% » a été suivie de l'incubation avec l'anticorps anti-BKCa (Large

conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel) ou $\alpha 8$ intégrine pendant 60 min à température pièce ou toute la nuit à 4 C. Les coupes ont ensuite été lavées et incubées avec le second anticorps biotinylé et le réactif Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Laboratories). La réaction peroxidase a été réalisée avec l'utilisation du 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) en présence de 0.05% H₂O₂ comme chromogène (Sigma) et contre marqué avec l'hématoxyline. Les coupes ont été déshydratées et montées avec une solution Vectamount Permanent solution (Vector Laboratories). Les contrôles négatifs ont été réalisés en incubant l'anticorps primaire avec un peptide contrôle spécifique ou en faisant bouillir les anticorps pendant 15 min avant utilisation.

3.5 TIRF (TOTAL INTERNAL REFLECTION FLUORESCENCE)

Afin de visualiser la sous-unité d'intégrine $\alpha 5$ à l'aide de la technique de TIRF, les cellules ont été marquées comme mentionné plus haut. Les cellules glomérulées de surrénale de rat adulte (50 000) ont été obtenues comme décrit plus haut et mises en culture pendant 3 jours sur les lamelles de FN. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS et fixées avec 3.7% formaldéhyde pendant 15 min à 4°C. Après lavages dans du PBS, les cellules ont été incubées avec de la glycine (0.1 M) pendant 30 min à température pièce et perméabilisées avec 0.1% de Triton-100X. Les sites non-spécifiques ont été bloqués avec 0.5% BSA pendant 60 min à température pièce et les cellules incubées avec l'anticorps anti-intégrine $\alpha 5$ pendant 60 min à température pièce ou toute la nuit à 4 C. Les cellules ont été lavées avec PBS et incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à l'Alexa-488 (dilution 1:500) pendant 60 min à température pièce. Les cellules ont été lavées deux fois et recouvertes d'une lamelle de verre pour visualisation avec du Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Les contrôles négatifs ont été effectués en bouillant l'anticorps 15 min avant l'utilisation. Pour visualisation, un laser bleu (488 nm) a été utilisé.

3.6 IMMUNOCYTOCHIMIE INDIRECTE

Les cellules glomérulées de surrénale de rat adulte (50 000) ont été obtenues comme décrit plus haut et mises en culture sur les lamelles ou dans des boîtes de Pétri de 35 mm. Après, 24, 48 h ou 72 heures, les cellules ont été stimulées comme requis. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS et fixés avec 3.7% formaldéhyde pendant 15 min à 4°C. Après lavage dans du PBS, les cellules ont été incubées avec de la glycine (0.1 M) pendant 30 min à température pièce et perméabilisées avec 0.1% de Triton-100X. Les sites non-spécifiques ont été bloqués avec 0.5% BSA pendant 60 min à température pièce et incubés avec l'anticorps anti-Kv10.1 pendant 60 min à température pièce ou toute la nuit à 4 C. Les cellules ont été lavées avec PBS et incubées avec l'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à l'Alexa-488 (dilution 1:500) pendant 60 min à température pièce. Les cellules ont été lavées deux fois et recouvertes d'une lamelle de verre pour visualisation avec du Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les contrôles négatifs ont été effectués en bouillant l'anticorps 15 min avant l'utilisation ou en incubant l'anticorps avec le peptide contrôle.

3.7 IMMUNOBUVARDAGE DE TYPE WESTERN BLOT

Les cellules glomérulées ont été obtenues comme mentionné plus haut et mise en culture à une densité de 750 000 cellules dans des Pétri de plastique de 60-mm. Les boîtes de Pétri sont placées sur glace, les cellules lavées deux fois avec du PBS froid et

lysées dans du milieu RIPA (« radioimmune precipitation assay buffer ») modifié (50 mM NaCl, 1% Triton 100-X, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, contenant des inhibiteurs de protéases) pendant 30 min à 4 C. Les lysats cellulaires sont centrifugés pendant 10 min à 10 000g et la concentration en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford.

IMMUNOBLOTS— Pour l'immunobuvardage des composantes de la MEC, les protéines ont été fractionnées sur un gel SDS-PAGE standard d'acrylamide 8% et transférer sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad) dans 150 mM glycine, 20 mM Tris-base, et 20% méthanol. Les membranes sont bloquées toute la nuit à 4 C dans du TBS-T (tampon Tris-salin, 0.2% Tween-20) contenant 5% (w/v) lait évaporé non-gras. Les membranes ont ensuite été incubées toute la nuit avec les anticorps primaires anti-Col I (dilution 1:500), Col IV (dilution 1:500), LN (dilution 1:500) et FN (dilution 1:250). Après trois lavages dans du TBS-T, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxidase (dilution 1:2000) pendant 1 h à température pièce. Les membranes ont été lavées 4 fois dans du TBST, et le complexe a été visualisé avec le système ECL Plus detection system (Amersham Biosciences).

3.8 IMMUNOCYTOCHIMIE DIRECTE et DOUBLE IMMUNOCYTOCHIMIE

Pour analyser la sécrétion de protéines de la MEC par les cellules glomérulées, 50 000 cellules ont été obtenues comme décrit plus haut et mises en culture dans des boîtes de Pétri de 35 mm. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS et fixées avec 3.7% formaldéhyde pendant 15 min à 4°C. Après lavages dans du PBS, les cellules ont été incubées avec de la glycine (0.1 M) pendant 30 min à température pièce. Aucune perméabilisation n'a été effectuée pour les expériences de sécrétion des protéines de la MEC. Les cellules ont été incubées toute la nuit à 4C avec les anticorps aux dilutions

suivantes: anti-Col I (1:50); anti-Col IV (1:80); anti-FN (1:50) et anti-LN-I (1:50). Après deux lavages, les cellules ont été incubées avec des anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris conjugués à l'Alexa-488 (dilution 1:500) pendant 60 min à température pièce. Les cellules ont été lavées deux fois et recouvertes d'une lamelle de verre pour visualisation avec du Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les contrôles négatifs ont été effectués en bouillant l'anticorps 15 min avant l'utilisation.

Pour les expériences de double immunofluorescence, les anticorps dérivés d'une même source ont été couplés à des fragments d'anticorps Fab liés à différents fluorophores (Alexa-488 ou Alexa-594) à l'aide des kit Zenon® Alexa Fluor® 488 Rabbit IgG Labelling Kit ou Zenon® Alexa Fluor® 594 Rabbit IgG Labelling Kit (Molecular Probes, Eugene, OR).

3.9 MESURE D'ALDOSTERONE

Pour chaque expérience, le milieu de culture cellulaire a été aspiré et les cellules ont été lavées avec du milieu Hanks' buffered saline (HBS; 130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.5 mM NaHCO₃, and 5 mM HEPES) froid additionné avec 1 g/litre de glucose et 0.5% BSA. Les cellules ont été incubées dans 1 ml d'une solution consistant en 0.9 ml HBS-glucose supplémenté avec 0.5% BSA-0.1 mg/ml bacitracin et 0.1 ml de stimulus. Après 2 heures d'incubation à 37 C dans un environnement à 95% air-5% CO₂, le milieu d'incubation est aspiré et congelé à -20 C jusqu'au moment de la mesure du contenu en stéroïdes déterminée par RIA, en utilisant un anticorps spécifique et un stéroïde tritié comme traceur.

4. RÉSULTATS

4.1. Article #1: Expression of extracellular matrix components and their integrins receptors in the adult rat adrenal gland: a role in cell proliferation and secretion.

Article soumis le 17 janvier 2006 au journal Cell & Tissue Research. Auteurs: Campbell, Shirley; Otis, Mélissa; Gallo-Payet, Nicole; Payet, Marcel. Manuscript No. CTR-06-0024.

January, 19th

Expression of extracellular matrix components and their integrin receptors in the adult rat adrenal gland: a role in cell proliferation and secretion.

SHIRLEY CAMPBELL, MELISSA OTIS, NICOLE GALLO-PAYET AND MARCEL DANIEL PAYET

Department of Physiology and Biophysics (S.C., N.G.-P., M.D.P) and Service of Endocrinology (N.G.-P., M.O.), Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 5N4.

Correspondence and reprint requests to: Dr. Marcel D. Payet,
Department of Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine,
Université de Sherbrooke,
3001, 12th Ave North, Sherbrooke, Quebec, Canada J1H 5N4.
Tel: 819-564-5243
Fax: 819-564-5399
email: Marcel.Payet@USherbrooke.ca

Abstract

The binding of integrins to their extracellular matrix (ECM) components triggers intracellular signalling pathways that are involved in many aspects of cell physiology. This study was aimed at investigating the presence of ECM components and integrins in the adult rat adrenal gland. Collagen type I, collagen type IV, laminin and fibronectin were differentially expressed in the cortex and the medulla. Integrin subunits $\alpha 1$ showed strong labelling in the adrenal medulla while $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ showed strong staining in the cortex. Integrin subunits $\alpha 8$ and $\beta 1$ were detected throughout the entire gland. We also investigated how the ECM can modulate adrenocortical cells functions. All matrices promoted cell proliferation: in glomerulosa cells, proliferation was increased from 2-fold (fibronectin), to 3-3.5-fold respectively for collagen I and IV, compared to plastic. In fasciculata cells, proliferation was increased by two-fold for all matrices. Glomerulosa and fasciculata cells cultured on plastic, fibronectin or collagen I and IV exhibited polygonal morphology, whereas cells grown on laminin appeared as clusters of rounded cells. Fibronectin increased aldosterone secretion in glomerulosa cells, but did not modify corticosterone secretion in fasciculata cells. Collagens I and IV increased corticosterone and aldosterone secretion in both cell types by 2.5 fold, conversely to laminin which decreased their secretion by 2- and 3-fold respectively, comparatively to plastic. This differential and zone-specific localization of ECM components and their associated integrins provides important insight in the understanding of specific functions, such as proliferation and secretion, relative to the distinct and specialized regions of the adrenal cortex.

Key Words: adrenal glands, integrins, extracellular matrix, immunofluorescence, steroids.

Introduction

Cells interact with their respective environment through the binding of integrin receptors located on plasma cell membranes with proteins found in the ECM (Tamkun et al., 1986). Integrins are transmembrane proteins comprised of two subunits, alpha (α) and beta (β) (for review, see (Albelda and Buck, 1990; Hynes, 1992; Sastry and Horwitz, 1993; Sonnenberg, 1993; Aplin et al., 1998; Giancotti, 2000; Humphries, 2000)) and constitute the predominant family of proteins mediating cell-cell and cell-matrix interactions (Hynes, 1992). One of the first significant roles identified for integrins was their ability to promote cell adhesion (Albelda and Buck, 1990; Cheresch, 1992; Hynes, 1992; Bosman, 1993). Over time, it has been shown that integrins can also mediate intracellular signalling pathways leading to cellular proliferation, differentiation and survival (Haack and Hynes, 2001; Vacca et al., 2001), for a review, see: (Schwartz, 1992; Giancotti, 1997, 2000; Schwartz, 2001).

Collagens (Col) are the most abundant proteins in mammals, representing approximately 25 % of total protein content. Over 20 collagen isoforms have been described and are essentially divided into two groups: fibrillar and non-fibrillar collagens. The most frequently encountered isoforms are collagen type I (Col I) and collagen type IV (Col IV), the latter being an essential component of basal membranes (for review, see: (Prockop and Kivirikko, 1995; Ottani et al., 2002; Gelse et al., 2003)). Collagens are the result of the linkage of three alpha subunits, although their manner of association is poorly understood. Collagen found in the matrix can associate with other proteins to form a well-structured network. It has been shown that integrins $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$ and $\alpha v\beta1$ can bind collagen according to different recognition sites (for review, see: (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999; van der Flier and Sonnenberg, 2001)).

Laminin (LN) is a well-characterized matrix protein (for review see: (Tunggal et al., 2000; Aumailley et al., 2003; Ekblom et al., 2003; Sasaki et al., 2004)). LNs are comprised of three subunits: α , β and γ with various known isoforms for each subunit (Tunggal et al., 2000; Miner and Yurchenco, 2004). LN-binding integrins include $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha7\beta1$ and $\alpha6\beta4$ (for review, see: (Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999; Mizejewski, 1999; van der Flier and Sonnenberg, 2001)).

Fibronectin (FN) is present in plasma in soluble form as well as in ECM in an insoluble form (Mosher, 1984; Ruoslahti, 1988; Aota and Yamada, 1995; Romberger, 1997). Integrin $\alpha 5\beta 1$ is specific for FN, although integrin $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 6$ are also able to bind FN (Wayner et al., 1989; Guan and Hynes, 1990; Mould et al., 1990; Mould and Humphries, 1991); (for review, see: (Sonnenberg, 1993; Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999; Mizejewski, 1999; van der Flier and Sonnenberg, 2001)).

Several studies have shown that the extracellular microenvironment can orchestrate a number of cell functions such as proliferation, migration and steroidogenesis (Meredith et al., 1996; Aplin et al., 1998). However, little is known as to the presence and localization of integrins and the main components of ECM in the adrenal gland. The adrenal gland is composed of two regions distinct in their function, the adrenal cortex and the adrenal medulla. The adrenal cortex is subdivided into three zones and is involved in steroid secretion. The outer zone, surrounded by the capsule, is called the zona glomerulosa (ZG). ZG cells secrete the mineralocorticoid aldosterone, a hormone responsible for sodium reabsorption and potassium excretion. The zona fasciculata (ZF) secretes glucocorticoids: cortisol in humans and corticosterone in rodents. The inner zone, called the zona reticularis (ZR), contains sex hormone-secreting cells. In humans, ZR cells are responsible for secreting DHEA (deshydroepiandrosterone) and its sulphated metabolite DHEA-sulphate while, in rodents, they are responsible for secreting corticosteroids (for a review, see (Vinson, 2003)). While all adrenocortical cells in rodents have the capacity to produce corticosterone, only ZG cells have the capacity/property to produce aldosterone. Finally, cells in the adrenal medulla, located in the central portion of the gland, secrete catecholamines and neuropeptides.

As reviewed recently, differential expression of FN and LN is observed from the periphery toward the center of the bovine gland, which is associated with cell-specific functions (Pellerin et al., 1997; Feige et al., 1998). A recent publication from our group pointed to a role of a fibronectin matrix on basal proliferation of adult rat adrenal glomerulosa cells in culture (Campbell et al., 2003). We have also shown that aldosterone secretion induced by Ang II or ACTH is increased on a fibronectin matrix in adult rat glomerulosa cells (Campbell et al., 2003).

The aim of the present study was therefore to document the localization of the main components of the ECM and their putative associated integrins in the rat adrenal gland

as well as their possible role in proliferation and secretion of glomerulosa and fasciculata cells in culture.

Material and Methods

Chemicals

The chemicals used in the present study were obtained from the following sources: Minimum Essential Medium (MEM Eagle's medium) and OPTI-MEM medium from Life Technologies (Burlington, Canada). Matrix-coated dishes and coated 24- and 96-well plates (collagen I, IV, fibronectin and laminin) were obtained from BD-VWR Canlab (Ville Mont-Royal, Canada). The Zenon Rabbit labelling kits were from Invitrogen Canada (Burlington, Ontario, Canada); rabbit anti-LN antibody from Sigma (St-Louis, MO); rabbit anti-FN, rabbit anti-Col I and rabbit anti-DBH antibodies from Chemicon International (Temecula, CA) and anti-Col IV from Cedarlane (Hornby, Ontario, Canada). The antibodies against $\beta 1$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ integrins subunits were all from Chemicon International. Avidin/biotin blocking kit, unmasking antigen solution, normal serum and mounting mediums were all from Vector Laboratories (Burlingame, CA). Collagenase, [^3H]aldosterone (76 μCi / mmol) and [^3H]corticosterone (70 μCi / mmol) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA); aldosterone and corticosterone antiserum from ICN Biochemicals (Costa Mesa, CA); BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine) and anti-BrdU Alexa Fluor-594 from Molecular Probes (Eugene, OR). All other chemicals products were of A-grade purity.

Immunofluorescence

Use of antibodies were optimized using either paraffin or frozen sections. Tissue sections from paraffin-embedded adrenal glands were used to determine the presence of integrin subunits within the whole adrenal gland while frozen sections were used to determine the presence of ECM components. Adult adrenal glands from female Long Evans rats (250 g) were removed and snap-frozen in OCT. Animal protocols were approved by our institution's animal care and ethics committee and followed ethical guidelines from the Canadian Council on Animal Care. For ECM localization experiments, 5-6 μm frozen sections were fixed with 3.7 % formaldehyde for 15 min at 4C, washed in PBS (136.89 mM NaCl; 2.68 mM KCl; 18.88 mM Na_2HPO_4 and 1.76 mM KH_2PO_4 , pH. 7.4) and incubated with glycine 0.1M for 30 min at room temperature. Sections were then treated with Triton X-100 0.2%, washed and incubated with 1.5 % normal goat serum for 45 min. Dilutions of antibodies were as follows: anti-

Col I (1:50); anti-Col IV (1:80); anti-FN (1:50) and anti-LN (1:50). Overnight incubation with the primary antibodies was followed by incubation with a goat secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Sections were washed with PBS, the nuclei stained with DAPI and sections mounted with Vectashield mounting medium for subsequent observation (Vector Laboratories). Non-specific labelling was assessed by boiling the primary antibodies for 15 min.

For double staining immunofluorescence experiments, antibodies derived from the same species were used to label anti-ECM component antibodies. For ECM components and DBH labelling, ECM component antibodies were conjugated with Zenon® Alexa Fluor® 488 Rabbit IgG Labelling Kit while a goat anti-rabbit antibody conjugated to Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, Eugene, OR) was used to detect anti-DBH antibody.

For integrin immunostaining, 5 µm-thick sections of rat adrenal glands were fixed in formalin and embedded in paraffin. After removal of paraffin and rehydration of tissue sections according to classical histological procedures, sections were immersed in 0.1% SDS/H₂O and washed with PBS. Dilutions of antibodies were as follow: anti-β1 (1:500); anti-α1, -α2, -α3, -α5 (1:500). Overnight incubation with primary antibodies was followed by incubation with a goat secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488. Sections were washed with PBS, nuclei stained with DAPI and sections mounted with Vectashield mounting medium for subsequent observation. Non-specific labelling was assessed by boiling the primary antibodies for 15 min. Images were acquired with a Hamamatsu, ORCA-ER digital camera attached to Nikon Eclipse TE-2000 inverted microscope (Nikon Canada) equipped for epiillumination

Image analysis of colocalized ECM components

Binary images were generated for respective acquisitions of fluorescent ECM components using Metamorph (version 4.6r10) software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). Binary images for each pair of ECM components under study were analysed (AND Boolean operation) to determine the colocalisation of ECM components. Data are representative illustrations of 3 to 6 slides prepared from 3 different animals.

Preparation of cell cultures

Glomerulosa and fasciculata cells were obtained from adrenal glands of female Long Evans rats weighing 200-250 g, and isolated according to the method previously described in detail (Gallo-Payet and Payet, 1989). All protocols were approved by the Animal Care and Ethics Committee of our institution. Isolation and cell dissociation of the zona glomerulosa were performed in MEM (supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). After a 20-min incubation at 37°C with collagenase (2 mg/mL) and deoxyribonuclease (25 µg/mL), cells were disrupted by gentle aspiration with a sterile 10 ml pipette, filtered and centrifuged for 10 min at 100 X g. The cell pellet was then resuspended in OPTI-MEM medium supplemented with 2% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin.

Capsule and zona glomerulosa were separated from the remaining gland by a small incision at the capsule level. The presence of the zone intermedia facilitated the separation of the zona glomerulosa and zona fasciculata. The zona fasciculata was cut into small sections, then into thin slices and incubated with collagenase (2 mg/mL) for 30 min at 37°C. The successive steps of zona fasciculata isolation and cell dissociation were performed in MEM (supplemented with 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) and were identical to that for the zona glomerulosa.

According to experimental conditions, cells were plated at various densities on fibronectin, laminin, collagen I or IV-coated or plastic Petri dishes (at 5×10^4 cells for morphology and at 2×10^5 cells/well for steroid secretion) or 96-multiwell plates (at 30×10^3 cells/well for proliferation assays). Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere composed of 95% air / 5% CO₂. The culture medium was changed daily and the cells used after 3 days of culture. Cells were examined daily and phase contrast images were taken using a Leica microscope (Deerfield, IL) equipped with a 32X objective.

For morphological observations, cells were plated at a density of 5×10^4 cells on various matrices. Cells were observed after 3 days in culture with a phase-contrast Leica microscope equipped with a Canon digital camera.

Steroid measurements

Prior to each experiment, the medium from cultured cells was aspirated and cells washed twice with cold Hanks' buffered saline (HBS; 130 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.8

mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 2.5 mM NaHCO₃, and 5 mM HEPES) supplemented with 1 g/liter glucose and 0.5% BSA. Cells were incubated in a 1 ml solution consisting of 0.9 ml HBS-glucose supplemented with 0.5% BSA-0.1 mg/ml bacitracin and 0.1 ml of stimuli. After a 2-h incubation at 37°C in a 95% air-5% CO₂ environment, the incubation medium was removed by aspiration and stored at -20°C until assayed for steroid content. The latter was determined by RIA, using specific antisera and tritiated steroid as tracer.

Proliferation assays

Cell proliferation was measured using fluorescence BrdU incorporation, as described previously (Otis et al., 2005). Cells were plated on plastic, laminin-, fibronectin-, collagen I and collagen IV-coated 96-well plates, at a concentration of 30×10^3 cells/well. After 24 h of culture, 10 μ M BrdU was added to the culture medium. On the third day, cells were fixed with 3.7% (vol/vol) formaldehyde in HBS for 10 min at room temperature, followed by a 10-min permeabilization treatment with 0.2% Triton X-100 in HBS. Cells were then incubated with anti-BrdU Alexa Fluor-594 (1:500). Fluorescence intensity was measured using a Microplate Fluorescence Reader FL600 (Bio-Tek) (Excitation: 560/40 nm; Emission: 645/40 nm). Results are expressed as the percent of variation from basal conditions using six culture wells for each experimental condition. Cell number was also assessed using a standard hemacytometer.

Protein synthesis measurements

The relative amount of protein synthesis was also determined by assessing tritiated phenylalanine incorporation. Cells were plated on plastic or matrix-coated 24-well plates at a concentration of 70×10^3 cells/well. After 24 h of culture, 1 μ Ci / ml of [3 H]-phenylalanine was added to the media. After 3 days, the medium was aspirated and cells washed three times with cold HBS solution, followed by addition of trichloroacetic acid solution (20 %) (TCA) for 20 min on ice. After centrifugation (3,000 X g, 15 min, 4 C), the TCA-insoluble fraction was washed twice with TCA solution and solubilized in 0.1N NaOH solution for 1 h on ice. Incorporation of radioactivity was measured by liquid scintillation counting (Beckmann counter). Data were normalized as maximum of phenylalanine incorporation in control conditions for the same number of cells (1×10^5 cells), as described by Otis et al. (Otis et al., 2005).

Data analysis

The data are presented as means \pm S.E. of the number of experiments indicated in parentheses. Homogeneity of variance was assessed by one-way analysis of variance ANOVA followed by Bartlett's test; p values were obtained from Dunnett's tables.

Results

Detection of ECM components in whole rat adrenal gland

Comparative analyses of Col I, Col IV, LN and FN staining were performed both in the cortex (Fig. 1) and in the medulla (Fig. 2), where chromaffin cells were identified by immunoreactivity to an anti-dopamine beta hydroxylase (DBH) enzyme. Col I staining was mainly expressed in the capsule and surrounding each glomerulosa cell (Fig. 1A and E, inset). In the medulla, Col I was rather expressed around clusters of chromaffin cell (Fig. 2A and E).

Col IV exhibited moderate labelling in the capsule but strong labelling in the ZF. In the zona glomerulosa, Col IV was observed surrounding each cell (Fig. 1B and F), while in the ZF, Col IV presented as long thick fibrils between the radial cords of fasciculata cells (Fig. 1B and F). Col IV was also clearly shown surrounding clusters of chromaffin cells (Fig. 2B and F).

LN was observed primarily in the ZG, with thin fibrils penetrating both the ZF and ZR (Fig. 1C and G). The strongest labelling was found in the adrenal medulla, surrounding blood vessels and clusters of chromaffin cells (Fig. 2C and G).

FN was expressed throughout the adrenal gland cortex. Staining was moderate in the capsule while strong labelling was observed surrounding each glomerulosa cell and as discontinuous fibrils throughout the cortex (Fig. 1D and H). In the medulla, FN localization was restricted to outlining chromaffin cell clusters, but not individual chromaffin cells (Fig. 2D and H). FN, LN, Col I and Col IV non-specific staining was assessed by boiling the antibody 15 min prior to detection and shown in Fig. 1I to L.

Components of the ECM interact with each other to form a structured network in supporting various cell functions (Kalluri, 2003). In order to determine the putative association between these components, double immunofluorescence with Zenon technology was used as described in Materials and Methods. For each immunofluorescence image, a binary image was generated. The two binary images were then processed with Metamorph imaging software to extract only the information pertaining to colocalized elements, along a varying gradient according to the matrices used. For example, Col I (labelled with Alexa Fluor 488, green) and Col IV (Alexa Fluor 594, red) showed similar partial colocalization throughout the cortex (Fig. 3A (yellow) and A'), while colocalization of Col I (green) and LN (red) was higher in ZG and in the adrenal capsule comparatively to that in ZF (Fig. 3B and B'). In contrast, Col

I (green) and FN (red) exhibited a lower gradient of colocalization in ZG and external portion of ZF than in the inner region of the ZF (Fig. 3C and C'). Col IV (red) and LN (green), as well as Col IV (red) and FN (green) were colocalized both in the ZG (Fig. 3D and D') and ZF (Fig. 3E and E'), while Col IV expression was greater than FN in the capsule (Fig. 3E and E'). Finally, FN (green) and LN (red) were also colocalized in ZG and ZF (Fig. 3F and F'), with a gradient decreasing from the ZG toward the inner portion of the gland. In addition, FN exhibited exclusive staining in some regions the ZG as demonstrated by FN-specific green labelling (arrow, Fig 3F).

Detection of integrin subunits in the whole rat adrenal gland

The presence of integrin subunits that bind the various above-mentioned ECM components was also verified. Since the $\beta 1$ integrin subunit is ubiquitous, the presence of this subunit in the adrenal gland was first verified using paraffin-embedded sections. Integrin subunit $\beta 1$ was observed throughout the cortex (Fig. 4A) with labelling found in and surrounding the various cells types (glomerulosa, fasciculata and chromaffin cells) (Fig. 4B, C). Fig. 4D shows non-specific labelling for integrin subunit $\beta 1$.

As the specificity of integrin interaction is achieved through the association of the β subunit with various α subunits, the next step consisted in identifying α subunit expression in the rat adrenal gland. Integrin $\alpha 1$ was present throughout the gland, with highest labelling concentrated in the medulla (Fig. 5A and E). As seen in Fig. 5A, chromaffin cells formed extensions from the medulla into the cortex, called medullary rays (Gallo-Payet et al., 1987), where chromaffin cells invade the neighbouring ZG (Fig. 5I). These cells were observed to be catecholamine-secreting cells, as evidenced by positive DBH enzyme labelling (Fig. 5M).

Expression patterns of the $\alpha 2$ integrin subunit were opposite to that observed for $\alpha 1$, with labelling more intense in the cortex than in the medulla (Fig. 5B and F). However, a few catecholamine-secreting cells in the adrenal medulla did demonstrate some moderate and diffuse staining for the $\alpha 2$ integrin subunit (Fig. 5F and 5N). Fig. 5J reveals the presence of the $\alpha 2$ integrin subunit in cells from both the ZG and ZF.

The $\alpha 3$ integrin subunit was found throughout the rat adrenal gland with labelling limited to the cortex (Fig. 5C and K), although some occasional labelled cells were observed in the medulla (Fig. 5G, O).

The $\alpha 5$ subunit showed strong staining in the cortex (Fig. 5D, L) and, similarly to $\alpha 2$ and $\alpha 3$, some sparse labelling limited to scattered cells in the medulla (Fig. 5H and P).

Morphology and function of adrenal cells grown on collagen I, collagen IV, laminin and fibronectin matrices.

In order to investigate the influence of matrices on zona glomerulosa and zona fasciculata cell morphology, cells were cultured on plastic (PL), collagen I-, collagen IV-, laminin and fibronectin-coated Petri dishes. As shown in Fig. 6, cell morphology clearly varied according to the underlying matrices used. After three days of culture, both ZG (Fig. 6A, B, C) and ZF (Fig. 7A, B and C) cells grown on plastic, collagen I, collagen IV formed a monolayer of cells with similar polygonal morphology. In contrast, cells grown on laminin appeared as clusters of small rounded cells (Fig. 6 D and 7D). A notable difference was also observed in cells cultured on FN, where ZG cells exhibited polygonal morphology (Fig. 6E) while ZF cells appeared as clusters of small rounded cells (Fig. 7 E). Cell density was ranked as follows: Col I = Col IV > FN > PL.

Since ZG cells displayed somewhat different cells sizes depending on the underlying matrix, incorporation of tritiated phenylalanine was therefore determined in order to ascertain any changes in protein content/synthesis. Firstly, tritiated phenylalanine incorporation was higher in ZF cells comparatively to ZG cells (2.4X, data not shown). Secondly, when compared to cells plated on plastic, ZG cells plated on Col I and Col IV exhibited similar protein content, while ZG cells plated onto LN or FN had a lower protein content (Fig. 6F); except for Col IV, where protein content was similar to ZF cells cultured on Col I, LN or FN (fig. 7F).

Proliferation of ZG and ZF cells were respectively compared in cells grown on the above four matrices. As previously reported (Gallo-Payet and Payet, 1989) ZG cells easily proliferated in culture, doubling their number after two days comparatively to ZF cells, which grew more slowly. In ZG cells, all matrices significantly increased cell proliferation, with respective values of 313 ± 15 , 373 ± 21 , 294 ± 17 and 203 ± 17 percent of control cells grown on plastic (set at 100%) for Col I, Col IV, LN and FN (Fig. 8A). As shown in Fig. 8B, proliferation of ZF cells was also stimulated, with

values of 153 ± 14 , 197 ± 15 , 186 ± 12 and 163 ± 19 percent relative to controls (cells grown on plastic, set at 100%) respectively for Col I, Col IV, LN and FN.

Finally, the influence of matrices on cell ZG and ZF steroid secretion was also investigated. As shown in Fig. 9A, collagen I, collagen IV and fibronectin matrices increased basal aldosterone secretion with values of 196 ± 5.82 , 186 ± 6.07 and 168 ± 4.38 pg/ml/300 000 cells, respectively when compared to plastic (116 ± 2.3). In ZF cells, corticosterone secretion was stimulated by collagen I and IV (88 ± 1.50 and 107 ± 1.90 ng/ml/300 000 cells), respectively when compared to plastic (40 ± 1.56), but was not affected by fibronectin (40 ± 0.76 ng/ml/300 000 cells) (Fig. 9B). Conversely, laminin clearly decreased steroid secretion in both cell types (aldosterone 56 ± 1.89 pg/ml/300 000 cells and corticosterone 9 ± 0.50 ng/ml/300 000 cells).

Discussion

The current work presents an exhaustive study regarding the localization of ECM components and integrins within the adult rat adrenal gland in addition to establishing a link between ECM, cell proliferation and steroid secretion.

Influence of extracellular matrix and integrins on functional properties of ZG cells.

The zona glomerulosa is under multifactorial regulation *i.e.* ACTH, Angiotensin II, potassium as well as several neuropeptides and neurotransmitters (Ehrhart-Bornstein et al., 1998). The only available studies regarding the role of ECM in the adrenal gland have described the expression of some ECM proteins and thrombospondins in the bovine adult adrenal cortex (Pellerin et al., 1997). It was shown that FN as well as LN increases bovine adrenocortical cell migration both by haptotaxis and chemotaxis (Pellerin et al., 1997). The present study further reveals that the binding of integrin to ECM components is involved in aldosterone secretion and proliferation, two main functions of zona granulosa cells.

Binding of integrins to ECM components is not highly specific since combinations can be formed. Indeed, the $\alpha 1\beta 1$ integrin can bind Col and LN and is found in many tissues and cell types (Mizejewski, 1999; Cosgrove et al., 2000; Qin et al., 2003). Col and LN both bind the $\alpha 2\beta 1$ integrin (Dickeson et al., 1998; Mizejewski, 1999; Tulla et

al., 2001) while the $\alpha 3\beta 1$ integrin can bind Col, LN and as well FN (Elices et al., 1991; DiPersio et al., 1995; Mizejewski, 1999). Integrin $\alpha 5\beta 1$ is specific for FN, but integrin $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 6$ can also bind FN (Wayner et al., 1989; Guan and Hynes, 1990; Mould et al., 1990; Mould and Humphries, 1991); (for review, see: (Sonnenberg, 1993; Aota and Yamada, 1995; Gonzalez-Amaro and Sanchez-Madrid, 1999; Mizejewski, 1999; van der Flier and Sonnenberg, 2001)).

In the adult rat adrenal gland, Col I was found to be present throughout the adrenal gland with strong labelling in the zona glomerulosa and gland capsule, forming a network similar to that described by Kikuta et al using electron microscopy (Kikuta et al., 1991). Distribution of Col I labelling appeared convoluted in both the capsule and glomerulosa. Col IV staining was similar to Col I, but with weaker labelling of the capsule. LN labelling was strong in the capsule and around each individual glomerulosa cell. FN displayed a distribution pattern similar of that observed for Col I and LN with a tortuous arrangement in the zona glomerulosa. These results in the rat differ from observations reported both for the bovine adrenal gland where FN was especially expressed in the medulla and inner zones of the cortex with weak expression in the zona glomerulosa (Pellerin et al., 1997; Feige et al., 1998) and for the human adult adrenal gland where FN exhibited a centripetal gradient of expression increasing from the capsule towards the central portion of the gland (Birembaut et al., 1980).

The role of ECM in cell physiology arises from its binding to integrins. Since the integrin $\beta 1$ subunit is associated with many α subunits (Hynes, 2002) it was not surprising to find strong labelling of $\beta 1$ subunit in the capsule and in the glomerulosa. A significant observation was the difference in α integrin expression between cortex and medulla. The $\alpha 1$ subunit was barely detectable in the capsule and ZG while $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ were primarily expressed in the cortex. In the adult human adrenal gland, the $\alpha 2$ integrin subunit appears to be expressed on glandular cells in the ZG while $\alpha 3$ integrin subunits expression is confined to the epithelial cells of the cortex (Virtanen et al., 2003).

The binding of integrins and ECM components is crucial in several physiological processes such as adhesion, migration, proliferation, differentiation, apoptosis and hormones secretion. Pioneer work of Ill (Ill and Gospodarowicz, 1982) and Cheng (Cheng and Hornsby, 1992) emphasized the role of ECM components in the adrenal gland, which were later confirmed by further in-depth studies (reviewed by Campbell et

al., (Campbell et al., 2004)). In adrenocortical cells, LN and FN were shown to enhance cell migration while thrombospondin-1 and 2 did not (Pellerin et al., 1997). On the other hand, cells grown on a collagen gel matrix enhanced the duration of aldosterone secretion (Fujiyama et al., 1993) while a FN matrix alone increased the rate of proliferation of glomerulosa cells as opposed to a poly-l-lysine substrate (Campbell et al., 2003).

Type I and type IV collagens both bind to $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$ integrins, all of which are expressed in the zona glomerulosa. The activation of the above integrins by ECM components could be involved in aldosterone secretion and proliferation of glomerulosa cells by Col I and Col IV. In adult rat glomerulosa cells, the increase in aldosterone secretion as well as the increase of proliferation by a FN matrix could involve the activation of the $\alpha 5\beta 1$ integrin. By contrast, the LN matrix was found to decrease aldosterone secretion while increasing cell proliferation.

On plastic, Col I, Col IV and FN-coated dishes, glomerulosa cells exhibited a polygonal structure and were well attached to the substratum. In contrast, on a LN matrix, cells formed clusters of small cells, which made them impossible to identify clearly under phase-contrast microscopy. Such morphology is compatible with data illustrating a high proliferative state and a very low capacity to produce steroid on a LN matrix. Moreover, Huet et al. (Huet et al., 2001) have reported opposite effects of LN and Col I on steroid secretion by ovine granulosa cells whereby Col I increased estradiol secretion and decreased progesterone secretion while a LN matrix decreased estradiol secretion and increased progesterone secretion.

Influence of extracellular matrix and integrins on functional properties of ZF cells.

The zona fasciculata is primarily under the control of ACTH, although binding of integrin to ECM components are also involved in corticosterone secretion and cell proliferation. Col I disposition showed a linear network in the inner zones of the cortex. Col IV was present as fibrils in all zones of the adrenal cortex, displaying an absence of any gradient in its expression. FN and LN showed a pattern of distribution similar to that of Col I with a fibril-like structure in both the ZF and ZR. The $\beta 1$ subunit was primarily found in the fasciculata whereas $\alpha 1$ subunit staining was weak. However, $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ subunits did show strong staining.

The present data reveals that Col and LN have differential effects on steroid secretion in accordance with other studies (Aten et al., 1995; Huet et al., 2001; Diaz et al., 2002). In a previous report, we demonstrated that mRNA production of the key enzymes in steroidogenesis, namely P450C17 and 3 β HSD, in response to ACTH stimulation is opposite depending on whether cells from human fetal adrenal gland are plated on LN or on Col (Chamoux et al., 2002). Moreover, cortisol secretion by human fetal adrenal cells was increased on a Col IV matrix, while LN had no effect when compared to plastic. Finally, a laminin matrix was shown to increase DHEA secretion, while Col IV had no effect (Chamoux et al., 2002).

The increase in corticosterone secretion as well as the increase in proliferation by a FN matrix could involve the activation of the α 5 β 1 integrin in fasciculata cells. As in the zona glomerulosa, type I and type IV collagen both bind to α 1 β 1, α 2 β 1 and α 3 β 1 integrins, all of which are expressed in the zona fasciculata. The activation of the above integrins by Col I and Col IV may therefore be involved in corticosterone secretion and proliferation by fasciculata cells. Similarly to aldosterone secretion by glomerulosa cells, corticosterone secretion by fasciculata cells was decreased on a LN matrix.

Differential expression of extracellular matrix and integrins in chromaffin cells.

All of the studied matrices (Col I, Col IV, LN and FN) were expressed in the adult rat adrenal medulla. Our results are in accordance with the observations of Kikuta et al. (Kikuta et al., 1991), showing strong staining for Collagens in the basement membrane underlying chromaffin cells. Our results for LN labelling differ however from those of Pellerin et al in that LN was absent from the capsule and the medulla in the adult human adrenal gland (Pellerin et al., 1997). In the present study, FN labelling did not display any gradient in its expression but exhibited strong staining around chromaffin cells. These results differ from observations reported in the bovine adrenal gland where FN was not detected in chromaffin cells (Feige et al., 1998). However, in human fetal adrenal gland, Col IV, LN and FN were all expressed in the medulla (Chamoux et al., 2001). The discrepancies between the present results and the observations of Pellerin et al. with respect to LN and with those of Feige et al. pertaining to FN are likely related to species difference *i.e.* bovine versus rat.

The most striking observation of the present study is the opposite expression of integrins between cortex and medulla. There was strong labelling for α 1 integrin in the adrenal medulla comparatively to weak staining found in only sparse medullar cells for

$\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ integrins. The specific localization of integrin surrounding chromaffin cells is further outlined by its presence in medullary rays crossing into the cortex in order to export functional chromaffin cells into the zona glomerulosa. Such results corroborate previous observations reported in rat (Gallo-Payet et al., 1987), porcine (Bornstein et al., 1991) or human (Bornstein et al., 1994) adrenal gland. Our results are also in accordance with the observations of Murase and Hayashi (Murase and Hayashi, 1998) showing high expression of integrin $\alpha 1$ in the adrenal medulla of adult mice. In addition, $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ integrin subunits were present in the adrenal cortex with only a few positively-stained cells in the medulla. Such specific expression may be associated with distinct properties of non-catecholamine-producing cells.

Colocalization of ECM components

Double immunofluorescence experiments revealed that some ECM components may be differentially colocalized. Col I and Col IV showed intense colocalization in both the zonae glomerulosa and fasciculata, but Col I appeared to be greater expressed in the adrenal capsule than Col IV. Col I and LN were colocalized in the zona glomerulosa as well as in some fibrils of the zona fasciculata. Some regions of the adrenal capsule expressed both Col I and LN. Similar results were found for Col I and FN, with Col I being more expressed in the capsule than FN. Colocalization for Col IV and other ECM components was also found, Col IV showing a colocalization pattern with LN in the form of long fibrils in the zona fasciculata. Col IV and FN were also found in both the zona glomerulosa and zona fasciculata. However, Col IV showed a more intense staining in the capsule than FN. Finally, FN and LN were both found in the glomerulosa and fasciculata, LN being more intense in the capsule than FN. These various colocalizations of ECM components are the first to be reported in the adrenal gland. The physiological relevance of this association of ECM components remains to be evaluated.

The present results, obtained in cultured cells grown on various specific matrices, clearly indicate that ECM components play important roles in promoting proliferation and steroid secretion. The precise localization of ECM components Col I, Col IV, LN and FN as well as their counter integrin receptors provide new insight into the role of these proteins in adult rat adrenal gland homeostasis in pathophysiological situations

such as atherosclerosis (Assoian and Marcantonio, 1996; Blankenberg et al., 2003), hypertension (Intengan and Schiffrin, 2000, 2001) and cancer (Engers and Gabbert, 2000; Hanahan and Weinberg, 2000; Mercurio et al., 2001; Kalluri, 2003), where ECM expression is modified. Furthermore, the difference in integrin expression between the cortex and medulla provides further evidence that integrins and ECM components play a distinctive, although yet unidentified, role not only in each region of the adrenal gland, but also for each cell type in the medulla. Finally, the various combinations of ECM components and integrins may determine specific cell functions as observed in our previous studies. Indeed, FN, in the presence of $\alpha 5\beta 1$, promoted proliferation (Campbell et al., 2003) while in the absence of such integrins, it induced cell death (Chamoux et al., 2002).

Acknowledgments

The authors thank Lyne Bilodeau and Lucie Chouinard for their invaluable experimental assistance. This work was supported by grants from « La Fondation des Maladies du Coeur du Québec» and the Canadian Institute for Health Research to Nicole Gallo-Payet (MOP-10998) and Marcel D Payet (MT-6813). NGP is a recipient of a Canada Research Chair in Endocrinology of the Adrenal Gland.

References

Albelda SM, Buck CA (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J* 4:2868-2680.

Aota S, Yamada KM (1995) Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 70:1-21.

Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50:197-263.

Assoian RK, Marcantonio EE (1996) The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 98:2436-2439.

Aten RF, Kolodecik TR, Behrman HR (1995) A cell adhesion receptor antiserum abolishes, whereas laminin and fibronectin glycoprotein components of extracellular matrix promote, luteinization of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 136:1753-1758.

Aumailley M, El Khal A, Knoss N, Tunggal L (2003) Laminin 5 processing and its integration into the ECM. *Matrix Biol* 22:49-54.

Birembaut P, Gaillard D, Arnaudies J, Adnet JJ, Labat-Robert J, Robert L (1980) Distribution of fibronectin in normal human tissue. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 64:349-365.

Blankenberg S, Barboux S, Tiret L (2003) Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170:191-203.

Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Usadel H, Béckmann M, Scherbaum WA (1991) Morphological evidence for a close interaction of chromaffin cells with cortical cells within the adrenal gland. *Cell Tissue Res* 165:1-9.

Bornstein SR, Gonzalez-Hernandez JA, Ehrhart-Bornstein M, Adler G, Scherbaum WA (1994) Intimate contact of chromaffin and cortical cells within the human adrenal gland forms the cellular basis for important intraadrenal interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 78:225-232.

Bosman FT (1993) Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem J* 25:469-477.

Campbell S, Otis M, Gallo-Payet N, Payet MD (2004) Adrenal gland: Involvement of integrins, extracellular matrix and cytoskeleton in the functions of adrenocortical cells. *Recent Research Developments in Endocrinology* 4:115-140.

Campbell S, Otis M, Cote M, Gallo-Payet N, Payet MD (2003) Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: a role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium. *Endocrinology* 144:1486-1495.

Chamoux E, Bolduc L, Lehoux JG, Gallo-Payet N (2001) Identification of extracellular matrix components and their integrin receptors in the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2090-2098.

Chamoux E, Narcy A, Lehoux JG, Gallo-Payet N (2002) Fibronectin, laminin, and collagen IV as modulators of cell behavior during adrenal gland development in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1819-1828.

Cheng CY, Hornsby PJ (1992) Expression of 11 beta-hydroxylase and 21-hydroxylase in long-term cultures of bovine adrenocortical cells requires extracellular matrix factors. *Endocrinology* 130:2883-2889.

Cheresh DA (1992) Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion. *Clin Lab Med* 12:217-236.

Cosgrove D, Rodgers K, Meehan D, Miller C, Bovard K, Gilroy A, Gardner H, Kotelianski V, Gotwals P, Amatucci A, Kalluri R (2000) Integrin alpha1beta1 and

transforming growth factor-beta1 play distinct roles in alport glomerular pathogenesis and serve as dual targets for metabolic therapy. *Am J Pathol* 157:1649-1659.

Diaz ES, Pellizzari E, Meroni S, Cigorraga S, Lustig L, Denduchis B (2002) Effect of extracellular matrix proteins on in vitro testosterone production by rat Leydig cells. *Mol Reprod Dev* 61:493-503.

Dickeson SK, Walsh JJ, Santoro SA (1998) Binding of the alpha 2 integrin I domain to extracellular matrix ligands: structural and mechanistic differences between collagen and laminin binding. *Cell Adhes Commun* 5:273-281.

DiPersio CM, Shah S, Hynes RO (1995) alpha 3A beta 1 integrin localizes to focal contacts in response to diverse extracellular matrix proteins. *J Cell Sci* 108 (Pt 6):2321-2336.

Ehrhart-Bornstein M, Hinson JP, Bornstein SR, Scherbaum WA, Vinson GP (1998) Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr Rev* 19:101-143.

Ekblom P, Lonai P, Talts JF (2003) Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol* 22:35-47.

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

Engers R, Gabbert HE (2000) Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. *J Cancer Res Clin Oncol* 126:682-692.

Feige JJ, Keramidas M, Chambaz EM (1998) Hormonally regulated components of the adrenocortical cell environment and the control of adrenal cortex homeostasis. *Horm Metab Res* 30:421-425.

Fujiyama C, Masaki Z, Sugihara H (1993) Influence of extracellular matrix on the proliferation and differentiation of adrenocortical cells in culture. *Pathol Res Pract* 189:1205-1214.

Gallo-Payet N, Payet MD (1989) Excitation-secretion coupling: involvement of potassium channels in ACTH-stimulated rat adrenocortical cells. *J Endocrinol* 120:409-421.

Gallo-Payet N, Pothier P, Isler H (1987) On the presence of chromaffin cells in the adrenal cortex: their possible role in adrenocortical function. *Biochem Cell Biol* 65:588-592.

Gelse K, Poschl E, Aigner T (2003) Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55:1531-1546.

Giancotti FG (1997) Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9:691-700.

Giancotti FG (2000) Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol* 2:E13-E14.

Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F (1999) Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit Rev Immunol* 19:389-429.

Guan JL, Hynes RO (1990) Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell* 60:53-61.

Haack H, Hynes RO (2001) Integrin receptors are required for cell survival and proliferation during development of the peripheral glial lineage. *Dev Biol* 233:38-55.

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.

Huet C, Pisselet C, Mandon-Pepin B, Monget P, Monniaux D (2001) Extracellular matrix regulates ovine granulosa cell survival, proliferation and steroidogenesis: relationships between cell shape and function. *J Endocrinol* 169:347-360.

Humphries MJ (2000) Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28:311-339.

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

Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.

Ill CR, Gospodarowicz D (1982) Factors involved in supporting the growth and steroidogenic functions of bovine adrenal cortical cells maintained on extracellular matrix and exposed to a serum-free medium. *J Cell Physiol* 113:373-384.

Intengan HD, Schiffrin EL (2000) Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension* 36:312-318.

Intengan HD, Schiffrin EL (2001) Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* 38:581-587.

Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3:422-433.

Kikuta A, Ohtani O, Murakami T (1991) Three-dimensional organization of the collagen fibrillar framework in the rat adrenal gland. *Arch Histol Cytol* 54:133-144.

Mercurio AM, Bachelder RE, Chung J, O'Connor KL, Rabinovitz I, Shaw LM, Tani T (2001) Integrin laminin receptors and breast carcinoma progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:299-309.

Meredith JE, Jr., Winitz S, Lewis JM, Hess S, Ren XD, Renshaw MW, Schwartz MA (1996) The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev* 17:207-220.

Miner JH, Yurchenco PD (2004) Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:255-284.

Mizejewski GJ (1999) Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:124-138.

Mosher DF (1984) Physiology of fibronectin. *Annu Rev Med* 35:561-575.

Mould AP, Humphries MJ (1991) Identification of a novel recognition sequence for the integrin alpha 4 beta 1 in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Embo J* 10:4089-4095.

Mould AP, Wheldon LA, Komoriya A, Wayner EA, Yamada KM, Humphries MJ (1990) Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as the integrin alpha 4 beta 1. *J Biol Chem* 265:4020-4024.

Murase S, Hayashi Y (1998) Integrin alpha1 localization in murine central and peripheral nervous system. *J Comp Neurol* 395:161-176.

Otis M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N (2005) Angiotensin II stimulates protein synthesis and inhibits proliferation in primary cultures of rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 146:633-642.

Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, Raspanti M (2002) Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron* 33:587-596.

Pellerin S, Keramidas M, Chambaz EM, Feige JJ (1997) Expression of laminin and its possible role in adrenal cortex homeostasis. *Endocrinology* 138:1321-1327.

Prockop DJ, Kivirikko KI (1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem* 64:403-434.

Qin L, Wang YL, Bai SX, Xiao ZJ, Herva R, Piao YS (2003) Expression of integrins and extracellular matrix proteins at the maternal-fetal interface during tubal implantation. *Reproduction* 126:383-391.

Romberger DJ (1997) Fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 29:939-943.

Ruoslahti E (1988) Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem* 57:375-413.

Sasaki T, Fassler R, Hohenester E (2004) Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* 164:959-963.

Sastry SK, Horwitz AF (1993) Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* 5:819-831.

Schwartz MA (1992) Transmembrane signalling by integrins. *Trends Cell Biol* 2:304-307.

Schwartz MA (2001) Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* 11:466-470.

Sonnenberg A (1993) Integrins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 184:7-35.

Tamkun JW, DeSimone DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO (1986) Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46:271-282.

Tulla M, Pentikainen OT, Viitasalo T, Kapyla J, Impola U, Nykvist P, Nissinen L, Johnson MS, Heino J (2001) Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha II, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem* 276:48206-48212.

Tunggal P, Smyth N, Paulsson M, Ott MC (2000) Laminins: structure and genetic regulation. *Microsc Res Tech* 51:214-227.

Vacca A, Ria R, Presta M, Ribatti D, Iurlaro M, Merchionne F, Tanghetti E, Dammacco F (2001) alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Exp Hematol* 29:993-1003.

van der Flier A, Sonnenberg A (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305:285-298.

Vinson GP (2003) Adrenocortical zonation and ACTH. *Microsc Res Tech* 61:227-239.

Virtanen I, Korhonen M, Petajaniemi N, Karhunen T, Thornell LE, Sorokin LM, Kontinen YT (2003) Laminin isoforms in fetal and adult human adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4960-4966.

Wayner EA, Garcia-Pardo A, Humphries MJ, McDonald JA, Carter WG (1989) Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol* 109:1321-1330.

Figure legends

Figure 1. Immunodetection of collagen I (Col I), collagen IV (Col IV), laminin (LN) and fibronectin (FN) in adult rat adrenal gland cortex. Frozen sections (5-6 μm) of adult rat adrenal gland were processed by indirect immunofluorescence as described in Methods. A and E: Col I; B and F: Col IV; C and G: LN; D and H: FN. Non specific staining for Col I (I), Col IV (J), LN (K) and FN (L). Images were taken at magnification 10X (A, B, C and D) and 30X (E, F, G, H, I, J, K and L). Scale bars = 50 μm .

Figure 2. Double immunofluorescence of collagen I (Col I), collagen IV (Col IV), laminin (LN), fibronectin (FN) and dopamine beta hydroxylase enzyme (DBH) in adult rat adrenal gland medulla. Frozen sections (5-6 μm) of adult rat adrenal gland were processed for double immunofluorescence with Zenon technology as described in Methods. A and E: Col I and DBH; B and F: Col IV and DBH; C and G: LN and DBH; D and H: FN and DBH. Images were taken at magnification 10X (A, B, C and D) and 30X (E, F, G, and H). Scale bars = 50 μm .

Figure 3. Colocalization of collagen I (Col I), collagen IV (Col IV), laminin (LN) and fibronectin (FN) in adult rat adrenal outer cortex zone. Frozen sections (5-6 μm) of adult rat adrenal gland were processed for double immunofluorescence with Zenon technology as described in Methods. Binary images showing only the colocalized ECM components were generated with Metamorph software A: Double staining of Col I (green) and Col IV (red); B: Double staining of Col I (green) and LN (red); C: Double staining of Col I (green) and FN (red); D: Double staining of Col IV (green) and LN (red); E: Double staining of Col IV (red) and FN (green); F: Double staining of FN (green) and LN (red). Panels A', B', C', D', E' and F' represent binary images showing only colocalized ECM components corresponding to yellow-colored elements in A, B, C, D, E and F respectively. Scale bars = 50 μm .

Figure 4. Immunodetection of integrin $\beta 1$ subunit in adult rat adrenal gland. Paraffin-embedded sections (5 μm) of adult rat adrenal gland were processed for immunofluorescence labelling as described in Methods. A: $\beta 1$ subunit expression in the

adrenal cortex; B: $\beta 1$ subunit in the adrenal cortex outer zone; C: $\beta 1$ subunit expression in the adrenal medulla, D: Nonspecific labelling for $\beta 1$ subunit in the adrenal cortex. Scale bars = 50 μm .

Figure 5. Immunodetection of integrin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ and $\alpha 5$ subunits in adult rat adrenal gland. Paraffin-embedded sections (5 μm) of adult rat adrenal gland were processed for immunofluorescence labelling as described in Methods. A and I: Integrin $\alpha 1$ in the adrenal cortex; B and J: Integrin $\alpha 2$ in the adrenal cortex; C and K: Integrin $\alpha 3$ in the adrenal cortex; D and L: Integrin $\alpha 5$ in the adrenal cortex; E: Integrin $\alpha 1$ in the adrenal medulla; F and N: Integrin $\alpha 2$ in the adrenal medulla; G and O: Integrin $\alpha 3$ in the adrenal medulla; H and P: Integrin $\alpha 5$ in the adrenal medulla; M: DBH enzyme labelling in the adrenal medulla. Images were taken at magnification 10X (A, B, C, D, E, F, G, H and M) and 30X (I, J, K, L, N, O and P). Scale bars = 50 μm .

Figure 6. Phase-contrast morphology of rat glomerulosa cells grown on plastic (A), collagen I (B), collagen IV (C), laminin (D) and fibronectin (E) and protein synthesis analysis (F). Cells were plated at an initial concentration of 5×10^4 cells in matrix-coated Petri dishes. Phase-contrast images were taken after three days in culture with a Leica microscope equipped with a 32X objective. Protein synthesis determination was performed using phenylalanine as described in Material and Methods. Scale bars represent 15 μm . Statistical significance: **, $P < 0.01$; comparison with control cells grown on plastic.

Figure 7. Phase-contrast morphology of rat fasciculata cells grown on plastic (A), collagen I (B), collagen IV (C), laminin (D) and fibronectin (E) and protein synthesis analysis (F). Cells were plated at an initial concentration of 5×10^4 cells in matrix-coated Petri dishes. Phase-contrast images were taken after three days in culture with a Leica microscope equipped with a 32X objective. Protein synthesis determination was performed using phenylalanine as described in Material and Methods. Scale bars represent 15 μm . Statistical significance: *, $P < 0.05$; comparison with control cells grown on plastic.

Figure 8. Effect of matrices on cell proliferation in rat glomerulosa (A) and fasciculata cells (B). Cells were plated on plastic (PL), collagen I (CI), collagen IV (CIV), laminin (LN) or fibronectin (FN) -coated 96-well plates for proliferation studies (30×10^3 cells/well). Proliferation of glomerulosa (A) and fasciculata cells (B) grown on matrices was measured by fluorescent BrdU incorporation, as described in Methods. Results are expressed as means \pm SE of three experiments with each experimental condition containing six individual samples. Statistical significance: **, $P < 0.01$; comparison with control cells grown on plastic.

Figure 9. Effect of matrices on aldosterone secretion in rat glomerulosa (A) and on corticosterone secretion in fasciculata (B) cells. Cells were plated onto plastic (PL), collagen I (CI), collagen IV (CIV), laminin (LN) or fibronectin (FN) -coated Petri dishes for secretion analysis (2×10^5 cells). Aldosterone and corticosterone secretion were measured by radioimmunoassay (RIA). Results are expressed as means \pm SE of three experiments with each experimental condition containing six individual samples. Statistical significance: **, $P < 0.01$; comparison with control cells grown on plastic.

FIGURE 1

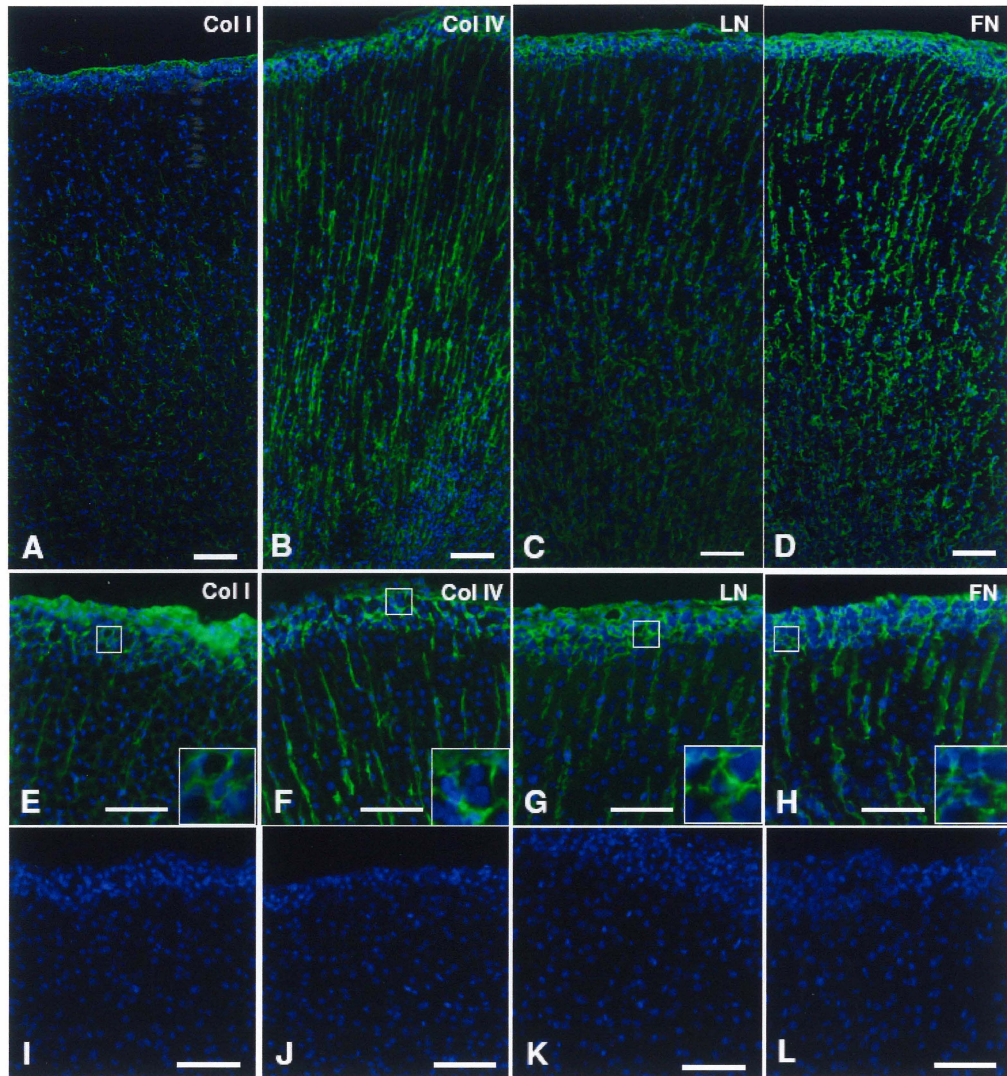


FIGURE 2

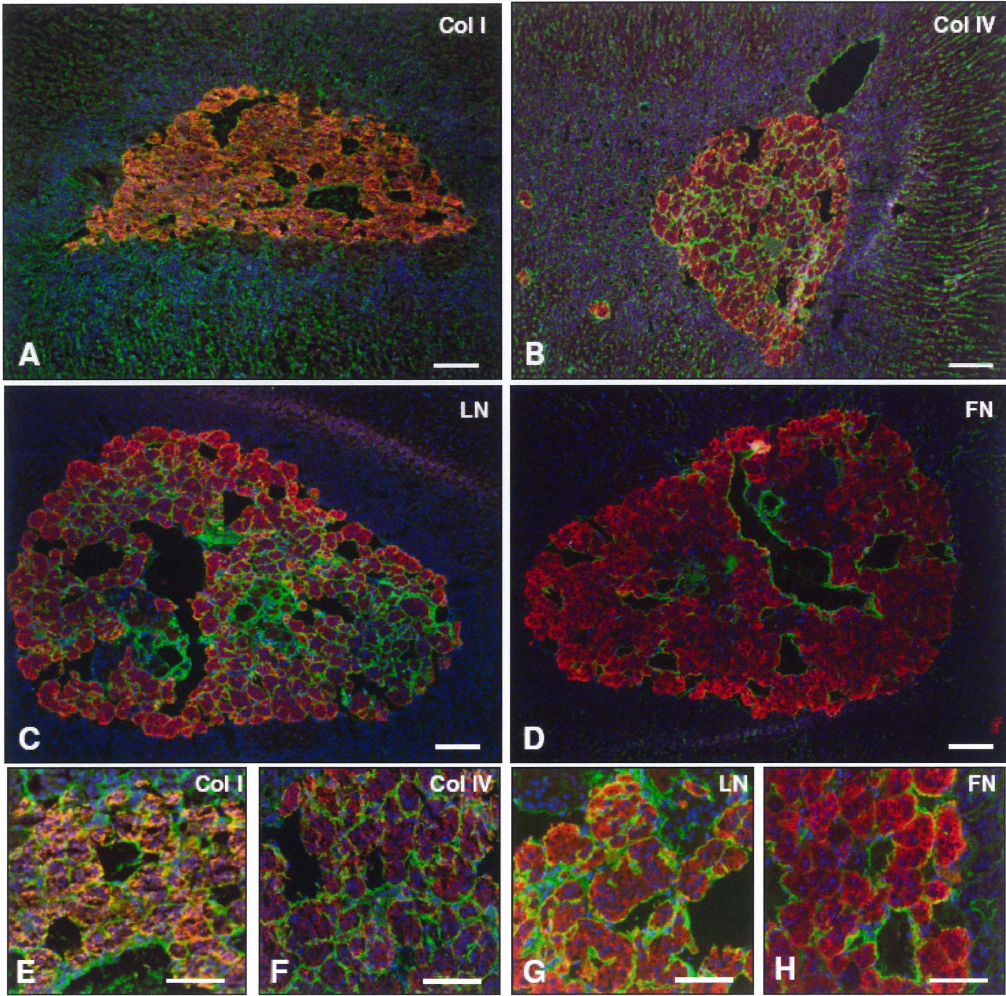


FIGURE 3

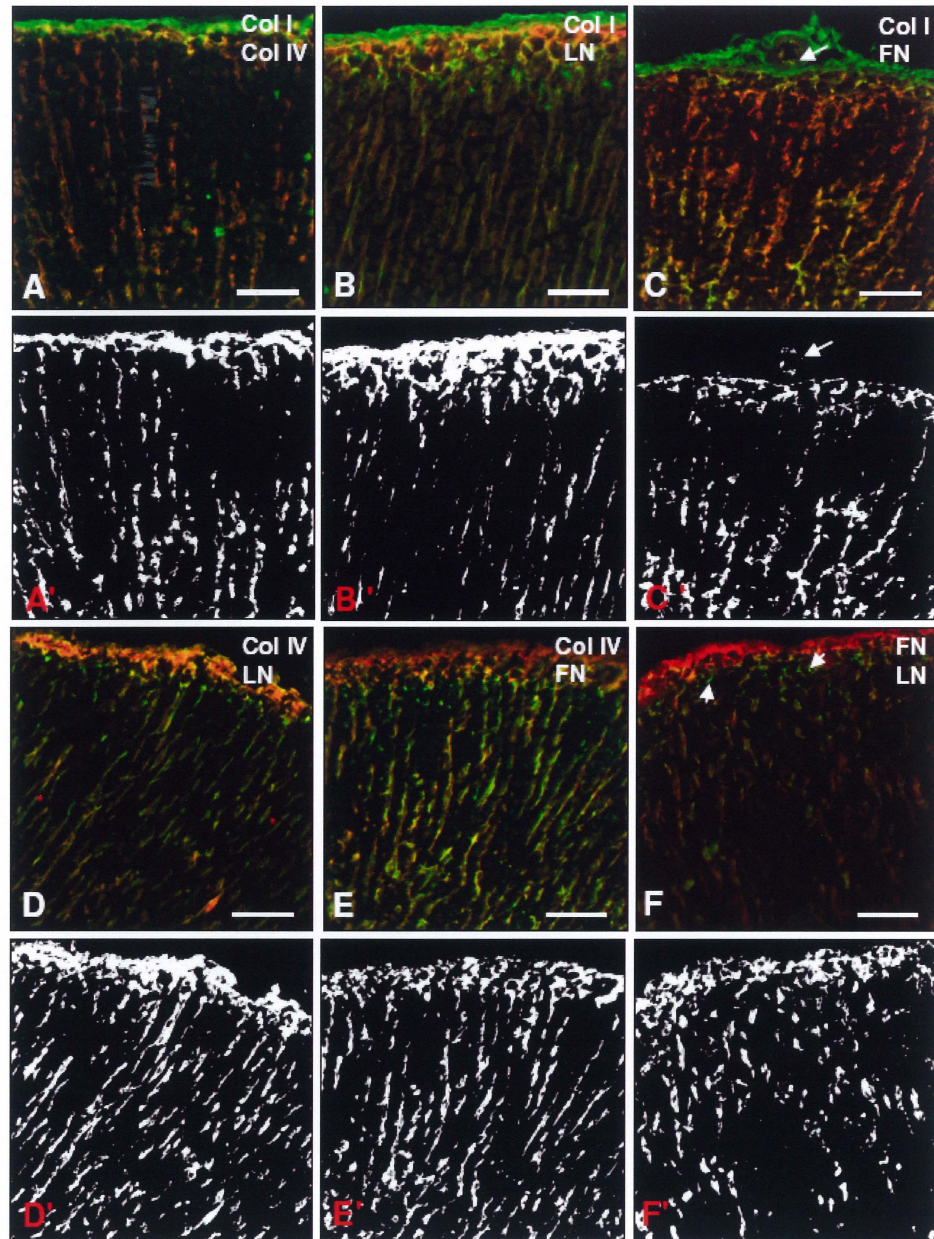


FIGURE 4

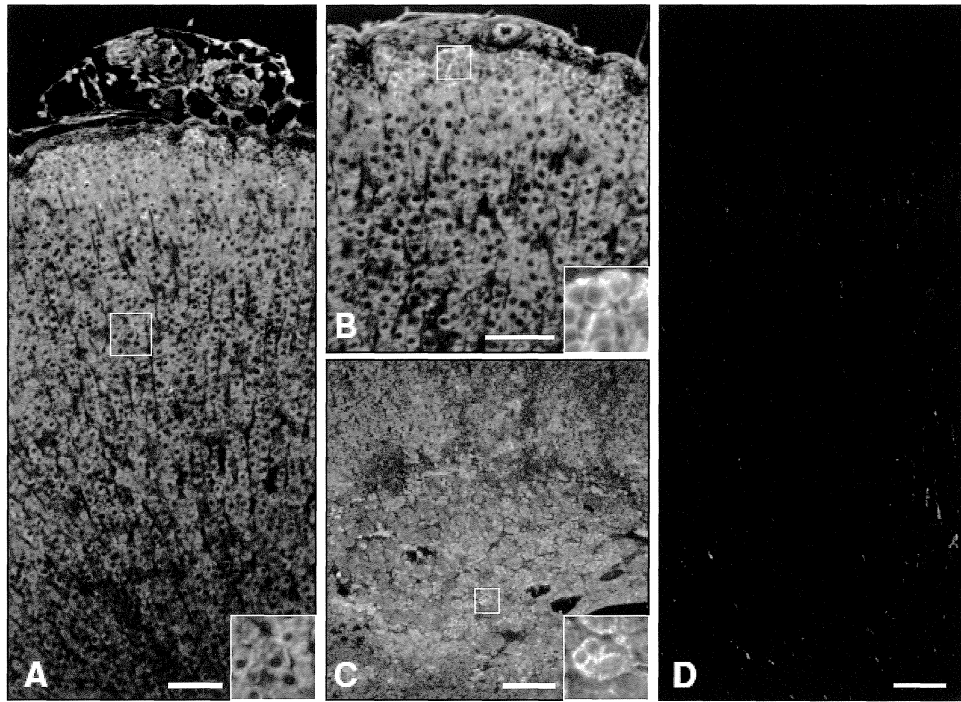


FIGURE 5

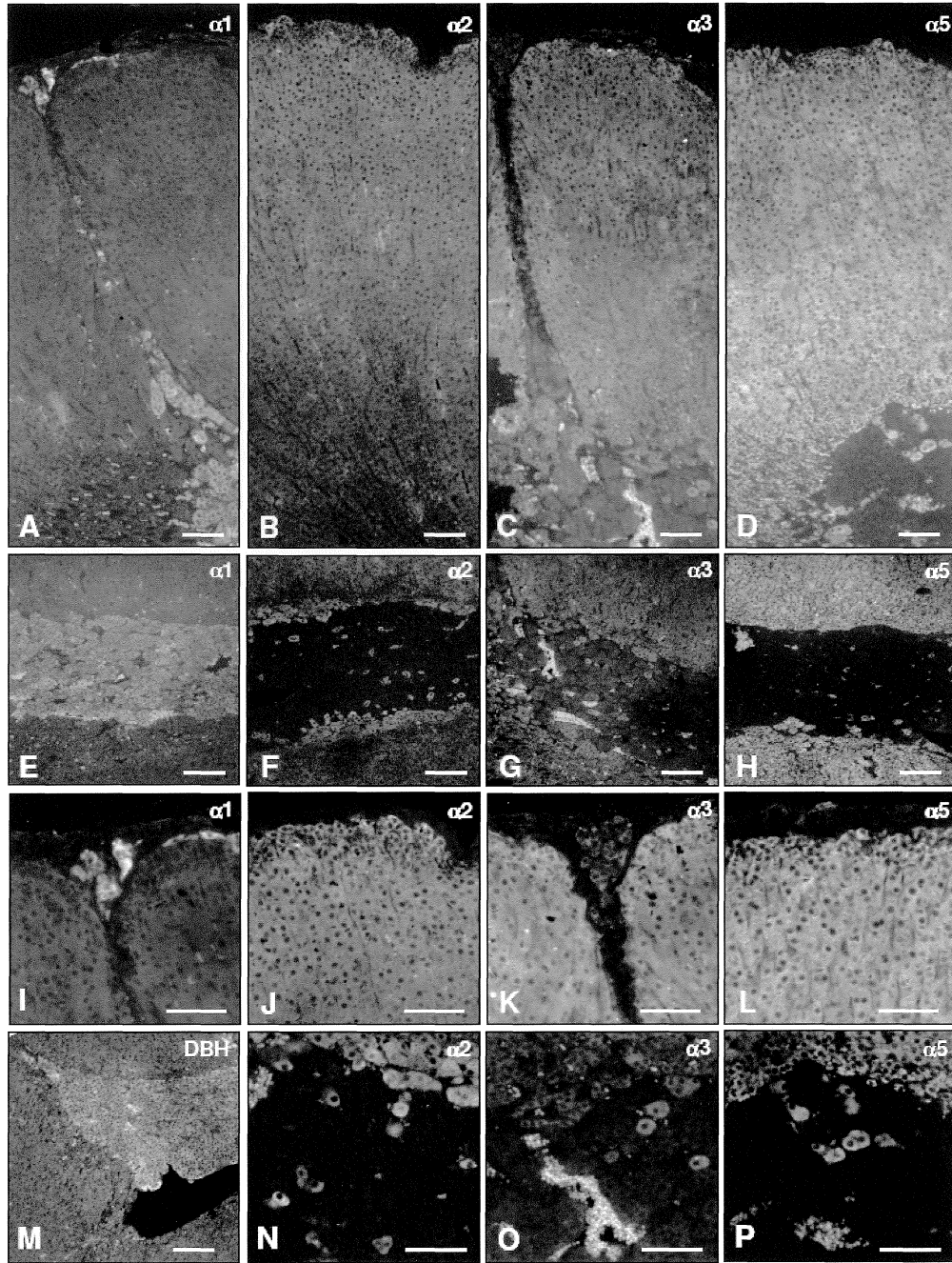


FIGURE 6

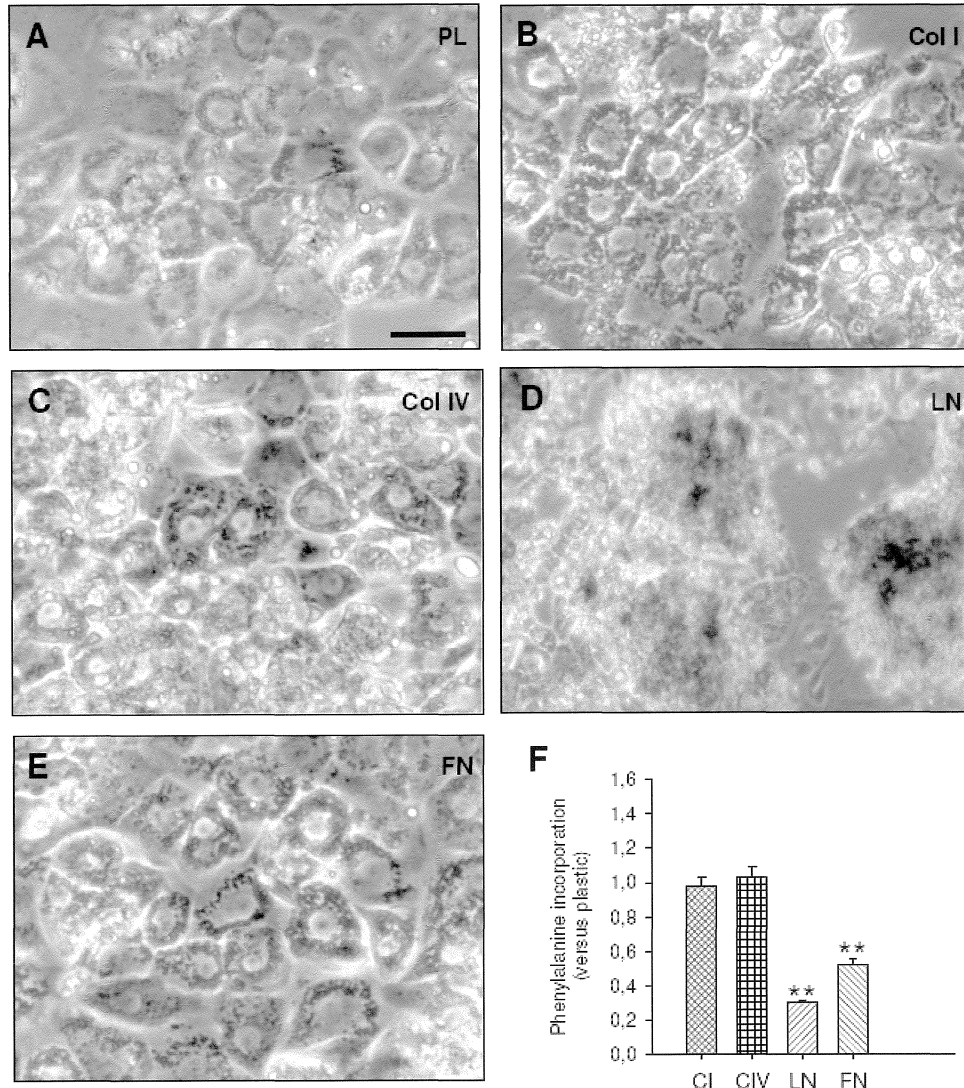


FIGURE 7

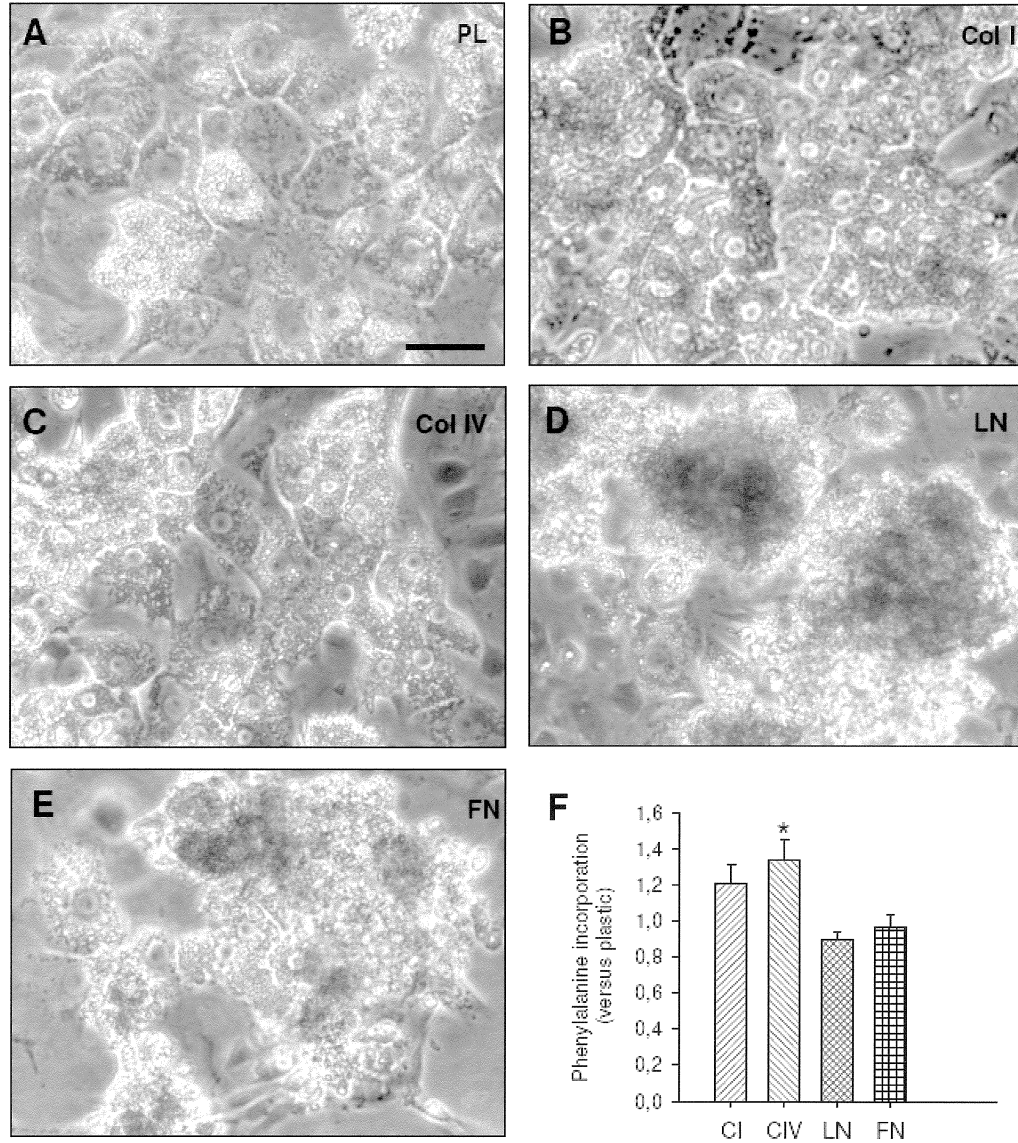


FIGURE 8

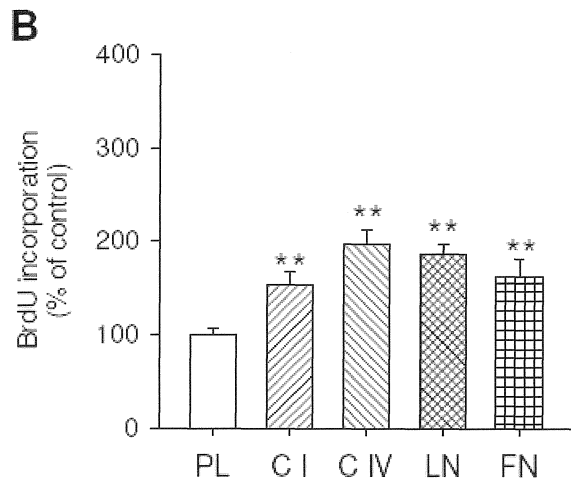
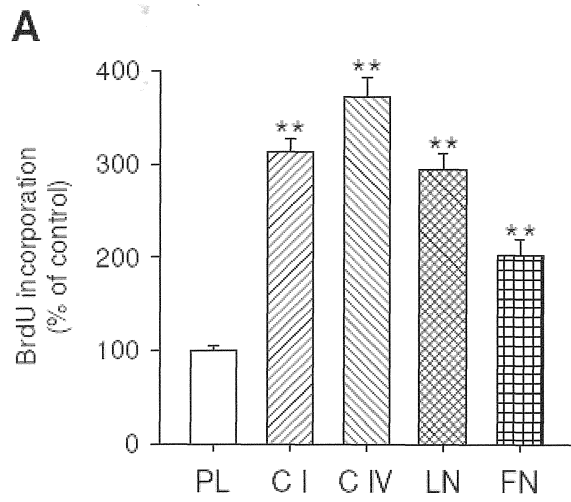
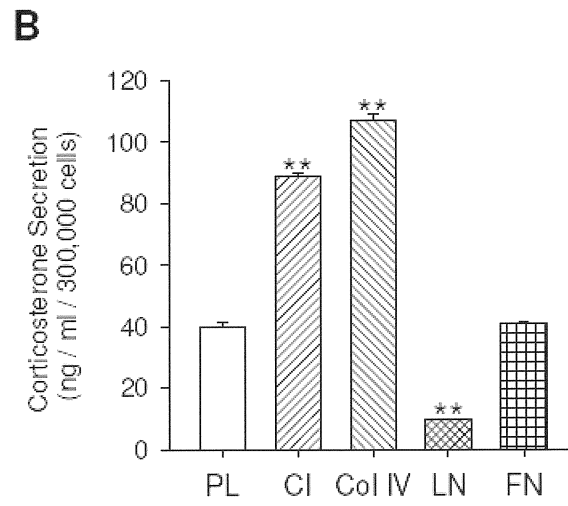
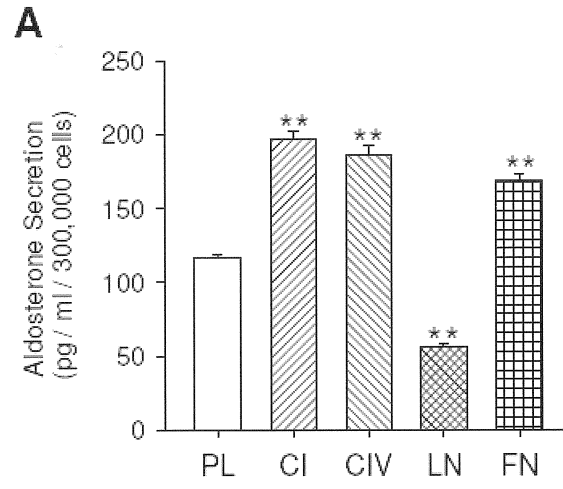


FIGURE 9



4.2 AUTRES RÉSULTATS (1)

4.2.1. Expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 1$ dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte.

En plus des expériences d'immunofluorescence sur coupes congelées décrites dans l'article précédant, des expériences de RT-PCR ont été effectuées afin de déterminer la présence de la sous unité d'intégrine $\alpha 1$ sur les cellules glomérulées. Des expériences de RT-PCR qualitatif montrent que les cellules glomérulées possèdent l'ARN messenger codant pour la sous-unité d'intégrine $\alpha 1$ (Figure 15). La bande retrouvée à 790 bp correspond à la grandeur de l'amplicon prédite par la séquence des amorces utilisées.

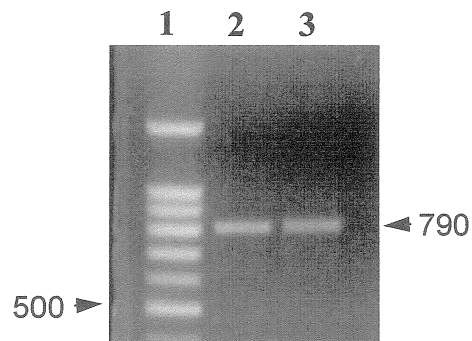


Figure 15. Présence de l'ARNm de la sous-unité d'intégrine $\alpha 1$ dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte. Électrophorèse sur gel d'agarose. RT-PCR qualitatif de l'amplicon de 790bp correspondant à l'isoforme d'intégrine $\alpha 1$. 1. Marqueur de pairs de base (bp); 2. Contrôle positif (cerveau de rat adulte); 3. Cellules glomérulées.

4.2.2. Expression de l'intégrine $\alpha 8$ dans la glande surrénale de rat adulte.

L'intégrine $\alpha 8\beta 1$ est un des récepteurs de la FN (Muller et al. 1995; Schnapp et al. 1995). Nous avons vérifié l'expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 8$ sur des glandes surrénales de rat adulte fixées au zinc. Sur des sections paraffine, la sous-unité $\alpha 8$ est retrouvée autour des cellules du cortex (Figure 16A and C). De plus, un fort marquage est observé autour des amas de cellules chromaffine de la médullosurrénale (Figure 16E and F). La figure 16B et D montre le marquage non-spécifique de $\alpha 8$ dans la glande surrénale.

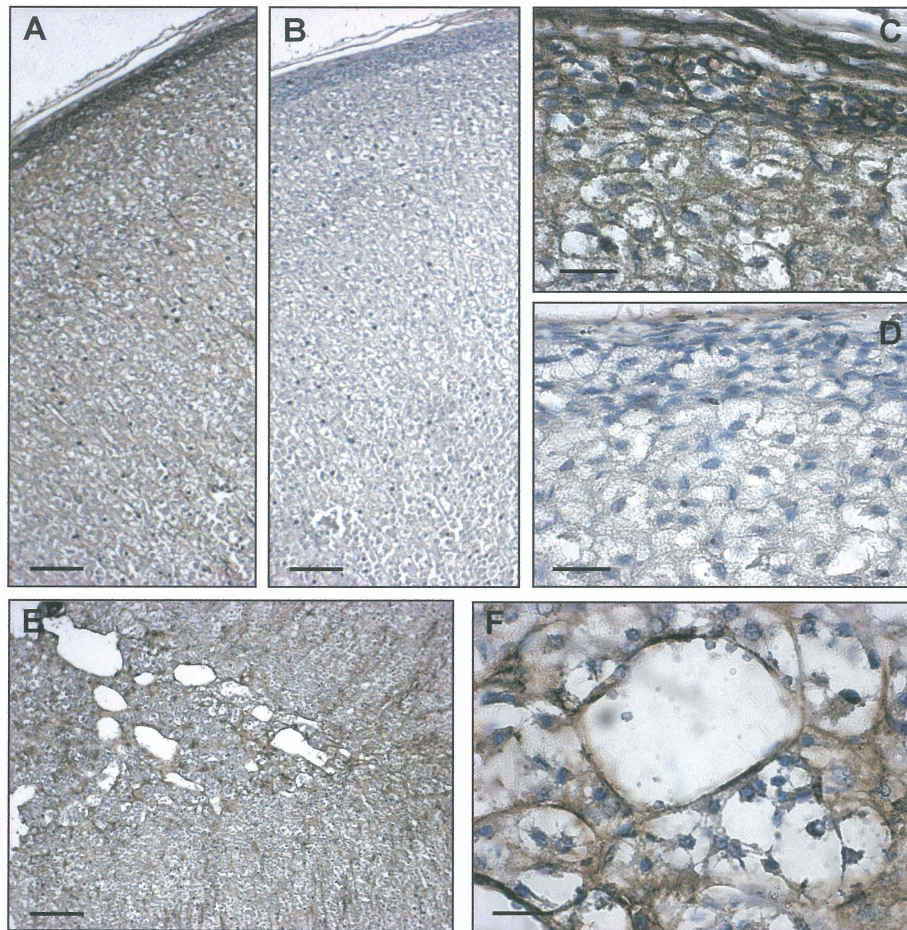


Figure 16. Expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 8$ dans la glande surrénale de rat adulte. Des coupes paraffine (5 μm) fixées au zinc ont été utilisées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. A, Cortex surrénalien; C, Zone externe du cortex surrénalien; E et F, Médullosurrénale. B et D Marquage non-spécifique. Barres A, B et E = 50 μm ; C, D et F = 20 μm .

4.2.3. Expression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte par la méthode du TIRF.

Dans un article précédent (Campbell et al. 2003), nous avons montré, par RT-PCR et immunobuvardage de type Western, que les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat exprimaient l'intégrine $\alpha 5$. La figure 17 montre la présence de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ à l'aide d'un anticorps anti- $\alpha 5$ spécifique. Le marquage observé semble être situé au niveau de points d'adhésion focale.

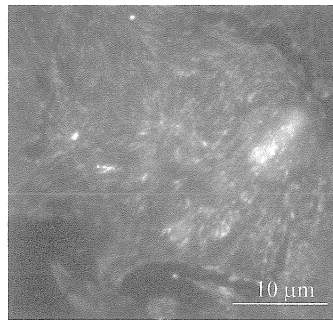


Figure 17. Expression de la sous-unité d'intégrine $\alpha 5$ dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte par la méthode du TIRF. Les cellules ont été isolées comme décrit dans les Matériels et Méthodes et mises sur matrice de FN pendant 3 jours avant incubation avec un anticorps spécifique anti- $\alpha 5$ intégrine.

4.2.4. Production et arrangement de composantes de la MEC (matrice extracellulaire) par les cellules glomérulées

Suite à de précédents résultats démontrant que les cellules glomérulées adhérees sur plastique montraient une sécrétion basale d'aldostérone plus importante après trois jours en culture comparativement à un jour en culture, et qu'une matrice de FN augmentait la sécrétion basale d'aldostérone, notre hypothèse était que les cellules glomérulées

produisaient leur propre matrice extracellulaire et que celle-ci était responsable, en partie, de l'augmentation de la sécrétion d'aldostérone après trois jours en culture.

Les cellules glomérulées ont été mises en culture et l'ARN a été extraite comme décrit dans les Matériels et Méthodes. La figure 18 montre la présence des ARNm de Col I (254 bp), Col IV (328 bp) et FN (768 bp) dans les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte. Des extraits de cerveau de rat ont été utilisés comme contrôle positif.

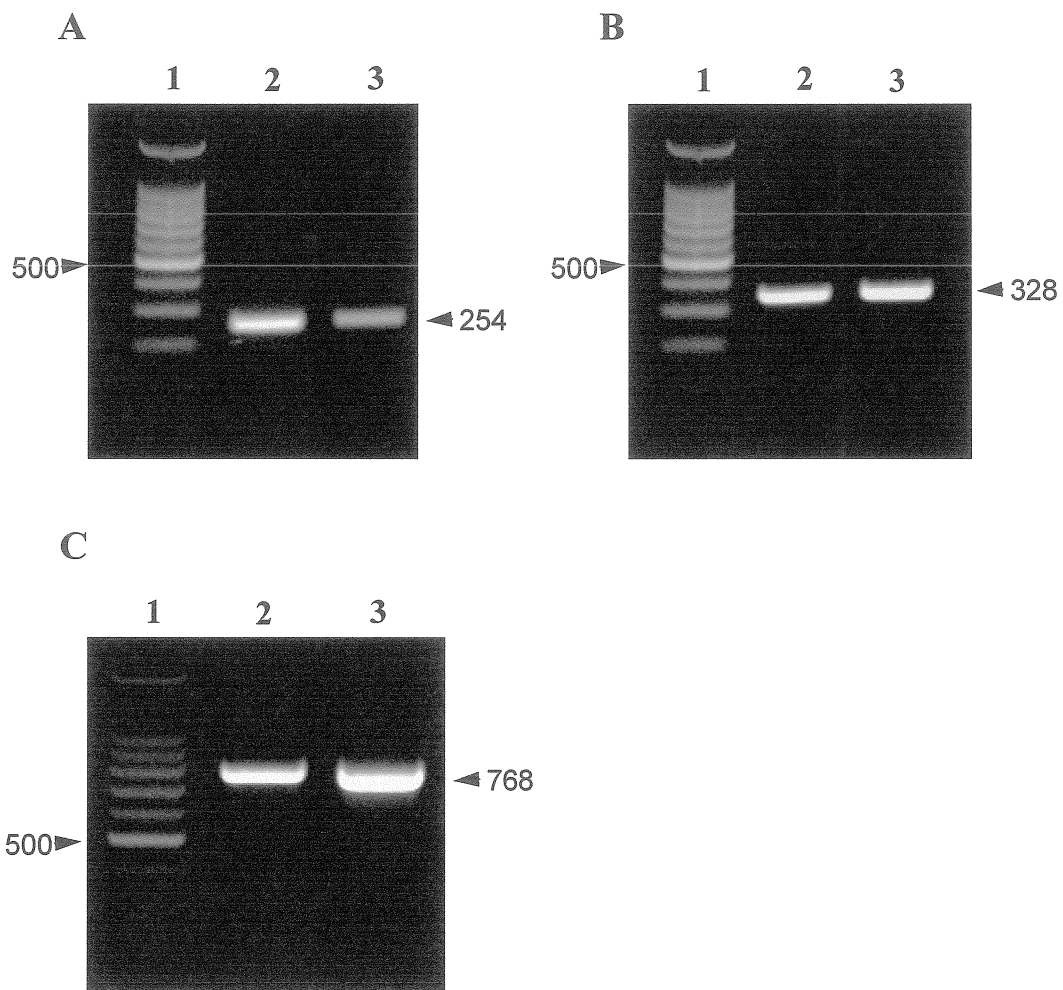


Figure 18. Présence des ARNm de composants de la MEC chez les cellules glomérulées. A. Col I. 1) Marqueur de paires de bases ; 2) contrôle positif ; 3) cellules glomérulées. B. Col IV. 1) Marqueur de paires de bases ; 2) cellules glomérulées ; 3) contrôle positif ; C) FN. 1) Marqueur de paires de bases ; 2) cellules glomérulées ; 3) contrôle positif.

La sécrétion de LN-1, Col I, Col IV et FN a ensuite été déterminée par immunobuvardage de type Western. Les cellules ont été cultivées pendant 3 jours et les protéines ont été extraites comme décrit dans les Matériels et Méthodes. Des bandes à 150 kDa, 185 kDa, 200kDa et 250 kDa sont retrouvées pour le Col I, Col IV, LN-1 et FN respectivement (Figure 19).

Finalement, afin de visualiser les composantes de la matrice extracellulaire sécrétées par les cellules glomérulées en culture, des expériences d'immunocytochimie directe et indirecte ont été effectuées. Comme les cellules ne sont pas perméabilisées, le marquage observé correspond aux composantes de la MEC retrouvées à l'extérieur de la cellule. La figure 20 A, B, C et D montre la présence de LN-1, du Col I, Col IV et FN respectivement, sécrétés par les cellules glomérulées. Pour chacune des composantes de la MEC, les protéines semblent former un réseau en trois dimensions autour des cellules (résultats non montrés). Afin de vérifier que les composantes de la MEC étaient bien le résultat d'une sécrétion par les cellules elles-mêmes, les expériences ont été reprises dans lesquelles les cellules ont été incubées dans un milieu ne contenant pas de composantes de la matrice extracellulaire (milieu pauvre en sérum PC1 (Cambrex Biosciences, East Rutherford, NJ)). Ces expériences ont montré des résultats similaires établissant que les composantes de la MEC retrouvées autour des cellules étaient sécrétées par les cellules glomérulées elles-mêmes (résultats non montrés). Afin d'évaluer le réseau formé par les protéines sécrétées, des expériences de double immunofluorescence directe ont été réalisées avec les kit Zenon. La figure 21 montre la colocalisation de la FN et de la LN-1 sécrétées par les cellules glomérulées après 3 jours en culture.

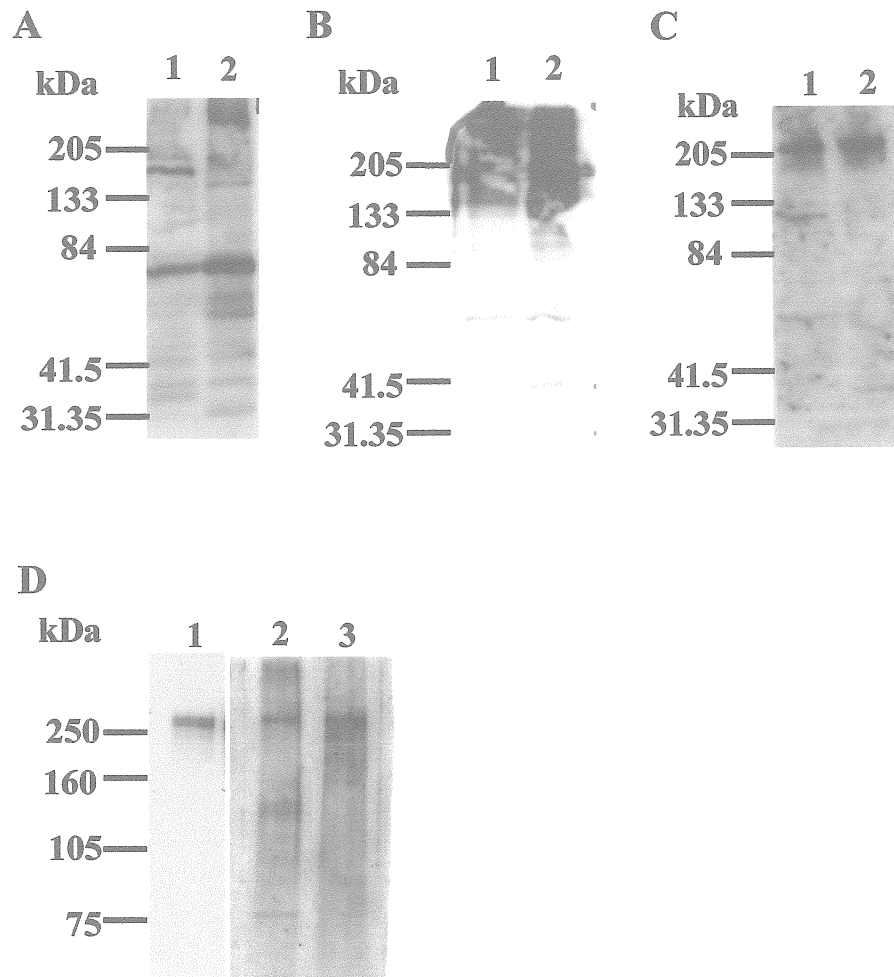


Figure 19. Production de composants de la MEC par les cellules glomérulées. A. Col I : 1) Cerveau; 2) Cellules glomérulées. B. Col IV : 1) Cerveau; 2) Cellules glomérulées; C. LN : 1) Cerveau; 2) Cellules glomérulées. D. FN: 1) FN soluble 0.01 µg. 2) Cerveau. 3) Extrait de glande surrénale entière.

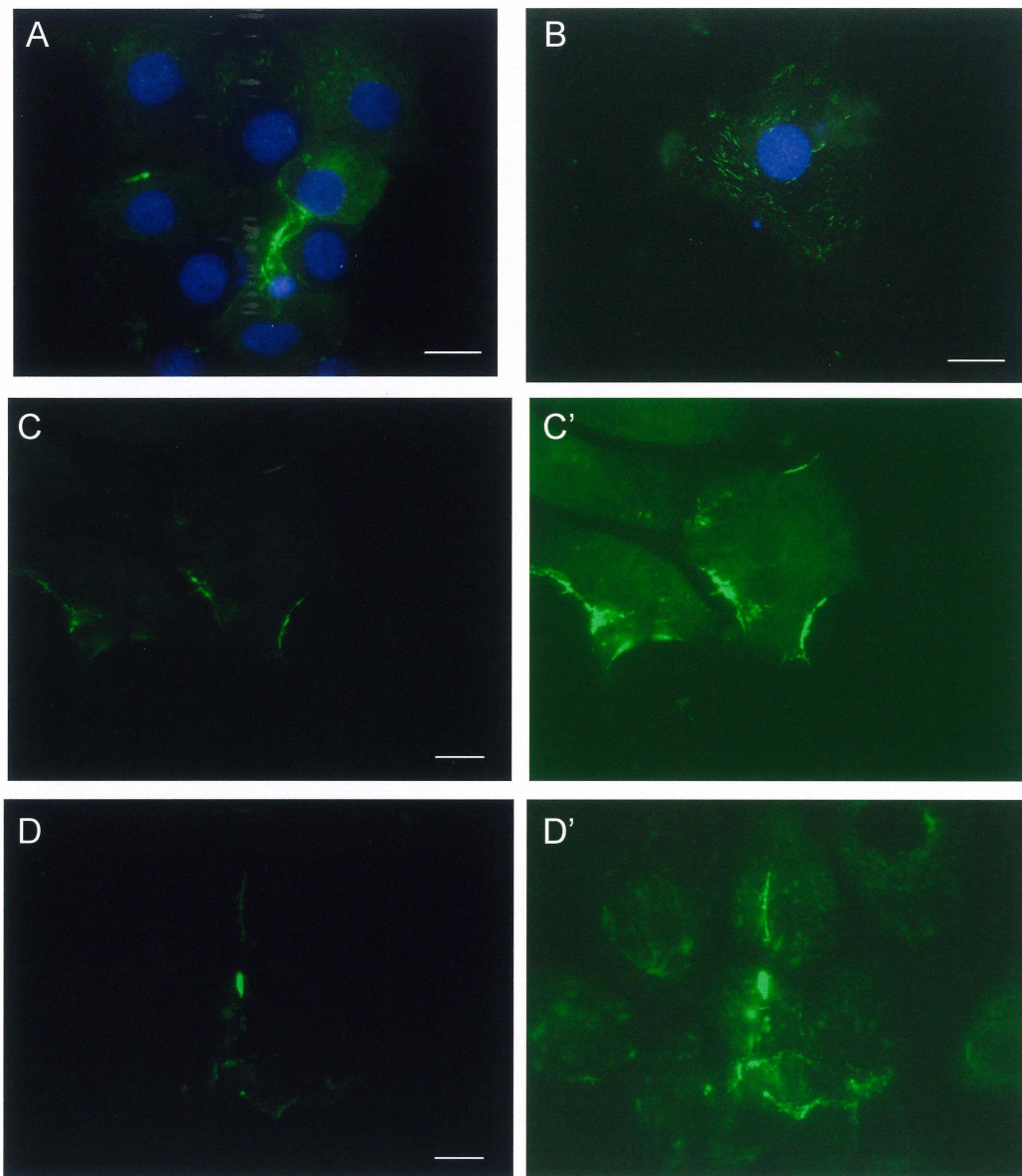


Figure 20. Production et arrangement de composantes de la MEC par les cellules glomérulées. A et B. FN; C et C'. Col IV; D et D'. LN. Barres = 10 μ m.

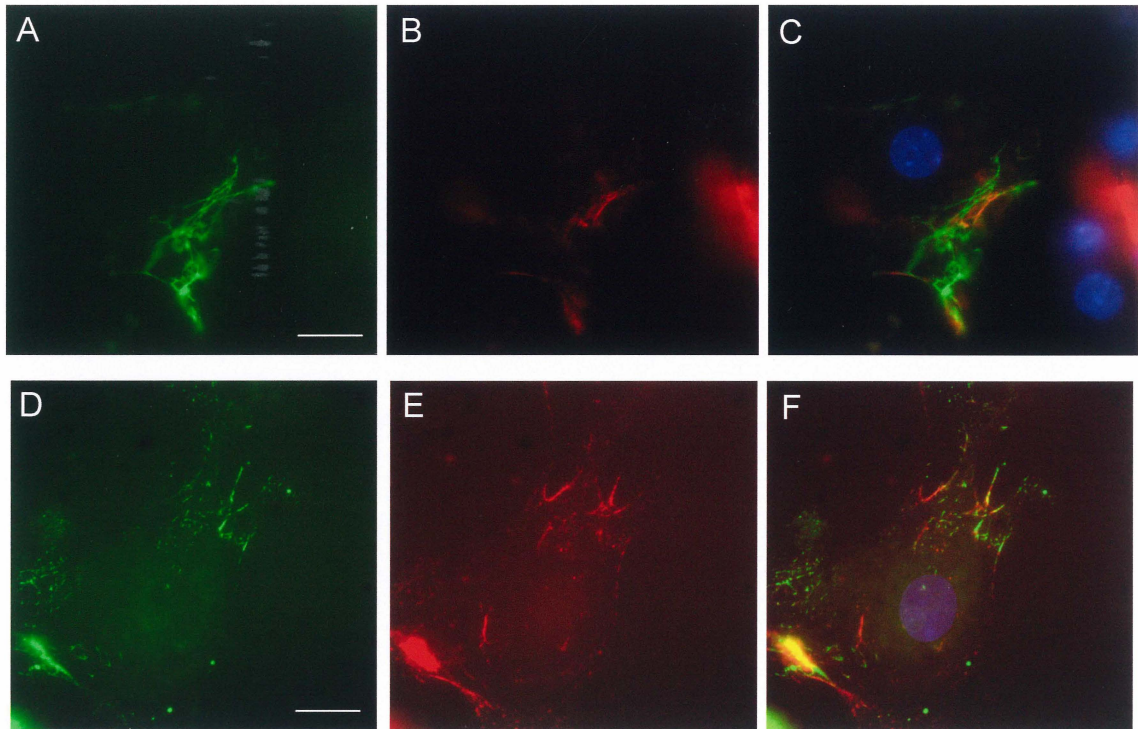


Figure 21. Colocalisation de la fibronectine et laminine-1 produites par les cellules glomérulées. Les cellules ont été isolées comme décrit dans les Matériels et Méthodes et la méthode double immunofluorescence directe a été utilisée. A et D. FN; B et E. LN; C et F. Superposition des images. Barre = 10 μ m.

4.2.5. Effet d'un anticorps $\alpha 5\beta 1$ sur la sécrétion de composants de la MEC par les cellules glomérulées

Afin de déterminer le rôle de l'intégrine $\alpha 5$ sur l'arrangement de la matrice de FN, les cellules ont été traitées pendant 3 jours avec 1 μ g d'anticorps anti-intégrine $\alpha 5\beta 1$. La figure 22 montre qu'un traitement de 3 jours affecte peu la sécrétion de FN par les cellules glomérulées. De petits complexes fibrillaires sont visibles après 3 jours de culture.

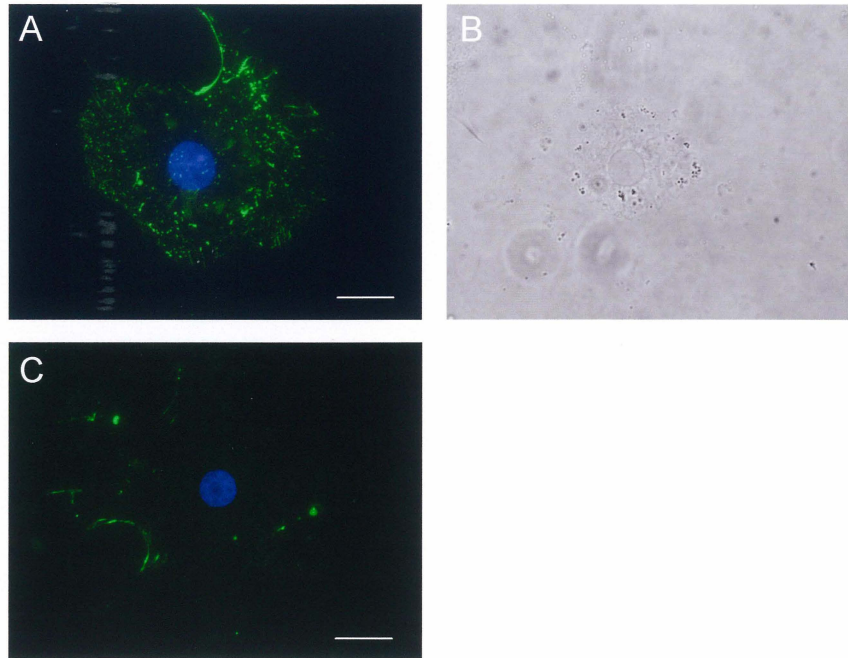


Figure 22. Effet de l'anticorps bloqueur anti- $\alpha 5\beta 1$ sur l'arrangement de la matrice de fibronectine. A et C. FN; B image visible de A. Barre = 10 μm .

4.2.6. Effet d'inhibiteurs des voies $p42/44^{mapk}$, Junk et p38 MAPK sur la sécrétion de fibronectine par les cellules glomérulées

Afin de déterminer quelle voie de signalisation intracellulaire était responsable de la sécrétion de FN par les cellules glomérulées, les cellules ont été traitées pendant 3 jours avec des inhibiteurs spécifiques des voies $p42/44^{mapk}$ (PD 98059), c-Jun N-terminal kinase (SP600125) et p38 MAPK (SB203580). La figure 23 montre qu'un traitement de 3 jours avec ces inhibiteurs affecte peu la sécrétion de FN par les cellules glomérulées.

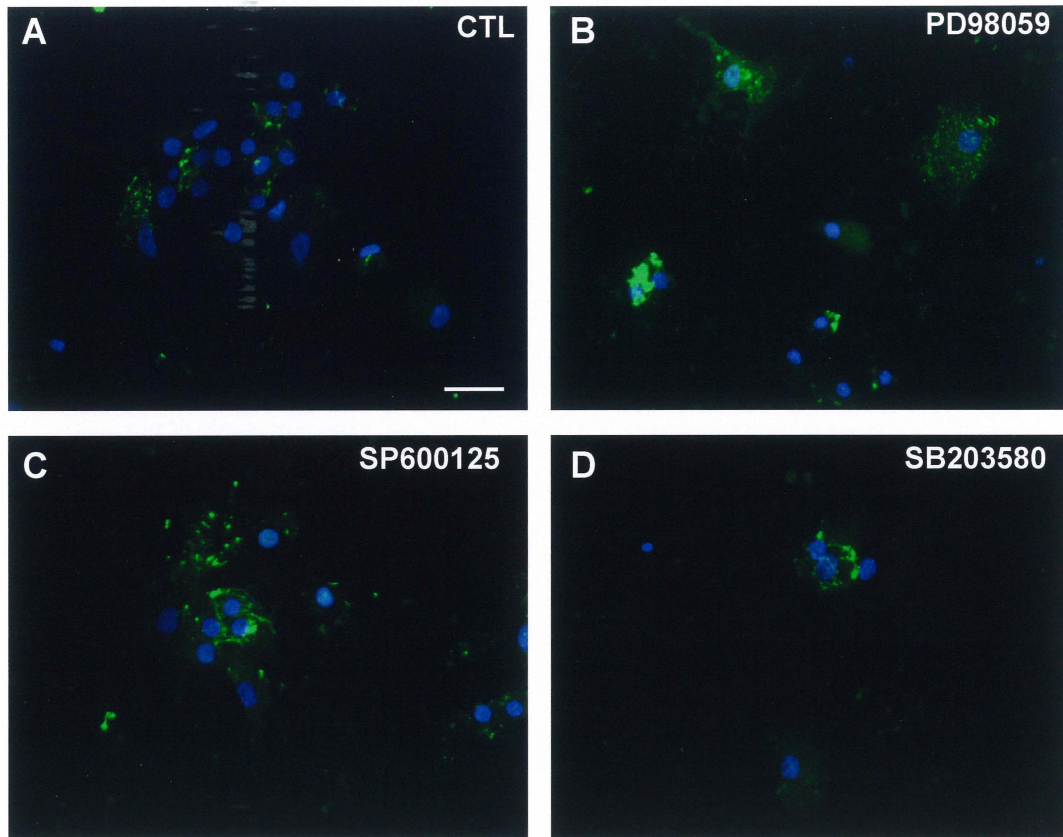


Figure 23. Effet d'inhibiteurs de voies de signalisation intracellulaire sur la sécrétion de fibronectine par les cellules glomérulées. Les cellules ont été isolées comme décrit dans les Matériels et Méthodes et les inhibiteurs ont été ajoutés aux cellules tous les jours pendant 3 jours. Les cellules ont ensuite été incubées avec un anticorps spécifique anti-FN. A) CTL; B) PD98059; C) SP600125 et D) SB203580. Barre = 50 μ m.

4.2.7. Effet de l'Ang II et production de fibronectine par les cellules glomérulées

Afin de déterminer les effets d'un traitement à l'Ang II sur la production de FN, les cellules ont été traitées tous les jours, de 1 à 3 jours avec 10^{-7} M d'Ang II. Les protéines ont été extraites et séparées par électrophorèse. La figure 24 montre qu'un traitement de 3 (B), 5 (C) ou 8 (D) jours n'affecte pas la sécrétion de FN par les cellules glomérulées.

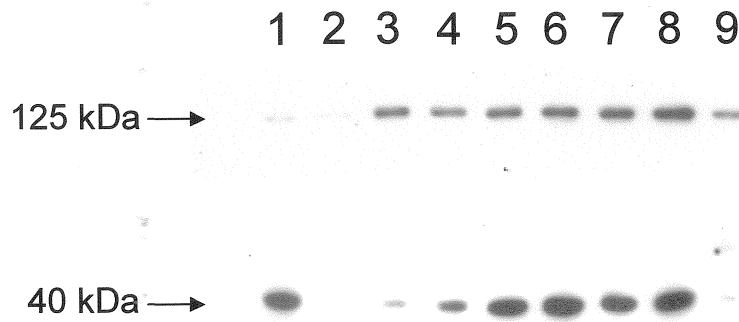


Figure 24. Effet de l'Ang II sur la production de fibronectine par les cellules glomérulées. Les cellules ont été obtenues comme décrit dans la section Matériels et Méthodes et mises en culture entre 1 et 8 jours. Après incubation avec un anticorps anti-FN, les membranes ont été lavées et incubées avec un anticorps anti-actine. 1) Contrôle positif, cerveau de rat adulte. 2) Extraction après isolation des cellules. 3) Jour 3. 4) Jour 3 + stimulation Ang II (0,2 μm). 5) Jour 5. 6) Jour 5 + stimulation Ang II (0,2 μm). 7) Jour 8. 8) Jour 8 + stimulation Ang II (0,2 μm). 9) Extrait total de glande surrénale.

4.3. Article #2: Fibronectin activates a TRPC3/6/7 channel in rat adrenal glomerulosa cells in culture.

Auteurs: Campbell Shirley, Bilodeau Lyne and Payet Marcel Daniel.

(Article en préparation)

Dans un article précédant (Campbell et al. 2003), nous avons montré que la stimulation des cellules glomérulées par la FN ou le peptide RGDS augmentait la concentration de calcium intracellulaire à la fois par un influx calcique et par une relâche des réserves intracellulaires. L'influx calcique provoqué par l'activation des intégrines est Ni^{2+} et Nifédipine insensible. Nous avons donc émis l'hypothèse que cet influx calcique pouvait provenir de l'ouverture de canaux cationiques non-sélectifs de la famille des TRP (Transient Receptor Potential) suite à l'activation des intégrines. Le deuxième article de cette thèse avait pour but de déterminer le profil d'expression des canaux TRPC chez les cellules glomérulées et de déterminer les mécanismes d'activation des canaux TRPC par la FN et l'angiotensine II.

(Comme ce manuscrit est en préparation, d'autres expériences suivront afin de compléter adéquatement les résultats décrits, i.e. rôle de la FN dans la translocation du TRPC6 à la membrane plasmique ainsi que des expériences de TIRF ou biotinylation des protéines membranaires afin de confirmer la translocation à la membrane plasmique. De plus, des expériences supplémentaires sont à prévoir afin de compléter les résultats montrant une implication des canaux TRPC dans la sécrétion d'aldostérone par les cellules glomérulées)

March 16th 2006

Fibronectin activates a TRPC3/6/7 channel in rat adrenal glomerulosa cells in culture.

Campbell Shirley, Bilodeau Lyne and Payet Marcel Daniel.

Département de Physiologie et Biophysique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada J1H5N4

Running title : Fibronectin activates TRPC 3/6/7 channels.

Key words: Fibronectin, integrins, Angiotensin II, TRPC 1, 3, 4, 6, 7 channels, intracellular calcium.

Correspondence and reprint requests to: Dr Marcel D Payet

Département de Physiologie et Biophysique, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé

Université de Sherbrooke

3001, 12^e avenue Nord, Sherbrooke, Québec, Canada J1H5N4

Tel : 819-564-5305

Fax : 819-564-5399

Email : Marcel.Payet@USherbrooke.ca

SUMMARY

Transient receptor potential channels (TRP) are non-selective cationic channels ubiquitously expressed in mammals, some of which are thought to trigger capacitative calcium entry into cells. The present study was aimed at establishing the presence of TRPC channels in rat glomerulosa cells and to elucidate the mechanism involved in fibronectin activation of TRPC channels. RT-PCR and immunohistochemistry experiments detected the presence of TRPC1, 3, 4, 6 and 7 in both cultured glomerulosa cells and rat adrenal tissue sections. Intracellular calcium measurement showed that both fibronectin (10^{-7} M) and Angiotensin II (5×10^{-7} M) increased intracellular calcium level in calcium-free medium. The fibronectin-induced intracellular calcium release is mediated by $\alpha 5\beta 1$ integrin since the pre-incubation of cells with the $\alpha 5\beta 1$ integrin blocking antibody blocked the fibronectin-induced increase of calcium. Readdition of 2 mM strontium (Sr^{2+}) or 2 mM calcium (Ca^{2+}) after the fibronectin or Angiotensin II response caused a sustained increase of intracellular fluorescence. Pre-incubation of cells with 1-[h-[3-(4-methoxyphenyl)propoxy]-4-methoxyphenethyl]-1H-imidazole (SKF-96365) (the putative store-operated Ca^{2+} (SOC) channels blocker) decreased the Sr^{2+} and Ca^{2+} entry in response to Angiotensin II and fibronectin. Indirect immunofluorescence showed that Angiotensin II increased the localization of TRPC6 at the plasma membrane while the localization of TRPC3 was not affected. These results indicated that TRPC3/6/7 channels could be involved in the secretory response of glomerulosa cells to Angiotensin II and to integrin activation by fibronectin.

INTRODUCTION

Integrins are transmembrane proteins composed of two subunits alpha (α) and beta (β) (for review, see (1-7)). Integrins form the main family of proteins that mediate cell-cell and cell-matrix interactions (8). The first important role identified for integrins was their ability to promote cell adhesion (2, 5, 9, 10). Over time, it has been shown that integrins can also mediate intracellular signaling pathways leading to cellular proliferation, differentiation and survival (11, 12), for a review, see: (4, 13-15). Many integrins bind the RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) peptide found in many extracellular matrix components, including fibronectin.

Fibronectin (FN) exists in plasma as a soluble form as well as in ECM as an insoluble form (16-19). Like LN, FN has specific domains that interact with other matrix components as well as with cells via integrin receptors (17). Integrin $\alpha 5\beta 1$ is specific for FN, but integrin $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha x\beta 2$, $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 6$ can also bind FN (20-23); (for review, see: (7, 24-26)).

Angiotensin II is an octapeptide hormone which binds both AT_1 and AT_2 receptor types. In adrenal gland glomerulosa cells, activation of the AT_1 receptor leads to the secretion of aldosterone (27). The signaling cascade linked to the AT_1 receptor is well known. Indeed, this seven transmembrane receptor is coupled to a G_q type G protein which activates phospholipase C (PLC) (28) to produce diacylglycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate ($InsP_3$) (29). The AT_2 receptor, on the other hand, has been shown to be coupled to the activation (30) or inactivation (31) of $p42/p44^{mapk}$, to the NO signaling cascade (31-33), and to a membrane-associated phospholipase A_2 (PLA_2) (34). In addition, the AT_2 receptor has been shown to be coupled to the production of eicosanoids through activation of PLC in renal microvessels (35).

Increase in cytosolic Ca^{2+} concentration plays a pivotal role in steroid secretion upon activation of AT_1 (36). Two sources have been identified for this rise in cytosolic Ca^{2+} : Ca^{2+} released from InsP_3 -sensitive intracellular stores and influx of Ca^{2+} from the extracellular medium. For many years, the importance of Ca^{2+} ions in the extracellular medium has been outlined for aldosterone secretion following Angiotensin II as well as K^+ stimulation (37-39). Voltage-dependent Ca^{2+} channels have been characterized in glomerulosa cells (40) and shown to allow Ca^{2+} influx after stimulation by Angiotensin II or K^+ ions (41-43). Moreover, in light of the moderate effect of Ca^{2+} voltage-dependent channels blockers on Ca^{2+} influx triggered by Angiotensin II, it has been proposed that a capacitative Ca^{2+} entry (CCE) could play a major role in steroidogenesis (44-47). In addition to Angiotensin II-induced calcium entry in glomerulosa cells, we have previously shown that fibronectin and RGDS peptide increased intracellular calcium level. This calcium increase involves both an extracellular calcium influx and the release of intracellular calcium from internal pools (48).

TRP (Transient Receptor Potential) channels have been assimilated to SOC (Store-Operated Channel) although still controversial (49). In mammalian cells, the TRPC subfamily is composed of 7 members subdivided into four subgroups (50). TRPC are activated by activation of G-protein coupled receptors and tyrosine kinase receptors (49). Members of group 3 (TRPC3/6/7) are activated by DAG and its analogs (51-53) as well as by arachidonic acid and its eicosanoid derivative 20-HETE (51).

Recent studies indicate that translocation of TRPC channels to the plasma membrane could be a step in their activation by various stimuli (54). Exocytotic insertion of TRPC6 has been demonstrated in HEK-transfected cells upon stimulation of the

muscarinic G_q -coupled receptor (55). Similar results were observed for the TRPC5 channels expressed in HEK cells stimulated with EGF (56).

A few studies have been devoted to the expression and characterization of TRPC channels in the adrenal gland. TRPC1, TRPC3, TRPC5 and TRPC6 are present in rat adrenal while TRPC4 is barely detectable (57, 58). However, in the bovine adrenal cortex, only TRPC1 and TRPC4 were found (59).

The aim of this study was to determine the expression of TRPC channels and the mechanism underlying the activation of TRPCs by fibronectin and Angiotensin II in glomerulosa cells. Results demonstrate the presence of TRPC1, 3, 4, 6 and 7 in glomerulosa cells. Intracellular calcium measurements show that fibronectin, Angiotensin II, OAG (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol) and TG (thapsigargin) increase intracellular calcium level in a calcium-free medium. The addition of Sr^{2+} or Ca^{2+} following stimulation of glomerulosa cells with fibronectin or Angiotensin II provoke Sr^{2+} or Ca^{2+} entry within cells. In addition, Angiotensin II, OAG and TG stimulation give rise to a translocation of TRPC6 channels to the plasma membrane. These results indicate that activation of Angiotensin II receptors by Angiotensin II and integrin activation by fibronectin activates TRPC channels in the adult rat adrenal glomerulosa cells.

RESULTS

Expression of Trp genes in adult rat adrenal glomerulosa cells.

Immunohistochemistry experiments were performed on rat adrenal tissue sections. Using specific antibodies, the presence of TRPC1, TRPC3, TRPC4 and TRPC6 was detected in the whole adrenal cortex (Figure 1, 10X). Observations at higher

magnification revealed that TRPC proteins were both found at the plasma membrane level as in the cytoplasm (Figures 1, B, D, F, H). Insets depict non-specific staining obtained by incubation of the antibodies with specific control antigens or by boiling the antibodies.

All subsequent studies, were performed on zona glomerulosa cells. Cells from the zona glomerulosa of rat adrenal glands were isolated as described in Material and Methods. The presence of members of the TRPC family was examined by performing RT-PCR on total mRNA isolated from glomerulosa cells cultured for 2-3 days. PCR products were generated through the use of gene-specific primers for TRPC 1, 3, 4, 5, 6, and 7. Rat derived-brain mRNA was used as positive control. Detectable amplicons for TRPC1 (372 bp), TRPC3 (317 bp) and TRPC6 (506 bp) were observed in glomerulosa cells. TRPC4 (415 bp) and TRPC7 (260 bp) were barely detectable while TRPC5 (340 bp) was absent (Figure 2). All forms of TRPC were detected in rat brain. PCR reactions were also performed in the absence of cDNA or without Taq Polymerase as negative controls (data not shown).

To further confirm the expression of TRPC6 in glomerulosa cells, western blot experiments were conducted as described in Material and Methods. As shown with specific antibody, a band at 67 kDa (Figure 2G, 1) was observed. To access non-specific labeling of TRPC6 antibody, the antibody was pre-incubated with a specific peptide control prior detection. The band at 67 kDa was clearly absent, thus validated the specificity of the antibody (Figure 2G, 2).

Fibronectin activates TRPC3/6/7 channels in glomerulosa cells

Activation of integrins has been reported to trigger increases of intracellular Ca^{2+} in several cell types (48). Figure 3A showed a transient increase of intracellular calcium

following stimulation with fibronectin (10^{-7} M) in a free- Ca^{2+} medium. Similar transient intracellular calcium increases were induced by Ang II ($0.2 \mu\text{M}$) (Figure 3B) and TG ($2 \mu\text{M}$) (Figure 3D), whereas stimulation of cells with OAG ($100 \mu\text{M}$) did not (Figure 3C). In order to determine the involvement of transient receptor potential channel in our system, Sr^{2+} and Ca^{2+} was added in the external medium. The readdition of Sr^{2+} following Fibronectin stimulation in a calcium-free medium led to a sustained increase of Sr^{2+} within the cells (Figure 3A). Ang II stimulation also provoked a sustained Sr^{2+} entry within the cells (Figure 3B) like TG and OAG (Figure 3C and D respectively). The Sr^{2+} entry show only a portion of ion entry since further ions entry (Ca^{2+}) can be induce by the readdition of Ca^{2+} in the medium following fibronectin or Ang II stimulation (Figure 4A and B). Pre-incubation of cells with SKF-96365 (a non-selective TRP channels blocker) blocked the Sr^{2+} entry following both fibronectin and Ang II stimulation (Figure 4C and D respectively) and altered Ca^{2+} entry. In order to determine the integrin isoform involved in the FN-induced transient increase of intracellular calcium, the cells were pre-incubated with an antibody anti- $\alpha 5\beta 1$ (known to block this integrin function). The pre-incubation of cells with ($5 \mu\text{g}$) of antibody totally blocked the FN-induced increase of intracellular calcium (Figure 5A) but do not prevent cells-response to Ang II (Figure 5B).

Translocation of TRPC6 channels

Translocation of TRPC3 and TRPC6 channels to the plasma membrane was studied by immunocytochemistry as described in Material and Methods. In basal conditions, immunofluorescence staining of TRPC6 channels was sparsely detected at the membrane but rather scattered throughout cytoplasm (Figure 6A) while TRPC3 channels were observed with a clear localization at the plasma membrane (Figure 6D).

After stimulation with Angiotensin II (0.2 μ M) for a period of 20 min, staining of TRPC6 channels was more abundant at the plasma membrane level (Figure 6B) indicative of a translocation of the channels to the membrane. In contrast, stimulation with Angiotensin II has no effect on a relocalization of TRPC3 as immunostaining was comparable to that observed in control conditions (Figure 6E). The different stimuli used to activate the Angiotensin II-sensitive current were then tested to reveal any effect on TRPC6 and TRPC3 channel localization. It was found that OAG, and TG were all able to trigger an accumulation of TRPC6 staining in the plasma membrane (Figure 6C, and data not shown respectively). As observed with Angiotensin II, none of these compounds effectively modified the immunostaining of TRPC3 channels, which remained distributed as punctuated in the whole cell as well as at the plasma membrane level (data not shown). Localization of TRPC6 channels to the plasma membrane was quantified. In control conditions, less than 20 % of the cells displayed a marked TRPC6 staining at the membrane. Each of the compounds Angiotensin II, OAG, and TG increased the percentage of plasma membrane positive cells to values around 60 % (Figure 6F; three different experiments). As shown, 70% of the cells displayed a high level of TRPC3 localization at the membrane level in control conditions (Figure 6G). No significant change was observed after stimuli application.

DISCUSSION

Here, we report that fibronectin activates nonselective cationic channels in adult rat adrenal gland glomerulosa cells which expressed TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 and TRPC7 channels. Biophysical data indicate that the activated channel could belong to the TRPC family. Furthermore, known activators of the TRPC subgroup 3 *i.e.* G_q -

coupled receptors, OAG, induced a translocation of the TRPC6 channels to the plasma membrane and induced a Sr^{2+} entry in glomerulosa cells.

TRPC channels are expressed in a variety of tissues with notably high expression of all TRPC in the brain (60), for review see (49)). In the present study, TRPC1, TRPC3/6/7, and TRPC4 were found to be present in rat adrenal cortex, which is in agreement with the results of Garcia and Schilling (58). Conversely, differing results were reported by Philipp et al. in bovine adrenal cortex where only TRPC1 and TRPC4 were detected (59). In the cell line SBAC, derived from the bovine fasciculata-reticularis zone of the adrenal cortex, TRPC1, TRPC3 and TRPC4 were all present with TRPC4 having the highest level of expression (59). The discrepancies between the results of Philipp et al. on the one hand, and those of Garcia and ours on the other could be related to species difference *i.e.* bovine versus rat. Western blot experiment revealed a band around 67 kDa for TRPC6 from glomerulosa cells. Many studies reported different results regarding the TRPC6 Western Blot experiments using the same antibody. Bands at 112 kDa, 100kDa or two bands (around 55 and 117 kDa) were reported respectively for gingival keratinocytes (61), human myometrial smooth muscle (62) and in distal pulmonary arteries and rat brain (60, 63). Difference between our results and other studies may come from the different protein extraction methods, the TRPC6 isoform expressed in glomerulosa cells versus other cell types, as well as distinct glycolysation level of TRPC6.

It has long been known that Angiotensin II, in adrenal cortical cells, induces a transient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase, consequent to an emptying of InsP_3 -sensitive Ca^{2+} -pools, followed by a sustained phase due to Ca^{2+} influx (for a review (64)). Ca^{2+} influx can originate from the activation of several ionic channels and exchangers. Angiotensin II activates the T-type voltage-activated Ca^{2+} channel by depolarizing the membrane (65) or by shifting

the voltage dependency of the channel toward a more negative potential (66). Involvement of the L-type voltage-activated Ca^{2+} channels is more controversial since nifedipine was shown to moderately block the Ca^{2+} signal (47, 67). Furthermore, physiological concentrations of Angiotensin II have an inhibitory effect on L-type Ca^{2+} currents activated by K^+ depolarization (68). A capacitative Ca^{2+} entry (69) has also been described in glomerulosa cells in which Ca^{2+} entry was activated by TG, a compound known to empty intracellular Ca^{2+} stores (44, 70); this Ca^{2+} influx was shown to be DHP-insensitive (45). The CRAC channel (calcium release activated calcium) (71) is the canonical store-operated channel for which the mechanism of activation is still poorly understood (72). This channel is characterized by very high permeability to Ca^{2+} , a property that has been used to distinguish the CRAC channel from the cationic non-selective TRPC channels (73, 74). TRPC1-7 channels have been characterized as SOC (constitutively activated), non SOC, SMOC (second messenger operated channel with DAG as second messenger), or RAC or ROC (receptor activated channel or receptor-operated channel) (see (75-78)). It is rather striking that data in the literature are divided equally with regard to the activation of TRPC by store depletion, namely pro-SOC or con-SOC according to the method of study *i.e.* Ca^{2+} imaging versus patch-clamp data respectively (49). Our data showed that Ang II induced Sr^{2+} entry in glomerulosa cells. Sr^{2+} permeability has been attributable to SOC mechanism by TRP channel in many studies (74). Moreover, the use of SKF-96365 (the blocker of store-operated Ca^{2+} (SOC) channels) did decrease the Sr^{2+} entry in response to Ang II stimulation as reported by Thebault et al., in rat prostate smooth muscle cell line PS1 (79).

Many studies have shown that the activation of integrin leads to an increase in intracellular calcium and that ion channels may be regulated by integrins (for a review

see (80)). The cytosolic Ca^{2+} -increase also involves InsP_3 production leading to Ca^{2+} release from the ER (81). The Ca^{2+} influx induced by the activation of integrins, like for Ang II-mediated calcium mobilization, can originate from the activation calcium channels (82, 83). However, opposite effects can be observed with different integrin isoforms. Indeed, Wu et al. showed that the activation of $\alpha_5\beta_1$ integrin leads to stimulation of a Ca^{2+} channel (L-type Ca^{2+} channel, (83)), whereas the $\alpha_v\beta_3$ integrin isoform leads to inhibition of the same channel in arteriolar smooth muscle cells (84). In glomerulosa cells, this increase is the result of both the extracellular Ca^{2+} influx and the release of intracellular calcium from internal stores (48). The calcium influx induced by the activation of glomerulosa cells integrins by RGDS is not sensitive to non-specific voltage-gated channel blockers like Nifedipine and Ni^{2+} . Based on the similarities between Ang II and FN-induced calcium mobilization in our system, we hypothesized that TRPC channels may be involved in the integrins-induced Ca^{2+} influx in glomerulosa cells. As for seen with Ang II, stimulation of glomerulosa cells with FN induced a transient calcium increase in a Ca^{2+} -free medium. The replacement of the Ca^{2+} -free medium with a 2 mM containing Ca^{2+} medium resulted in an increase of fluorescence within the cells revealing Ca^{2+} entry. A Sr^{2+} entry was also induced by FN, pointing out the involvement of TRPC channels by activation of glomerulosa cells integrin by FN. The Sr^{2+} entry induced by FN was decreased by SKF-96365, a putative store-operated Ca^{2+} (SOC) channels blocker (85-87).

All known mammalian TRPC channels (TRPC1-7) can be activated by membrane receptors (GPCRs) coupled to the G_q -PLC β signaling cascade and receptor tyrosine kinase (for a review see (49)). Activation of PLC β leads to DAG and InsP_3 production, both of which can directly or indirectly activate TRPC3/6/7 channels (for a review see (77)). As mentioned above, the activation of Angiotensin II AT1 receptor leads to

production of inositol 1,4,5-triphosphate (InsP₃). The increase of calcium needed for the activation of TRPC6 SOC, in our system, could thus imply InsP₃-sensitive calcium stores. In addition, interaction between TRPC3 and the InsP₃R has been shown to be a possible mechanism of TRPC channel activation (88, 89). However, conflicting results have been reported in receptor InsP₃ knockout cells where it was shown that TRPC3 channels are activated independently of InsP₃Rs, but rather through DAG production resulting from activation of PLC-β or PLC-γ (73, 90). Indeed, DAG and derivatives of DAG, such as OAG, directly activate TRPC1 (91), TRPC3 and TRPC6 channels (51, 52), and TRPC7 (53). Addition of OAG in our system also provoked Sr²⁺ entry in glomerulosa cells. As OAG alone do not provoke Ca²⁺ mobilization from ER, it is thus possible that TRPC3/6/7 may act as ROC instead of SOC in glomerulosa cells as seen in (92). Following TG (an inhibitor of intracellular calcium (SERCA) pumps) application, the intracellular calcium stores are released, which causes increased fura-2 fluorescence. TG has been used in many studies to determine the presence of store-operated calcium entry (92-94). In glomerulosa cells, TG induced Sr²⁺ and Ca²⁺ entry, it further points out of a role for TRPC3/6/7 as SOC. However, as TRPC may form heteromultimeres, it would not be surprising to be in the presence of TRPC3/6/7 being both ROC and SOC as revealed by Lin et al., 2004, as TRPC3 has found to be a SOC and TRPC6 ROC (92). Finally, our result showed that only a portion of ion entry is revealed by Sr²⁺ since further ions entry (Ca²⁺) can be induced by the readdition of Ca²⁺ in the medium following Sr²⁺ readdition. This could reveal the presence of two calcium influx mechanism (94).

Recruitment to the plasma membrane could be a necessary step in the activation of some TRPC channels. Indeed, activation of G_q protein-coupled receptor induced an exocytotic insertion of TRPC6 channels in the plasma membrane of transfected HEK

293 cells (55). Similar results were obtained for expressed TRPC5 channels upon activation of the EGF receptor (56) and TRP-3, a TRPC homolog channel found in sperm (95). However, TRPC1 as well as the heteromeric TRPC1+TRPC5 channel were not recruited to the plasma membrane (56). In glomerulosa cells, Angiotensin II, OAG, and TG induced relocalization of TRPC6 channels to the plasma membrane, but this was not observed for TRPC3 channels. The recruitment of TRPC channels to the plasma membrane could constitute a novel mechanism of regulation.

In summary, we present evidence for the presence of TRPC3/6/7 channels in glomerulosa cells. Based on Sr^{2+} sensitivity and activation by OAG, it is hypothesized that Angiotensin II and fibronectin activate this subfamily of channels in glomerulosa cells. In glomerulosa cells, an increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is required for aldosterone secretion. TRPC3/6/7 channels could constitute one of the various pathways described (64) in this action which can be modulated by translocation of channels to the plasma membrane.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

The chemicals used in the present study were obtained from the following sources: ATP, GTP, PD123319 and DNase from Sigma (St-Louis, MO); anti-rabbit TRPCs from Alomone (Austin, TX); collagenase, MEM-Eagle-Medium and OPTI-MEM from Invitrogen (Burlington, Ont, Canada); RNA extraction kit from Ambion (Austin, TX); ABC Elite Kit from Vector Laboratories (Burlington, Ont, Canada); goat anti-rabbit secondary antibody coupled to Alexa Fluor 488 from Molecular Probes (Eugene, OR); Angiotensin II from Bachem (Marina Delphen, CA); 1-Oleoyl-2-Acetyl-glycerol (OAG); fibronectin and thapsigargin (TG) from Calbiochem-Novabiochem Corp (San Diego, CA). All chemicals products were of grade A purity.

Preparation of glomerulosa cells

Rat adrenal glomerulosa cells were obtained as previously described (96). Female Long Evans rats (200-250 g) were decapitated and adrenal glands excised. Animal protocols were approved by the animal committee at the University of Sherbrooke and followed ethical guidelines from the Canadian Council on Animal Care. The successive steps in glomerulosa cells isolation were performed in MEM Eagle's medium. After incubation (20 min) at 37 C in collagenase (2 mg/ml, 4 glomerulosa/ml) plus deoxyribonuclease (25 µg/ml), cells were disrupted by aspiration with a sterile 10ml pipette, filtered (22 µm) and centrifuged for 10 min at 100 x g. The cell pellet was re-suspended in OPTI-MEM medium supplemented with 2% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were plated at varying densities, depending on experiments, either in 35 mm Petri dishes or coverslips and maintained at 37 C in a humidified

atmosphere of 95 % air / 5% CO₂ and used after 1 to 3 days of culture (96). Cells were examined daily with phase contrast images taken using a Leica Corp. microscope (Deerfield, IL) equipped with a 32x objective.

RT-PCR Amplification

Rat adrenal glomerulosa cells were isolated as described above and plated at a density of 5×10^5 cells in plastic dishes and allowed to adhere for 3 days. Total RNA was extracted using the RNAqueous method according to the manufacture's user's guide (Ambion). RNA was dissolved in elution solution prior to determining total RNA concentration by OD (260 nm) from which 2 μ g of RNA was reversed transcribed into first strand cDNA. For each preparation, oligo-d(T) (5 U), dNTPs (10 mM) (Amersham, Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), M-MLV, First 5X M-MLV buffer and RNAsin (all from Promega, Madison, WI) were used. cDNA was used for each PCR reaction. Primer pairs were used on previously published sequences. The primer sequences used are as follows:

1) TRPC1: sense: 5'CAA GAT TTT GGG AAA TTT CTG G'3; anti: 5'TTT ATC CTC ATG ATT TGC TAT'3; 2) TRPC3 sense: 5'TGA CTT CCG TTG TGC TCA AAT ATG'3; anti: 5'CCT TCT GAA GCC TTC TCC TTC TGC'3; 3) TRPC4: sense: 5' TCT GCA GAT ATC TCT GGG AAG AAT GC '3; anti: 5' AAG CTT TGT TCG AGC AAA TTT CCA CTC'3; 4) TRPC5 : sense: 5'ATC TAC TGC CTA GTA CTA CTG GCT'3; anti: 5'CAG CAT GAT CGG CAA TGA GCT G'3; 5) TRPC6 : sense:5' AAC AAA AGC ATG ACT CCT TCA '3; anti:5' AAG GAG CAC ACC AGT ATA TGA GA'3; 6)TRPC7 : sense: 5'TGA CAG CCA ATA GCA CCT TCA'3; anti: 5'GCA GGT GGT CTT TGT TCA GAT'3. GAPDH was used as a control of RNA integrity. PCR reactions were carried out using 4 μ l of cDNA, dNTPs (10 mM), Taq

Polymerase (Amersham) and 10X Taq Polymerase PCR buffer with amplification performed on a Perkin-Elmer amplification system. For visualization, 10 µl of PCR product was loaded on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide and scanned using a Fluorimager.

Immunohistochemistry

For immunohistochemistry experiments, 5 µm paraffin sections of adult adrenal glands were dewaxed using xylene and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol. Sections were rinsed in tap water and immersed in an unmasking antigen solution (Vector Laboratories) to aid antigen recovery. Sections were subsequently immersed in 0.3% H₂O₂/H₂O for 30 min at 4 C in order to quench endogenous peroxidase activity. After PB (in mM: NaH₂PO₄ 28.75, Na₂HPO₄ 2.49, pH 7.4) washings, sections were incubated with avidin/biotin solution for 30 min. Incubation of sections with normal serum was followed by incubation with TRPC specific antibodies (1:200) for 60 min at room temperature or overnight at 4 C. Sections were rinsed and incubated with biotinylated secondary antibody and processed with Vectastain Elite ABC Reagent (Vector Laboratories). The peroxidase reaction included the use of 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in the presence of 0.05% H₂O₂ as chromogen (Sigma) and counterstained with hematoxylin. Sections were dehydrated and mounted with Vectamount Permanent solution (Vector Laboratories). Negative controls were performed by incubation of the antibodies with control antigens or by boiling the antibodies for 15 min.

Immunoblot

The cells were lysed with 100 µl of ice-cold modified RIPA buffer (radioimmune precipitation assay buffer (50 mM NaCl, 1% Triton 100-X, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0,

containing mini-complete protease inhibitors) for 30 min at 4 C followed by 10 passages through a 25-gauge needle. The proteins were fractionated on 8% acrylamide standard SDS-PAGE gels and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) in 150 mM glycine, 20 mM Tris-base, and 20% methanol. The blots were blocked overnight at 4 C in TBST containing 5% (w/v) nonfat skim milk. The blots were then incubated overnight at 4 C with primary antibodies rabbit anti-TRPC6 (dilution 1:500). After three washes with TBST, the membranes were incubated with a peroxidase-conjugated secondary antibody, donkey anti-rabbit 1:2,000 for 1 h at room temperature in TBST. The blots were washed four times with TBST, and the immune complexes were visualized with the ECL Plus detection system (Amersham Biosciences). For non-specific interaction, anti-TRPC6 antibody was pre-incubated 2 hrs at room temperature with the control peptide before the overnight blot incubation at 4C.

Immunocytochemistry

Rat's adrenal glomerulosa cells (50 000) were obtained as described above and seeded on fibronectin 22 mm coverslips. After 24 or 48 h, cells were stimulated as required. Cells were then washed with PBS (136.89 mM NaCl; 2.68 mM KCl; 18.88 mM Na₂HPO₄ and 1.76 mM KH₂PO₄, pH. 7.4) and fixed in 3.7% formaldehyde for 15 min at 4°C. PBS washes were followed by incubation of cells with glycine (0.1 M) for 30 min at room temperature. Cells were blocked with 0.5% BSA for 60 min at room temperature and incubated overnight with TRPC 3 or TRPC 6 primary antibodies (dilution 1:100) at 4 C. Cells were washed with PBS and incubated with the secondary Alexa-488 conjugated goat anti-rabbit antibody (dilution 1:500) for 60 min at room temperature . Cells were washed two times with PBS and coverslips were mounted for observation with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) on microscope

slides. Non-specific labelling was assessed by boiling the first antibodies for 15 min or by incubation of antibodies with control peptides.

Solutions and intracellular calcium measurement

Solutions: Composition of solutions used in experiments was as follows. The calcium-free extracellular solution contained (mM): NaCl, 140; KCl, 5.4; MgCl₂, 1; EGTA, 1; HEPES, 10; glucose, 2g/l; pH 7.4. The extracellular solution with Ca²⁺ was obtained by adding 1mM Ca²⁺ to the basic solution without EGTA. The strontium solution contained (mM) : NaCl, 140; KCl, 5.4; MgCl₂, 1; SrCl₂, 2; HEPES, 10; glucose, 2g/l; pH 7.4. Solutions containing the various drugs were prepared daily from stock solutions.

Intracellular calcium measurement: Glomerulosa cells, plated on poly-L-lysine (10 µg/ml) coated coverslips in OPTI-MEM (2% FBS), were used between 1 and 3 days of culture. For loading purposes with the fluorescent calcium sensitive dye FURA-2AM (4 µM), cells were incubated for 30 min at 37 C in a physiological medium containing (mM): NaCl 140; KCl 5.4; CaCl₂ 2; MgCl₂.6H₂O 1; HEPES 10; pH 7.35. A free-Ca²⁺ medium was used which had the composition (mM): NaCl 140; KCl 5.4; MgCl₂.6H₂O 1; HEPES 10; EGTA 1; pH 7.35. For hydrolysis of the FURA-2 AM, cells were washed with HBS/1% BSA and incubated for 30 min at 37 C in medium without dye. Coverslips containing the loaded cells were placed in a chamber and mounted on a Nikon Eclipse 300 Microscope. The experiments were done at room temperature. Excitation wavelengths were set at 340 and 380 nm with two filters (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT) placed in a filter wheel (Sutter Instrument Company, Novato, CA) and emission was set at 420 nm. The images were acquired with a CoolSnap *f_x* camera and analysed with the MetaFluor software (Universal

Imaging Corporation, Downingtown, PA). Ratio (340:380) were converted in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) by the MetaFluor software with an external high-low calibration technique (97). Strontium medium was obtained by replacing 2 mM $CaCl_2$ by 2 mM $SrCl_2$.

Acknowledgments: We thank Dre Nicole Gallo-Payet for helpfully discussions and criticisms. This work was granted by the IRSC to MDP.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Immunohistochemical localization of TRPCs isoforms in the rat adult adrenal gland. Paraffin-sections (5µm) from rat adrenal gland were deparaffinized and hydrated for standard indirect immunoperoxidase immunohistochemistry as described in Methods. A) Rat adrenal cortex and medulla staining for TRPC1. B) Magnification X100 for TRPC1 staining in the zona glomerulosa. C) Rat adrenal cortex and medulla staining for TRPC3. D) Magnification X100 for TRPC3 staining in the zona glomerulosa. E) Rat adrenal cortex and medulla staining for TRPC4. F) Magnification X100 for TRPC4 staining in the zona glomerulosa. G) Rat adrenal cortex and medulla staining for TRPC6. H) Magnification X100 for TRPC6 staining in the zona glomerulosa. Insets show negative controls. Magnification X10, scale bar = 200 microns; Magnification X100, scale bar = 20 microns.

Figure 2: Presence of TRPC mRNA in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. A) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR 372-bp amplicon corresponding to the TRPC1 isoform. Lane 1, Size marker (bp); lane 2, positive control (brain); lane 3, glomerulosa cells. B) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR 317-bp amplicon corresponding to the TRPC3 isoform. Lane 1, Size marker (bp); lane 2, positive control (brain); lane 3, glomerulosa cells. C) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR 415-bp amplicon corresponding to the TRPC4 isoform. Lane 1, Size marker (bp); lane 2, positive control (brain); lane 3, glomerulosa cells. D) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR 340-bp amplicon corresponding to the TRPC5 isoform. Lane 1, Size marker (bp); lane 2, positive control (brain); lane 3, glomerulosa cells. E) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR 506-bp amplicon corresponding to the TRPC6 isoform.

Lane 1, Size marker (bp); lane 2, positive control (brain); lane 3, glomerulosa cells. F) Agarose gel electrophoresis of RT-PCR 260-bp amplicon corresponding to the TRPC7 isoform. Lane 1, Size marker (bp); lane 2, positive control (brain); lane 3, glomerulosa cells. G) Western blot of TRPC6 in glomerulosa cells (1) and positive control (protein extract from rat's brain) (2), incubation of antibody with specific control peptide for glomerulosa cells (3) and rat's brain (4).

Figure 3: Fibronectin-induced strontium influx in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. A) FN (10^{-7} M) -induced Sr^{2+} entry. B) Ang II ($0.2 \mu\text{M}$)-induced Sr^{2+} entry. C) TG ($2 \mu\text{M}$)-induced Sr^{2+} entry. D) OAG ($100 \mu\text{M}$)-induced Sr^{2+} entry.

Figure 4: Effect of inhibitors on fibronectin-induced strontium influx in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. A) Addition of $2 \text{ mM } Ca^{2+}$ after Sr^{2+} response still increases intracellular fluorescence induced by FN (10^{-7} M). B) Addition of $2 \text{ mM } Ca^{2+}$ after Sr^{2+} response still increases intracellular fluorescence induced by Ang II ($0.2 \mu\text{M}$). C) FN-induced Sr^{2+} entry is abolished and Ca^{2+} entry is decreased by SKF-96365. D) Ang II-induced Sr^{2+} entry is abolished and Ca^{2+} entry is decreased by SKF-96365.

Figure 5: Effect of an anti- $\alpha 5\beta 1$ antibody on fibronectin-induced transient increase of intracellular calcium in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. A) Pre-incubation of cells with an anti- $\alpha 5\beta 1$ antibody abolished intracellular calcium induced by FN. B) Pre-incubation of cells with an anti- $\alpha 5\beta 1$ antibody abolished intracellular calcium induced by FN without affecting cell's response to Ang II.

Figure 6: Membrane localization of TRPC6 and TRPC3 channels in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. Cells were stimulated for 20 min and incubated with TRPC6 or TRPC3 antibodies as described in Methods. Arrows indicated plasma membrane regions with a high channels expression. Pictures A to C illustrated the TRPC6 channel localization after application of various stimuli: A) Control condition; B) Stimulation with Angiotensin II (200 nM); C) with OAG (100 μ M). F) Percentage of cells expressing TRPC6 channels to the plasma membrane; 1. Non-stimulated cells (n=109); 2. Stimulation with Angiotensin II (200 nM) (n=81); 3. Stimulation with OAG (100 μ M) (n=107); 4. Stimulation with TG (1 μ M) (n=33). TRPC3 channels localization: D) Control condition; E) Stimulation with Angiotensin II (200 nM); G) Percentage of cells expressing TRPC3 channels to the plasma membrane; 1. Non-stimulated cells (n=51); 2. Stimulation with Angiotensin II (200 nM) (n =40); 3. Stimulation with OAG (100 μ M) (n=39); 4. Stimulation with TG (1 μ M) (n=26). Data are from at least three different experiments. * vs. CTL, p<0.01. Scale: 10 μ m.

REFERENCES

1. **Humphries MJ** 2000 Integrin structure. *Biochem Soc Trans* 28:311-339.
2. **Albelda SM, Buck CA** 1990 Integrins and other cell adhesion molecules. *Faseb J* 4:2868-80.
3. **Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL** 1998 Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* 50:197-263.
4. **Giancotti FG** 2000 Complexity and specificity of integrin signalling. *Nat Cell Biol* 2:E13-4.
5. **Hynes RO** 1992 Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
6. **Sastry SK, Horwitz AF** 1993 Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. *Curr Opin Cell Biol* 5:819-831.
7. **Sonnenberg A** 1993 Integrins and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 184:7-35.
8. **Hynes RO** 2002 Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110:673-687.
9. **Cheresh DA** 1992 Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion. *Clin Lab Med* 12:217-36.
10. **Bosman FT** 1993 Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem J* 25:469-77.
11. **Vacca A, Ria R, Presta M, et al.** 2001 alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. *Exp Hematol* 29:993-1003.
12. **Haack H, Hynes RO** 2001 Integrin receptors are required for cell survival and proliferation during development of the peripheral glial lineage. *Dev Biol* 233:38-55.
13. **Schwartz MA, Assoian RK** 2001 Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci* 114:2553-60.
14. **Schwartz MA** 1992 Transmembrane signalling by integrins. *Trends Cell Biol* 2:304-307.

15. **Giancotti FG** 1997 Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9:691-700.
16. **Aota S, Yamada KM** 1995 Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 70:1-21.
17. **Mosher DF** 1984 Physiology of fibronectin. *Annu Rev Med* 35:561-575.
18. **Romberger DJ** 1997 Fibronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 29:939-943.
19. **Ruoslahti E** 1988 Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem* 57:375-413.
20. **Guan JL, Hynes RO** 1990 Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. *Cell* 60:53-61.
21. **Mould AP, Wheldon LA, Komoriya A, Wayner EA, Yamada KM, Humphries MJ** 1990 Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as the integrin alpha 4 beta 1. *J Biol Chem* 265:4020-4024.
22. **Mould AP, Humphries MJ** 1991 Identification of a novel recognition sequence for the integrin alpha 4 beta 1 in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *Embo J* 10:4089-4095.
23. **Wayner EA, Garcia-Pardo A, Humphries MJ, McDonald JA, Carter WG** 1989 Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol* 109:1321-1330.
24. **van der Flier A, Sonnenberg A** 2001 Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305:285-298.
25. **Mizejewski GJ** 1999 Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:124-38.
26. **Gonzalez-Amaro R, Sanchez-Madrid F** 1999 Cell adhesion molecules: selectins and integrins. *Crit Rev Immunol* 19:389-429.
27. **Quinn S, Brauneis U, Tillotson D, Cornwall M, Williams G** 1992 Calcium channels and control of cytosolic calcium in rat and bovine glomerulosa cells. *Am J Physiol* 262:C598-C606.
28. **Boulay G, Gallo-Payet N, Guillemette G** 1990 Implication of phospholipase C in the steroidogenic action of angiotensin II. *Eur. J. Pharmacol.* 189:267-275.
29. **Rossier MF, Capponi AM, Vallotton MB** 1988 Inositol trisphosphate isomers in angiotensin II-stimulated adrenal glomerulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 57:163-8.
30. **Gendron L, Laflamme L, Rivard N, Asselin C, Payet M, Gallo-Payet N** 1999 Signals from the AT2 receptor of angiotensin II inhibit p21ras and activate MAPK

to induce morphological neuronal differentiation in NG108-15 cells. *Mol Endocrinol* 13:1615-1626.

31. **Bedecs K, Elbaz N, Sutren M, et al.** 1997 Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem. J.* 325:449-454.
32. **Gendron L, Oligny J, Payet M, Gallo-Payet N** 2003 Cyclic AMP-independent involvement of Rap1/B-Raf in the angiotensin II AT2 receptor signaling pathway in NG108-15 cells. *J Biol Chem* 278:3606-3614.
33. **Gendron L, Payet MD, Gallo-Payet N** 2003 The AT2 receptor of angiotensin II and neuronal differentiation: From observations to mechanisms. *J. Mol. Endocrinol.* 31.:359-372.
34. **Jiao H, Cui XL, Torti M, et al.** 1998 Arachidonic acid mediates angiotensin II effects on p21ras in renal proximal tubular cells via the tyrosine kinase-Shc-Grb2-Sos pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7417-21.
35. **Croft KD, McGiff JC, Sanchez-Mendoza A, Carroll MA** 2000 Angiotensin II releases 20-HETE from rat renal microvessels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F544-51.
36. **Capponi AM, Rossier MF, Davies E, Vallotton MB** 1988 Calcium stimulates steroidogenesis in permeabilized bovine adrenal cortical cells. *J Biol Chem* 263:16113-7.
37. **Capponi A, Lew P, Vallotton M** 1987 Quantitative analysis of the cytosolic free Ca²⁺ dependency of aldosterone production in bovine adrenal glomerulosa cells. *Biochem. J.*, 247:335-340.
38. **Fakunding J, Chow R, Catt K** 1979 The role of calcium in the stimulation of aldosterone production by adrenocorticotropin, angiotensin II, and potassium in isolated glomerulosa cells. *Endocrinology*, 105:327-333.
39. **Spat A, Enyedi P, Hajnoczky G, Hunyady L** 1991 Generation and role of calcium signal in adrenal glomerulosa cells. *Exp Physiol* 76:859-85.
40. **Durroux T, Gallo-Payet N, Payet M** 1988 Three components of the calcium current in cultured glomerulosa cells from rat adrenal gland. *J. Physiol., London*, 404:713-729.
41. **Aguilera G, Catt KJ** 1986 Participation of voltage-dependent calcium channels in the regulation of adrenal glomerulosa function by angiotensin II and potassium. *Endocrinology* 118:112-118.
42. **Cohen C, McCarthy R, Barrett P, Rasmussen H** 1988 Ca²⁺ channels in adrenal glomerulosa cells: K⁺ and angiotensin II increase T-type Ca²⁺ channel current. *Proc. Natl Acad Sci USA* 85:2412-2416.

43. **Kojima I, Kojima K, Rasmussen H** 1985 Characteristics of angiotensin II-, K⁺- and ACTH-induced calcium influx in adrenal glomerulosa cells. *J. of Biol. Chem* 260:9171-9176.
44. **Burnay MM, Python COP, Valloton MB, Capponi AM, Rossier MF** 1994 Role of the capacitative calcium influx in the activation of steroidogenesis by angiotensin-II in adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 135:751-758.
45. **Rohacs T, Bago A, Deak F, Hunyady L, Spat A** 1994 Capacitative Ca²⁺ influx in adrenal glomerulosa cells: possible role in angiotensin II response. *Am J Physiol* 267:C1246-52.
46. **Spat A, Rohacs T, Hunyady L** 1994 Plasmalemmal dihydropyridine receptors modify the function of subplasmalemmal inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a hypothesis. *Cell Calcium* 15:431-7.
47. **Hunyady L, Rohacs T, Bago A, Deak F, Spat A** 1994 Dihydropyridine-sensitive initial component of the ANG II-induced Ca²⁺ response in rat adrenal glomerulosa cells. *Am J Physiol* 266:C67-72.
48. **Campbell S, Otis M, Cote M, Gallo-Payet N, Payet MD** 2003 Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: a role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium. *Endocrinology* 144:1486-95.
49. **Clapham DE** 2003 TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-24.
50. **Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V, et al.** 2002 A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels. *Mol Cell* 9:229-31.
51. **Basora N, Boulay G, Bilodeau L, Rousseau E, Payet MD** 2003 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. *J Biol Chem* 278:31709-16.
52. **Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G** 1999 Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* 397:259-63.
53. **Okada T, Inoue R, Yamazaki K, et al.** 1999 Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca²⁺-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. *J Biol Chem* 274:27359-70.
54. **Yao Y, Ferrer-Montiel AV, Montal M, Tsien RY** 1999 Activation of store-operated Ca²⁺ current in *Xenopus* oocytes requires SNAP-25 but not a diffusible messenger. *Cell* 98:475-85.

55. **Cayouette S, Lussier MP, Mathieu EL, Bousquet SM, Boulay G** 2004 Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* 279:7241-6.
56. **Bezzerrides VJ, Ramsey IS, Kotecha S, Greka A, Clapham DE** 2004 Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 6:709-20.
57. **Mizuno N, Kitayama S, Saishin Y, et al.** 1999 Molecular cloning and characterization of rat trp homologues from brain. *Brain Res Mol Brain Res* 64:41-51.
58. **Garcia RL, Schilling WP** 1997 Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 239:279-83.
59. **Philipp S, Trost C, Warnat J, et al.** 2000 TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca²⁺-like channels in adrenal cells. *J Biol Chem* 275:23965-72.
60. **Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT** 2004 Capacitative calcium entry and TRPC channel proteins are expressed in rat distal pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286:L848-58.
61. **Cai S, Fatherazi S, Presland RB, Belton CM, Izutsu KT** 2005 TRPC channel expression during calcium-induced differentiation of human gingival keratinocytes. *J Dermatol Sci* 40:21-8.
62. **Dalrymple A, Slater DM, Beech D, Poston L, Tribe RM** 2002 Molecular identification and localization of Trp homologues, putative calcium channels, in pregnant human uterus. *Mol Hum Reprod* 8:946-51.
63. **Tesfai Y, Brereton HM, Barritt GJ** 2001 A diacylglycerol-activated Ca²⁺ channel in PC12 cells (an adrenal chromaffin cell line) correlates with expression of the TRP-6 (transient receptor potential) protein. *Biochem J* 358:717-26.
64. **Spat A, Hunyady L** 2004 Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. *Physiol Rev* 84:489-539.
65. **Lotshaw DP** 2001 Role of membrane depolarization and T-type Ca²⁺ channels in angiotensin II and K⁺ stimulated aldosterone secretion. *Mol Cell Endocrinol* 175:157-71.
66. **Chen XL, Bayliss DA, Fern RJ, Barrett PQ** 1999 A role for T-type Ca²⁺ channels in the synergistic control of aldosterone production by ANG II and K⁺. *Am J Physiol* 276:F674-83.
67. **Ambroz C, Catt KJ** 1992 Angiotensin II receptor-mediated calcium influx in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* 131:408-14.

68. **Balla T, Hollo Z, Varnai P, Spat A** 1991 Angiotensin II inhibits K(+)-induced Ca²⁺ signal generation in rat adrenal glomerulosa cells. *Biochem J* 273(Pt 2):399-404.
69. **Putney JW, Jr.** 1986 A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7:1-12.
70. **Hajnoczky G, Varnai P, Hollo Z, et al.** 1991 Thapsigargin-induced increase in cytoplasmic Ca²⁺ concentration and aldosterone production in rat adrenal glomerulosa cells: interaction with potassium and angiotensin-II. *Endocrinology* 128:2639-44.
71. **Hoth M, Penner R** 1992 Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355:353-6.
72. **Putney JW, Jr., Broad LM, Braun FJ, Lievreumont JP, Bird GS** 2001 Mechanisms of capacitative calcium entry. *J Cell Sci* 114:2223-9.
73. **Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL** 2000 Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Science* 287:1647-1651.
74. **Grimaldi M, Maratos M, Verma A** 2003 Transient receptor potential channel activation causes a novel form of [Ca²⁺]_i oscillations and is not involved in capacitative Ca²⁺ entry in glial cells. *J Neurosci* 23:4737-45.
75. **Zitt C, Halaszovich CR, Luckhoff A** 2002 The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. *Prog Neurobiol* 66:243-64.
76. **Clapham DE, Runnels LW, Strubing C** 2001 The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci* 2:387-96.
77. **Minke B, Cook B** 2002 TRP channel proteins and signal transduction. *Physiol Rev* 82:429-72.
78. **Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V** 2002 The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108:595-8.
79. **Thebault S, Zholos A, Enfissi A, et al.** 2005 Receptor-operated Ca²⁺ entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line. *J Cell Physiol* 204:320-8.
80. **Davis MJ, Wu X, Nurkiewicz TR, et al.** 2002 Regulation of ion channels by integrins. *Cell Biochem Biophys* 36:41-66.
81. **Bhattacharya S, Ying X, Fu C, et al.** 2000 alpha(v)beta(3) integrin induces tyrosine phosphorylation-dependent Ca²⁺ influx in pulmonary endothelial cells. *Circ Res* 86:456-62.

82. **Waitkus-Edwards KR, Martinez-Lemus LA, Wu X, et al.** 2002 $\alpha(4)\beta(1)$ Integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction. *Circ Res* 90:473-80.
83. **Wu X, Davis GE, Meininger GA, Wilson E, Davis MJ** 2001 Regulation of the L-type calcium channel by $\alpha 5\beta 1$ integrin requires signaling between focal adhesion proteins. *J Biol Chem* 276:30285-92.
84. **Wu X, Mogford JE, Platts SH, Davis GE, Meininger GA, Davis MJ** 1998 Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by $\alpha\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ integrin ligands. *J Cell Biol* 143:241-52.
85. **Wenzel-Seifert K, Krautwurst D, Musgrave I, Seifert R** 1996 Thapsigargin activates univalent- and bivalent-cation entry in human neutrophils by a SK&F I3 96365- and Gd^{3+} -sensitive pathway and is a partial secretagogue: involvement of pertussis-toxin-sensitive G-proteins and protein phosphatases 1/2A and 2B in the signal-transduction pathway. *Biochem J* 314 (Pt 2):679-86.
86. **Wang JP** 2003 Characterization of maleimide-activated Ca^{2+} entry in neutrophils. *Biochem Pharmacol* 65:1923-9.
87. **Wang JP, Tseng CS, Sun SP, Chen YS, Tsai CR, Hsu MF** 2005 Capsaicin stimulates the non-store-operated Ca^{2+} entry but inhibits the store-operated Ca^{2+} entry in neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol* 209:134-44.
88. **Boulay G, Brown DM, Qin N, et al.** 1999 Modulation of Ca^{2+} entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5- trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca^{2+} entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14955-60.
89. **Kiselyov K, Mignery GA, Zhu MX, Muallem S** 1999 The N-terminal domain of the IP3 receptor gates store-operated hTrp3 channels. *Mol Cell* 4:423-9.
90. **Venkatachalam K, Ma HT, Ford DL, Gill DL** 2001 Expression of functional receptor-coupled TRPC3 channels in DT40 triple receptor InsP3 knockout cells. *J Biol Chem* 276:33980-5.
91. **Lintschinger B, Balzer-Geldsetzer M, Baskaran T, et al.** 2000 Coassembly of Trp1 and Trp3 proteins generates diacylglycerol- and Ca^{2+} -sensitive cation channels. *J Biol Chem* 275:27799-805.
92. **Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, et al.** 2004 Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca^{2+} channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 95:496-505.
93. **He LP, Hewavitharana T, Soboloff J, Spassova MA, Gill DL** 2005 A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2. *J Biol Chem* 280:10997-1006.

94. **Itagaki K, Kannan KB, Livingston DH, Deitch EA, Fekete Z, Hauser CJ** 2002 Store-operated calcium entry in human neutrophils reflects multiple contributions from independently regulated pathways. *J Immunol* 168:4063-9.
95. **Xu XZ, Sternberg PW** 2003 A *C. elegans* sperm TRP protein required for sperm-egg interactions during fertilization. *Cell* 114:285-97.
96. **Gallo-Payet N, Payet MD** 1989 Excitation-secretion coupling: involvement of potassium channels in ACTH-stimulated rat adrenocortical cells. *J Endocrinol* 120:409-421.
97. **Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY** 1985 A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440-50.

Figure 1

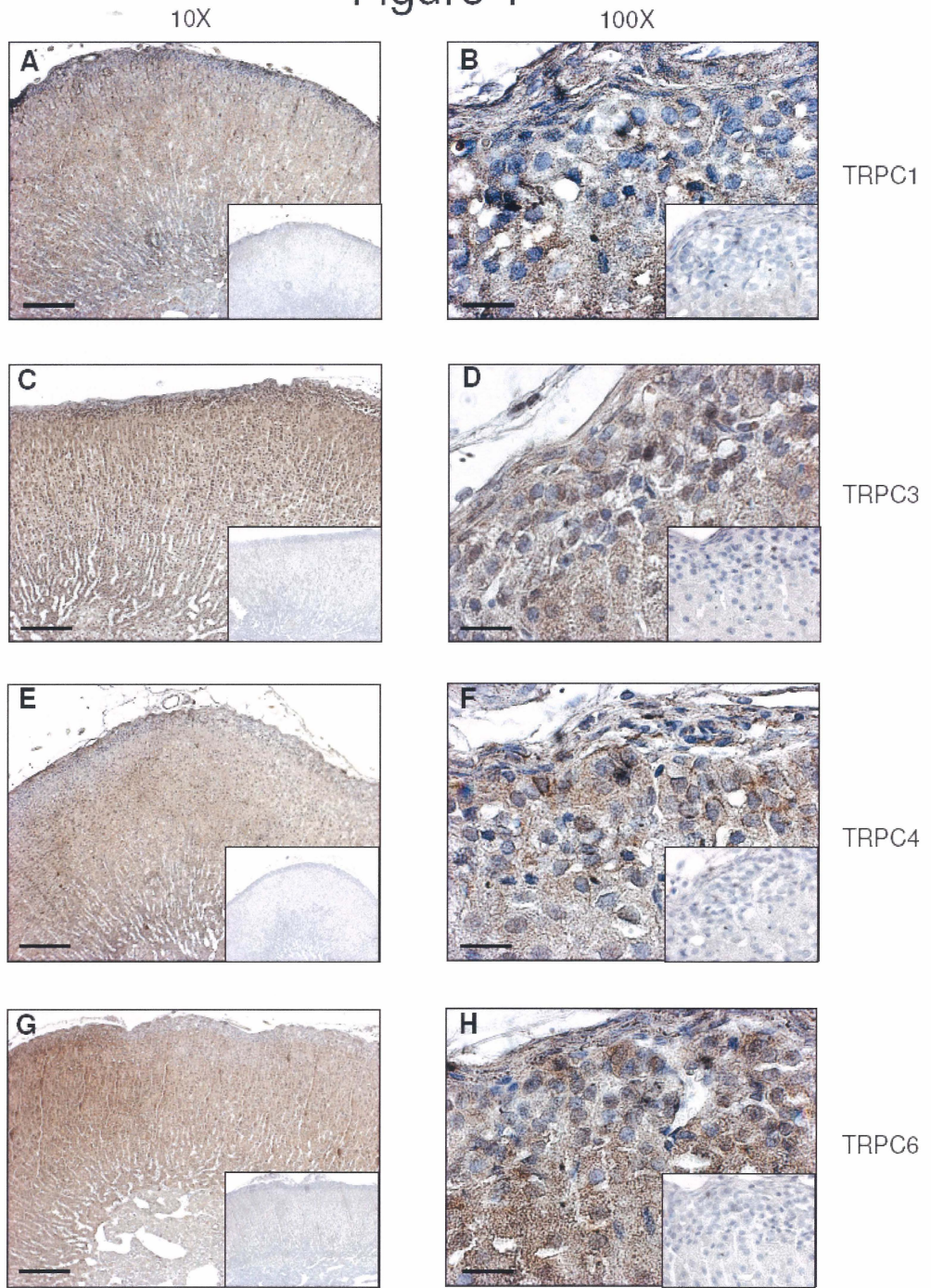


Figure 2

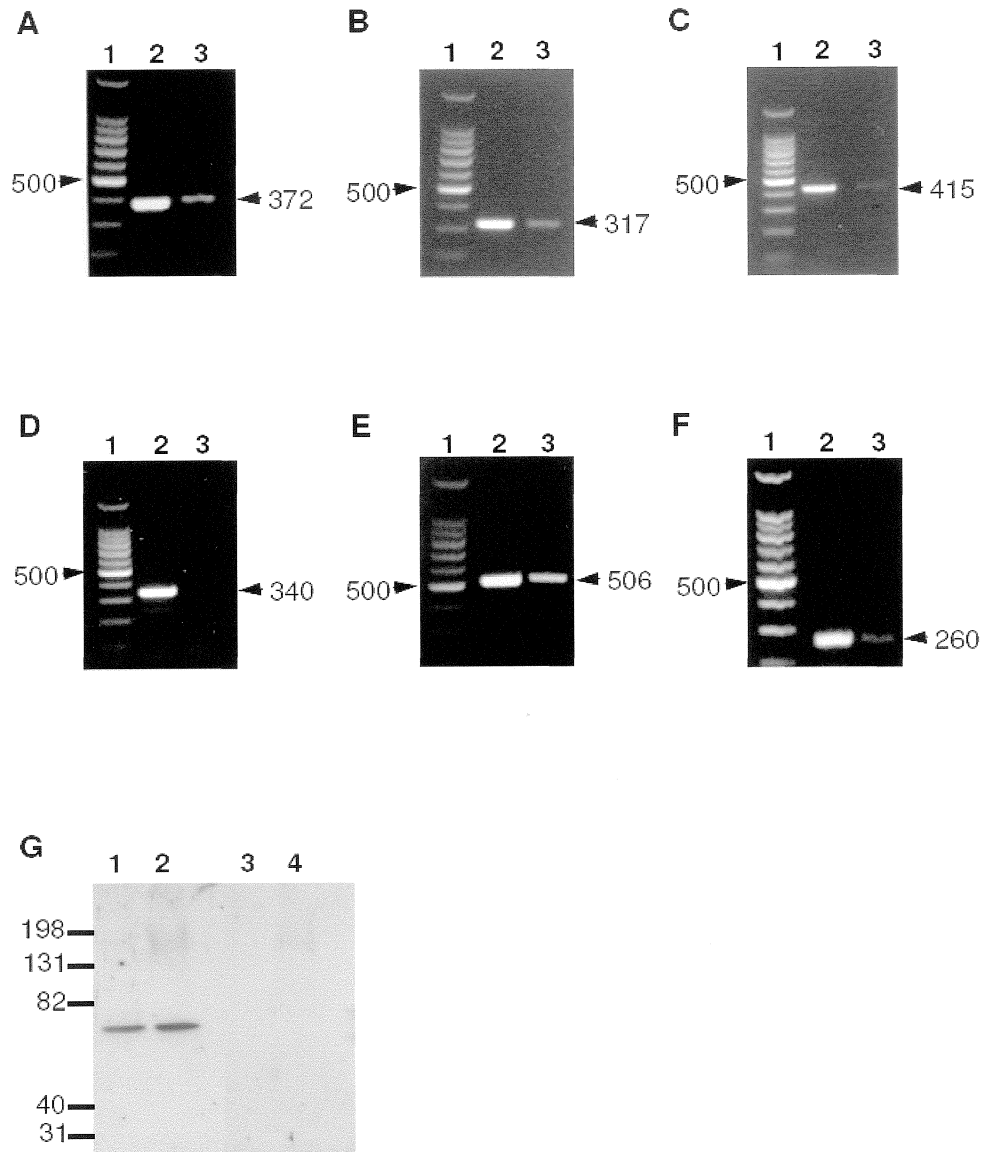


Figure 3

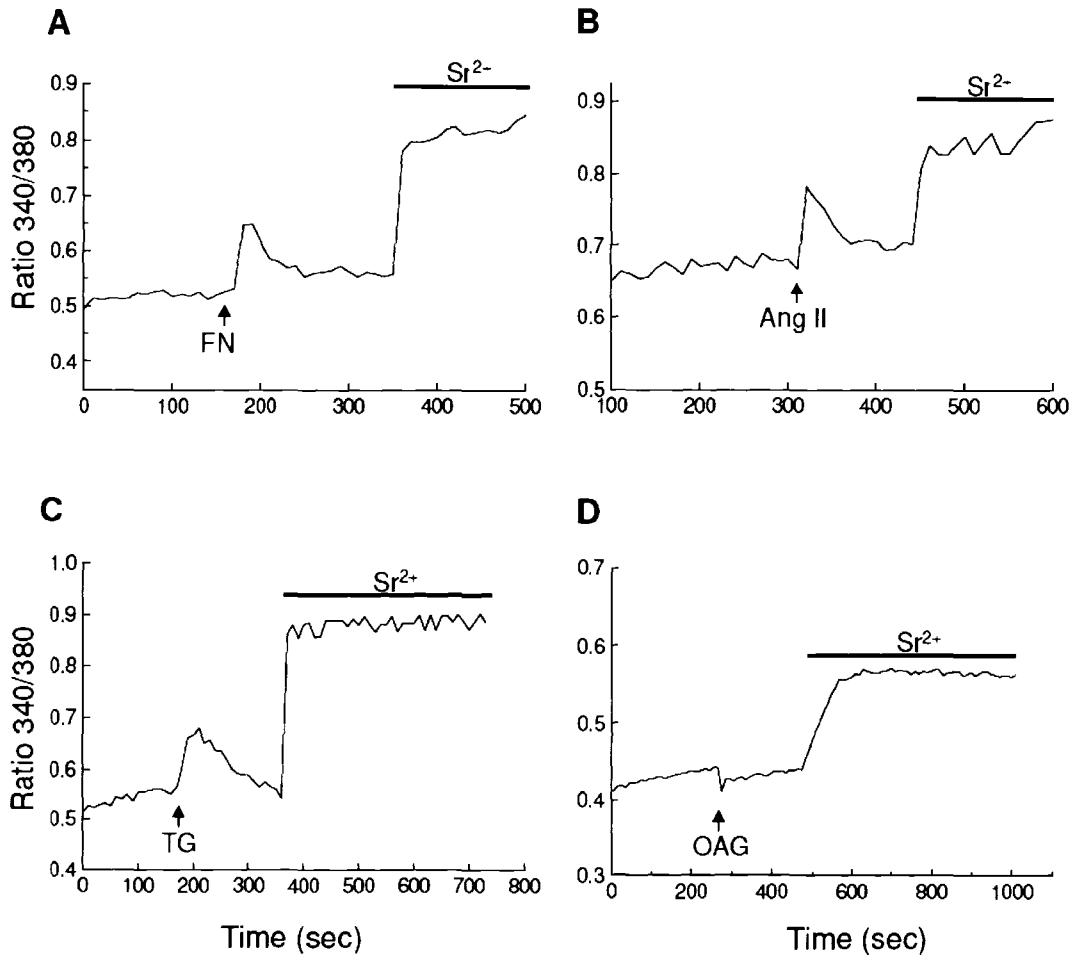


Figure 4

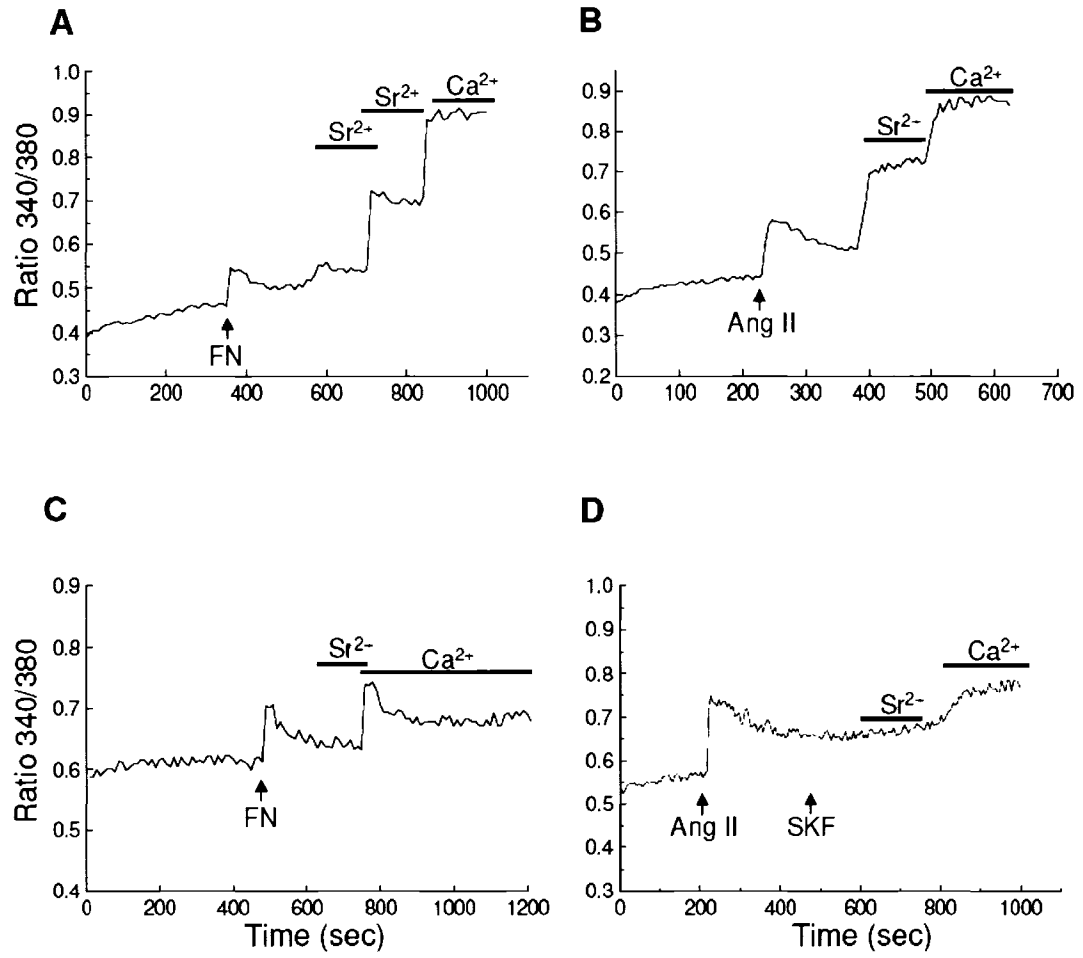


Figure 5

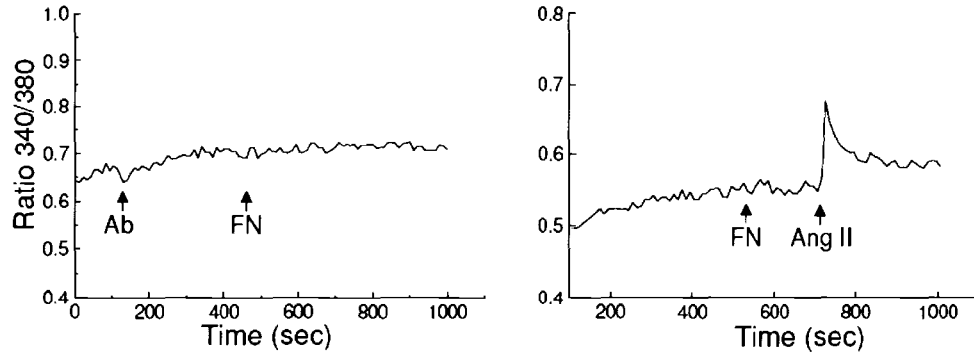
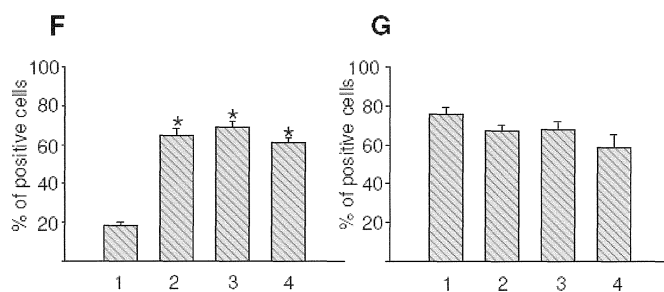
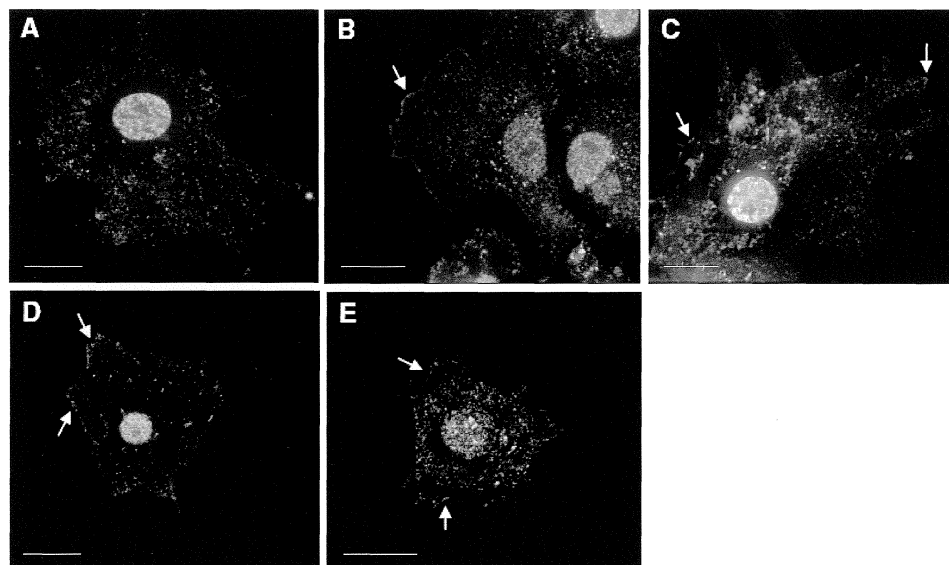


Figure 6



4.4. AUTRES RÉSULTATS (2)

4.4.1 Stimulation de la sécrétion d'aldostérone par l'OAG (1-oleoyl-2-acétylglycérol)

L'ACTH est le stimulus majeur de la sécrétion d'aldostérone *in vitro*. Afin de vérifier le rôle possible des canaux TRPC3/6/7 sur la sécrétion d'aldostérone, nous avons mesuré sa sécrétion suite à une stimulation avec de l'OAG (100 μ M). La figure 25 montre que l'OAG stimule modérément, mais de façon significative (44,7 pg/ml/300 000 cellules) la sécrétion d'aldostérone des cellules glomérulées comparativement aux cellules témoins (31,9 pg/ml/300 000 cellules).

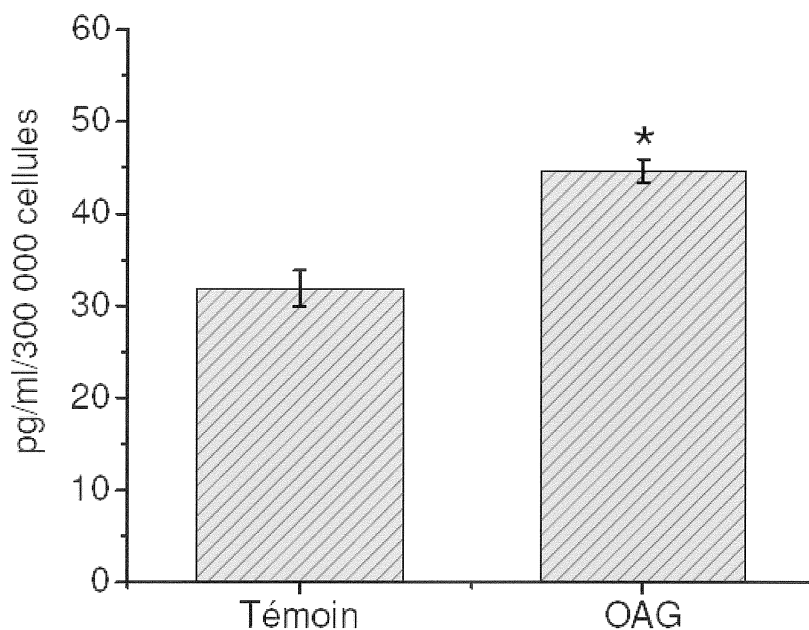


Figure 25. Sécrétion d'aldostérone par les cellules glomérulées. L'OAG provoquent une augmentation de la sécrétion d'aldostérone. Statistique: *, $P < 0.05$.

4.4.2. Expression de canaux potassiques par les cellules glomérulées

Les intégrines peuvent participer à l'activation de plusieurs canaux ioniques et *vice versa* (pour revue, voir (Davis et al. 2002)). Nous avons vérifié l'expression du canal potassique BKCa (Large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel) dans la glande surrénale de rat adulte. La figure 26 montre la présence du BKCa dans les zones externes du cortex surrénalien (flèches noires, Figure 26A).

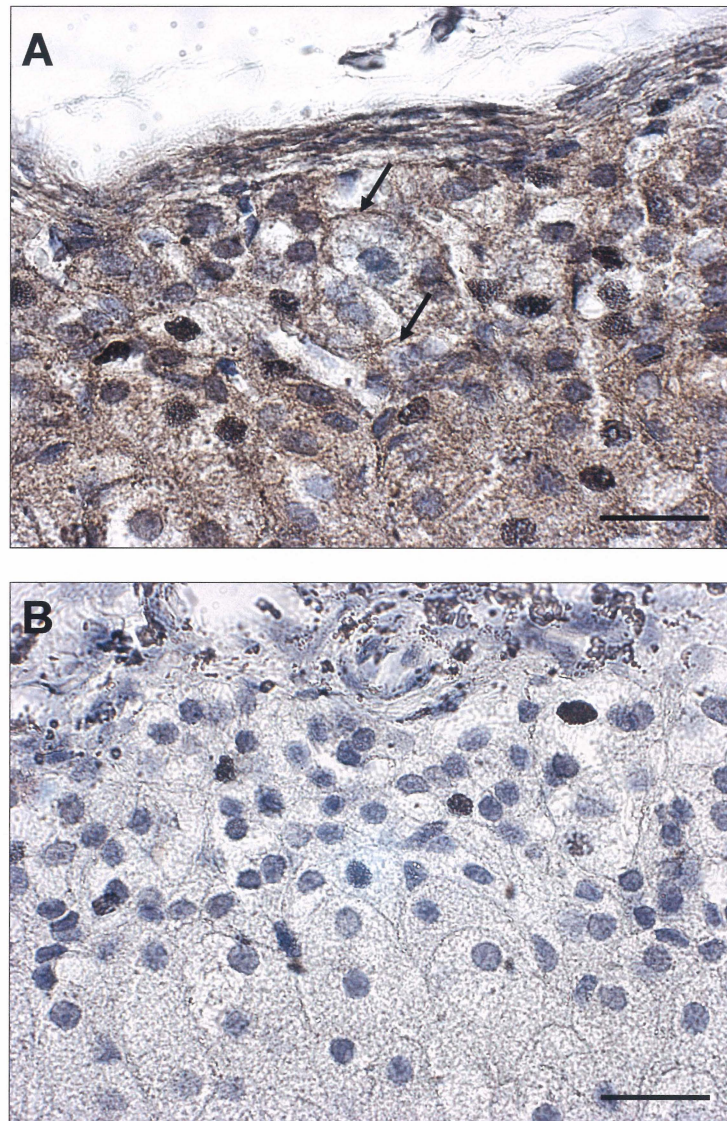


Figure 26. Expression du canal potassique BKCa dans la glande surrénale de rat adulte. Des coupes paraffine (5 μm) fixées au formol ont été utilisées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes. A, Zones externes du cortex surrénalien; B. Marquage non-spécifique. Barre = 20 μm .

Des analyses de micropuces d'ADN effectuées dans le laboratoire du Dr. Nicole Gallo-Payet ont révélé qu'un traitement à l'ACTH augmentait l'expression du canal Kv10.1 dans les cellules glomérulées et fasciculées de glande surrénale rat adulte (résultats non montrés). Nous avons vérifié la présence du canal Kv10.1 par immunocytochimie sur cellules fixées. Le canal Kv10.1 est présent dans le cytoplasme des cellules glomérulées mise en culture sur plastique (Figure 27A). La localisation semble être au niveau de l'appareil de Golgi, mais la localisation exacte reste à vérifier. Un traitement de 2 jours à l'ACTH provoque une translocation du canal à la membrane (Figure 28C). Les cellules mises en culture sur une matrice de FN montrent une localisation différente du Kv10.1. Le canal semble être séquestré au niveau de vésicules intracellulaires qui n'ont pas encore été identifiées (Figure 28B). Bien que ces résultats soient surprenants, ils demeurent préliminaires.

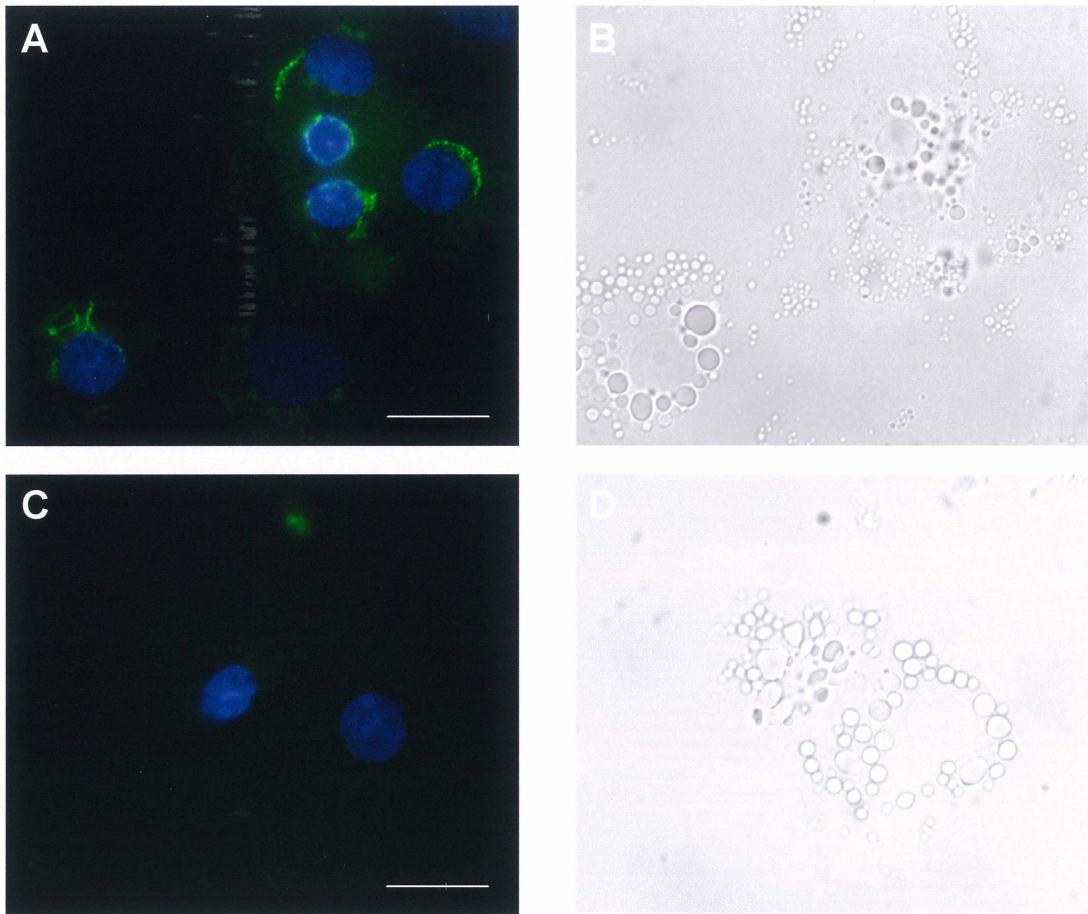


Figure 27. Expression du canal ether-a-gogo (Kv10.1) chez les cellules glomérulées.
A) Anti-Kv10.1; B) Image visible de A; C) Marquage non spécifique du Kv10.1; D)
Image visible de C. Barre = 10 μ m.

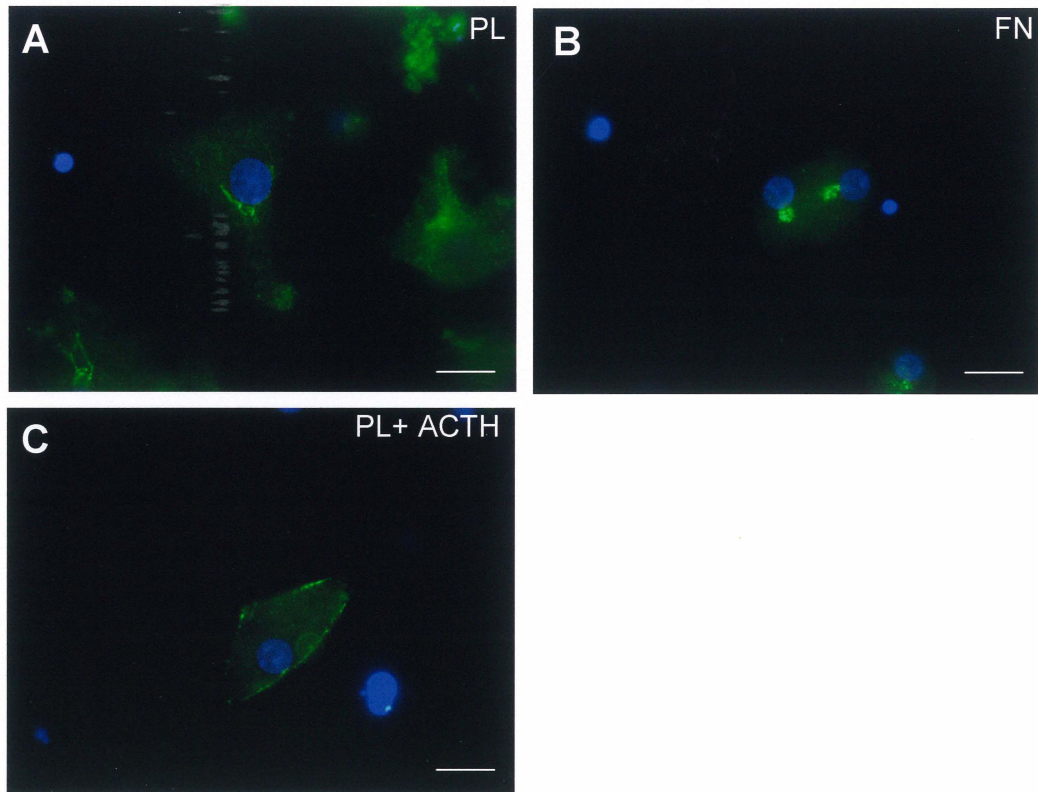


Figure 28. Effet de la matrice de fibronectine et de l'ACTH sur l'expression du canal ether-a-gogo (Kv10.1) chez les cellules glomérulées. A) Anti-Kv10.1 sur plastique; B) Cellules sur FN; C) Cellules sur plastique, traitées à l'ACTH 2 jours. Barre = 10 μ m.

5. DISCUSSION

Dans le présent travail, nous avons montré la présence de composantes de la matrice extracellulaire et des intégrines qui leur sont associées dans la glande surrénale de rat adulte. De plus, nous avons établi un lien entre les composantes de la matrice extracellulaire et la prolifération cellulaire et la sécrétion de stéroïdes (article #1). Nous avons aussi déterminé que les cellules glomérulées produisaient et sécrétaient du Col I, Col IV, de la LN-1 et FN dans leur milieu. De plus, dans le deuxième article présenté dans cette thèse, nous montrons que la FN et l'angiotensine II augmentent le Ca^{2+} intracellulaire en activant des canaux cationiques non-sélectifs de la famille des TRPC3/ 6/7. Finalement, des canaux potassiques Kv10.1 et BKCa sont exprimés par les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat et pourraient jouer un rôle dans la sécrétion d'aldostérone.

5.1. MEC/Intégrines et prolifération cellulaire

Les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte ont la propriété de proliférer lorsque mises en culture. Ainsi, les cellules glomérulées doublent leur nombre après 3 jours. Dans un article précédant, nous avons montré qu'une matrice de FN augmentait le nombre de cellules de plus de deux fois comparativement à un substrat de PLL (Campbell et al. 2003). Dans le premier article présenté dans cette thèse, nous montrons la localisation des différentes composantes de la MEC et de certaines intégrines. Les Col I et Col IV lient tous deux les intégrines $\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$ et $\alpha3\beta1$, toutes exprimées dans les zones glomérulée et fasciculée. L'activation de ces intégrines par les composantes de la MEC pourrait être impliquée dans la prolifération des cellules

glomérulées et fasciculées par le Col I et le Col IV. De plus, l'augmentation de la prolifération par une matrice de FN chez les cellules glomérulées et fasciculées pourrait impliquer l'activation des intégrines $\alpha 5 \beta 1$ de ces cellules. Dans les cellules de glande surrénale fœtale humaine, il a été montré qu'une matrice de FN diminue le nombre de cellules comparativement à un substrat de plastique lorsque les cellules sont stimulées avec l'Ang II ou l'ACTH. D'autre part, une matrice de Col IV augmente la prolifération des cellules stimulées à l'Ang II, l'ACTH ou par une combinaison des deux hormones (Chamoux et al. 2002). La prolifération des cellules de glande surrénale fœtale, avec ou sans stimulation, n'est pas affectée par une matrice de LN. Ces résultats montrent que l'interaction MEC/intégrine peut être impliquée dans la prolifération cellulaire des glandes surrénales fœtales humaines et de rat adulte. Une discussion plus détaillée sur le rôle des intégrines sur la prolifération cellulaire est retrouvée dans l'article #1.

5.2. MEC/Intégrines et sécrétion de stéroïdes

Les composantes de la MEC peuvent être associées à des fonctions cellulaires spécifiques. Par exemple, la LN, synthétisée sous le contrôle de l'ACTH, stimule la chémotaxie et l'haptotaxie des cellules surrénales bovines (Pellerin et al. 1997) et un cocktail de plusieurs composantes de la MEC (Matrigel) potentialise l'expression des enzymes de la stéroïdogénèse induite par des hormones (Cheng et Hornsby 1992). Dans la glande surrénale fœtale humaine, des gradients dans l'expression du Col, LN et FN sont intimement reliés aux fonctions spécifiques de chacune des zones de la glande surrénale (Chamoux et al. 2001). Ainsi, une matrice de LN (protéine exprimée à la périphérie de la glande) augmente la prolifération cellulaire, une matrice de Col (présent

dans toute la glande) favorise la sécrétion de stéroïde et la FN (exprimée dans la portion centrale de la glande) induit l'apoptose (Chamoux et al. 2002) en absence de ses intégrines spécifiques.

Nos résultats montrent que les cellules glomérulées de rat adulte sécrètent le Col I, Col IV, LN-1 et la FN. Ce phénomène physiologique peut être d'une grande importance pour la glande surrénale, car il a été montré dans la glande surrénale fœtale humaine, que plusieurs hormones sont sécrétées de façon différente dépendamment des composantes de la MEC sur laquelle les cellules sont placées (Chamoux et al. 2002). Dans le premier article, nous avons de plus montré que la sécrétion d'aldostérone et de corticostérone est modifiée selon la matrice sur laquelle les cellules glomérulées et fasciculées sont cultivées (Col I, Col IV, LN-1 ou FN). Nos résultats révèlent que le Col et la LN ont des effets différents sur la sécrétion de stéroïdes sont semblables à d'autres études (Aten et al. 1995; Huet et al. 2001; Diaz et al. 2002). Les rôles de chacune des composantes de la MEC et des intégrines qui leur sont associées ont été discutés dans la section *Discussion* de l'article #1.

5.3. Production de composantes de la MEC

Plusieurs types cellulaires produisent et sécrètent des composantes de la matrice extracellulaire dans leur environnement immédiat. À titre d'exemple, les lipocytes du foie sécrètent des Cols (Friedman et al. 1985) et les cellules épithéliales d'oeil de poulet sécrètent de la FN (Richiert et Ireland 1999). Nos résultats d'immunobuvardage de type Western montrent que les cellules glomérulées sécrètent du Col I, Col IV, LN-I et FN dans leur environnement extracellulaire. Peu d'études ont rapporté la sécrétion de Col I

par immunobuvardage, il est donc difficile de comparer nos résultats à d'autres études. Dans nos résultats, des bandes à environ 75 kDa sont observables pour le Col I. Ces bandes représentent probablement des produits de dégradation des chaînes complètes, comme décrit par Rautavuoma et al. pour le Col IV (Rautavuoma et al. 2004). La figure 21 révèle une bande à environ 185 kDa par l'anticorps anti-Col IV. Des résultats différents sont retrouvés pour d'autres types cellulaires. Yang et al. ont observé une bande à 150 kDa dans les cellules HIO-80 (cellules épithéliales humaines immortalisées d'ovaires) (Yang et al. 2004) et une bande à 207 kDa a aussi été rapportée (Claveau et al. 2004). Nos résultats sont toutefois similaires à ceux rapportés par Rautavuoma et al. où des bandes à 185 kDa ont été observées pour des extractions d'embryons de souris (Rautavuoma et al. 2004). Toutes les isoformes de LN sont formées de trois chaînes distinctes: α , β , γ . La chaîne α , la plus lourde fait environ 400 kDa. Les chaînes β et γ font environ 200 kDa chacune (Tunggal et al. 2000). Les résultats d'immunobuvardage montrent une bande à 200 kDa reconnue par l'anticorps anti-LN-1 (Figure 21). Des groupes ayant utilisé le même anticorps ont observé des résultats semblables (Tiger et al. 1997; Indyk et al. 2003). La FN est composée de deux chaînes peptidiques d'environ 250 kDa chacune. Ces deux chaînes sont reliées par un pont-disulfure. Lors de l'extraction protéique précédant l'électrophorèse, le lien disulfure est rompu et une bande à 250 kDa, telle que prédite, a été obtenue (Figure 21). Tout comme les autres composantes de la MEC discutées précédemment, la FN peut subir de la protéolyse formant différents fragments protéiques. Ainsi, des expériences effectuées à l'aide d'un anticorps anti-FN différent (CP70) ont révélé une bande à environ 125 kDa pour la FN produite par les cellules glomérulées. En plus de fragments issus de la protéolyse (Wikner et Clark 1988), l'épissage alternatif peut mener à des formes différentes de FN (Kornblihtt et al. 1996). Finalement, les protéines de la MEC décrites plus haut peuvent

subir des modifications post-transcriptionnelles, en particulier la glycosylation, ce qui pourrait affecter les poids moléculaires observés (Skorstengaard et al. 1984; Sticht et al. 1998).

Peu de chose est connu quant aux types cellulaires produisant les composantes de la MEC dans la glande surrénale et aux molécules qui en contrôlent l'expression. Les cellules de la zone fasciculata-reticularis de bovin, en culture primaire, produisent et sécrètent de la LN (Pellerin et al. 1997). De plus, ces cellules peuvent aussi produire de la TSP1 et CISP/TSP2 (thrombospondin-2 (corticotrophin-induced secreted protein (CISP)) en réponse à l'ACTH et au TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) (Negoescu et al. 1995; Lafeuillade et al. 1996). L'expression de composantes de la MEC peut être sous contrôle hormonal et le facteur le plus étudié est l'angiotensine II. Ainsi, l'Ang II provoque un remodelage et une accumulation des protéines de la MEC menant à un épaississement des artères conduisant l'hypertension et à une insuffisance cardiaque. Il a été établi que l'Ang II augmentait les niveaux d'ARNm de la FN dans les fibroblastes cardiaques (Iwami et al. 1996; Moriguchi et al. 1999); pour revue, voir (Lijnen et Petrov 2003). Il a aussi été prouvé que le « transforming growth factor-1 » (TGF-1) stimulait la production de FN par les cellules adrénocorticales bovines en culture (Shi et al. 1990; Williams et Allen-Hoffmann 1990). Nos résultats préliminaires ne montrent aucun effet de l'Ang II et de l'ACTH sur la production de FN par les cellules glomérulées. Ces résultats sont en accord avec ceux de Feige et al. 1998 ne montrant aucun effet de l'Ang II et de l'ACTH sur la sécrétion de FN par les cellules fasciculées bovines (Feige et al. 1998). L'effet de ces hormones sur la sécrétion de LN par les cellules glomérulées n'a pas été étudié et donc aucune comparaison ne peut être réalisée avec les travaux de Pellerin et al. montrant que l'ACTH augmentait la synthèse de LN par les cellules adrénocorticales bovines (Pellerin et al. 1997). Bien que certaines études montrent une

augmentation de l'expression des gènes de Cols par l'Ang II (Bolick et al. 2003) et l'ACTH (Evans et al. 2004), l'effet de l'Ang II et de l'ACTH n'a pas été évalué sur la production de Col I et Col IV par les cellules glomérulées et des expériences futures seront nécessaires afin de vérifier le rôle de ces hormones sur la production de ces composantes de la MEC.

Comme décrit dans la section *Introduction*, la FN est sécrétée sous une forme soluble et les intégrines participent à son incorporation dans la MEC sous une forme insoluble. Les intégrines $\alpha 5\beta 1$ semblent avoir un rôle majeur dans ce processus (Roman et al. 1989; Fogerty et al. 1990). Nous avons donc voulu vérifier si le blocage des intégrines $\alpha 5\beta 1$ par un anticorps anti- $\alpha 5\beta 1$ bloquant la fonction de cette intégrine aurait un effet sur l'arrangement de la FN par les cellules glomérulées. Après trois jours de traitement avec l'anticorps bloqueur anti- $\alpha 5\beta 1$, de petites fibrilles de FN sont toujours visibles autour des cellules glomérulées. Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Premièrement, comme ces résultats sont préliminaires, il se peut que la concentration d'anticorps bloqueur utilisée ne fût pas assez élevée pour permettre une compétition adéquate avec les molécules de FN et pour permettre de visualiser son effet sur l'arrangement de la FN. Une deuxième hypothèse serait l'implication d'isoformes d'intégrines autres que $\alpha 5\beta 1$ dans l'arrangement de la FN par les cellules glomérulées. Bien que les intégrines $\alpha 5\beta 1$ détiennent un rôle prédominant dans le processus de fibrillogénèse, d'autres isoformes d'intégrines pourraient aussi être impliquées. Les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ peuvent toutes lier la FN (Wayner et al. 1989; Guan et Hynes 1990; Mould et al. 1990; Mould et Humphries 1991; Mould et al. 1991). Dans les cellules glomérulées, nous avons montré la présence des sous-unités $\alpha 3$, $\alpha 8$, αv et $\beta 3$. Certaines d'entre elles lient la région RGD de la FN, tout comme

l'intégrine $\alpha 5\beta 1$. Ainsi, les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha v\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ pourraient être impliquées dans les processus de fibrillogénèse par les cellules glomérulées.

Afin de mettre à jour les voies de signalisation impliquées dans les processus de production de FN, nous avons effectué des expériences préliminaires à l'aide de bloqueurs spécifiques des voies p42/44 *mapk* (PD98059), c-Jun N-terminal kinase (SP600125) et p38 MAPK (SB203580). Aucun des inhibiteurs mentionnés ci-dessus n'ont affecté la sécrétion et/ou l'arrangement de la FN par les cellules glomérulées.

Dans un article paru en 2005, il a été montré que l'expression et la sécrétion de FN par les cellules mésenchymales péritonéales induite par l'Ang II étaient médiées par le récepteur AT₁ de l'Ang II et étaient dépendantes des voies de signalisation p42/44 *mapk* et p38 MAPK, mais non de c-Jun N-terminal kinase (Kiribayashi et al. 2005). Comme les expériences décrites dans cette thèse n'ont été effectuées qu'une seule fois, d'autres expériences seront nécessaires afin de déterminer les protéines impliquées dans la sécrétion de FN par les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat adulte.

5.4. Rôles de l'interaction intégrines-canaux

TRPC 3/6/7

Le deuxième article présenté dans cette thèse indique que l'activation des intégrines par la FN activerait les canaux de la sous-famille TRPC3/6/7. Ces canaux sont des canaux ioniques non-sélectifs. Le rôle physiologique des canaux TRPC et TRP en général est peu connu. Certaines études montrent que ces canaux pourraient être impliqués dans la sécrétion d'insuline (Qian et al. 2002; Akiba et al. 2004). Les canaux TRPC6 auraient un rôle dans le contrôle du tonus des cellules musculaires vasculaires (Dietrich et al. 2005). Comme mentionné dans l'article #2, les TRPC ont été classés comme étant des

SOC, mais aussi des non-SOC. Le rôle des ces canaux dans l'entrée de calcium dans les cellules est donc probable. Dans les cellules glomérulées, il a été montré que le calcium intracellulaire participait à la sécrétion d'aldostérone. Comme les TRPC3/6/7 sont activés par les analogues du DAG (OAG), et que la stimulation des cellules glomérulées par l'OAG provoque une augmentation de la sécrétion d'aldostérone, nous posons l'hypothèse que l'activation des canaux TRPC3/6/7 dans les cellules glomérulées participerait à la production et sécrétion d'aldostérone. Comme ces canaux sont activés par la stimulation des cellules avec de la FN soluble, l'augmentation de la sécrétion d'aldostérone par une matrice de FN pourrait être due, en partie, à l'activation des canaux TRPC3/6/7 induits par l'activation des intégrines à la membrane plasmique. Les hypothèses de l'activation des canaux TRPC/6/7 sont décrites plus en détail dans la section *Discussion* de l'article #2.

Canaux potassiques

Les intégrines peuvent activer plusieurs canaux ioniques; certains canaux ioniques ont aussi des effets sur l'activation d'intégrines (pour revue, voir (Davis et al. 2002)). Dans une expérience d'immunohistochimie, nous avons montré que les canaux BKCa (Large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel) étaient exprimés dans les cellules de la zone glomérulée. Le canal BKCa aussi nommé Calcium-activated potassium channel, subfamily M, alpha subunit1, Maxi K^+ et KCNMA1, est activé à la fois par une dépolarisation membranaire et par une augmentation de Ca^{2+} cytosolique, ce qui induit une sortie de K^+ . Ces canaux contribuent à la repolarisation membranaire. Dans les cellules de muscle lisse, l'activation des BKCa par une augmentation de Ca^{2+} induite par les récepteurs à la ryanodine du réticulum endoplasmique, régule le potentiel membranaire (Milesi et al. 1999). Les canaux BKCa seraient aussi, en partie, responsables des voies de signalisation des cellules cochléaires (« cochlear inner hair

cells ») (Ruttiger et al. 2004). Des travaux précédents de notre laboratoire ont montré que les canaux BKCa étaient impliqués dans le contrôle de la sécrétion d'aldostérone (Payet et al. 1995). En effet, dans cette étude, il a été montré que l'Ang II bloquait le courant potassique activé par le Ca^{2+} (Ca^{2+} -activated K^+ current), ce qui pourrait résulter en un effet synergique d'une dépolarisation induite par l'Ang II, favorisant l'entrée de Ca^{2+} , celui-ci étant essentiel à la sécrétion d'aldostérone (Payet et al. 1995).

Le canal Kv10.1, aussi appelé ether-a-gogo, ERG ou EAG, est un canal de la famille des canaux potassique voltage-dépendants à 6 domaines transmembranaires et il est exprimé principalement dans le cerveau et les myoblastes (Occhiodoro et al. 1998; Pardo et al. 1999). Deux isoformes ont été clonés chez l'humain, le rat et le bovin : EAG1 et EAG2. Il a été établi que le canal Kv10.1 est associé à la prolifération de cellules cancéreuses (Pardo et al. 1999; Farias et al. 2004). De plus, une association a été décrite entre la sous-unité $\beta 1$ des intégrines et le Kv10.1 dans une lignée de cellules neuroblastomes humains (Cherubini et al. 2005). Des expériences préliminaires d'immunofluorescence indirecte montrent que les cellules glomérulées expriment le canal Kv10.1. Nos résultats montrent une localisation intracellulaire du canal lorsque les cellules sont cultivées sur plastique. Cette localisation semble être restreinte à l'appareil de Golgi ou au réticulum endoplasmique (RE), mais cette hypothèse n'a pas encore été vérifiée. Sur une matrice de FN, sans stimulation, le marquage du canal Kv10.1 est réduit à un amas à l'intérieur des cellules. Suite à un traitement à l'ACTH (cellules sur plastique), le canal localisé dans l'appareil de Golgi ou RE semble transloquer à la membrane plasmique. Trois hypothèses sont possibles pour expliquer le phénomène de translocation (Figure 29). Premièrement, l'ACTH pourrait induire l'expression du gène du Kv10.1 augmentant ainsi le nombre de canaux qui pourraient se retrouver à la membrane plasmique. Cette hypothèse est supportée par des expériences de micropuces

d'ADN montrant une augmentation du gène Kv10.1 dans les cellules glomérulées et fasciculées stimulées à l'ACTH. Plusieurs centaines de gènes sont affectés par un traitement à l'ACTH chez les cellules Y1 (Schimmer et al. 2006). Dans les cellules fasciculées de bovin, l'ACTH induit l'expression de l'ARNm du canal TREK-1 (Enyeart et al. 2003). Une deuxième hypothèse pourrait expliquer le phénomène à plus court terme. Comme il a été montré que la stimulation des cellules glomérulées à l'ACTH pouvait activer certains canaux calciques de la membrane plasmique par leur phosphorylation par la PKA (pour revue, voir (Gallo-Payet et Payet 2003)), il se pourrait que l'influx de calcium exerce un effet stimulateur sur l'exocytose du canal Kv10.1 vers la membrane plasmique. Finalement, il a été montré, par microscopie confocale, que lorsque transfectées dans des cellules Lkt- (cellules fibroblast-like de souris), le canal Kv10.1 n'est pas exprimé à la membrane plasmique et est localisé au RE (Ottschytsch et al. 2002). Pour être exprimé à la membrane plasmique, le Kv10.1 doit hétérotétramériser avec le canal Kv2.1 (Ottschytsch et al. 2002). Malheureusement, le Kv2.1 n'était pas présent sur les Chip d'ADN utilisées, nous ne pouvons donc pas savoir si l'expression de ce canal est modifiée par un traitement des cellules glomérulées avec de l'ACTH. Nous pouvons toutefois poser l'hypothèse qu'une stimulation à l'ACTH augmenterait l'expression des canaux Kv10.1 et Kv2.1, ce qui permet la translocation de Kv10.1 à la membrane plasmique des cellules glomérulées suite à un traitement à l'ACTH. Nous pouvons aussi supposer qu'une matrice de FN à elle seule, sans stimulation, n'est peut-être pas suffisante pour augmenter l'expression de Kv2.1 et permettre la translocation de Kv10.1 à la membrane. Cependant d'autres protéines pourraient aussi intervenir dans le processus de translocation. Il a été montré que la calnexine, une protéine chaperonne du RE, était impliquée dans la rétention du hERG dans le RE (Gong et al. 2006). De plus, Ficker et al. ont montré que les

chaperonnes hsp70 et hsp 90 sont impliquées dans la maturation et le transport de hERG (Ficker et al. 2005).

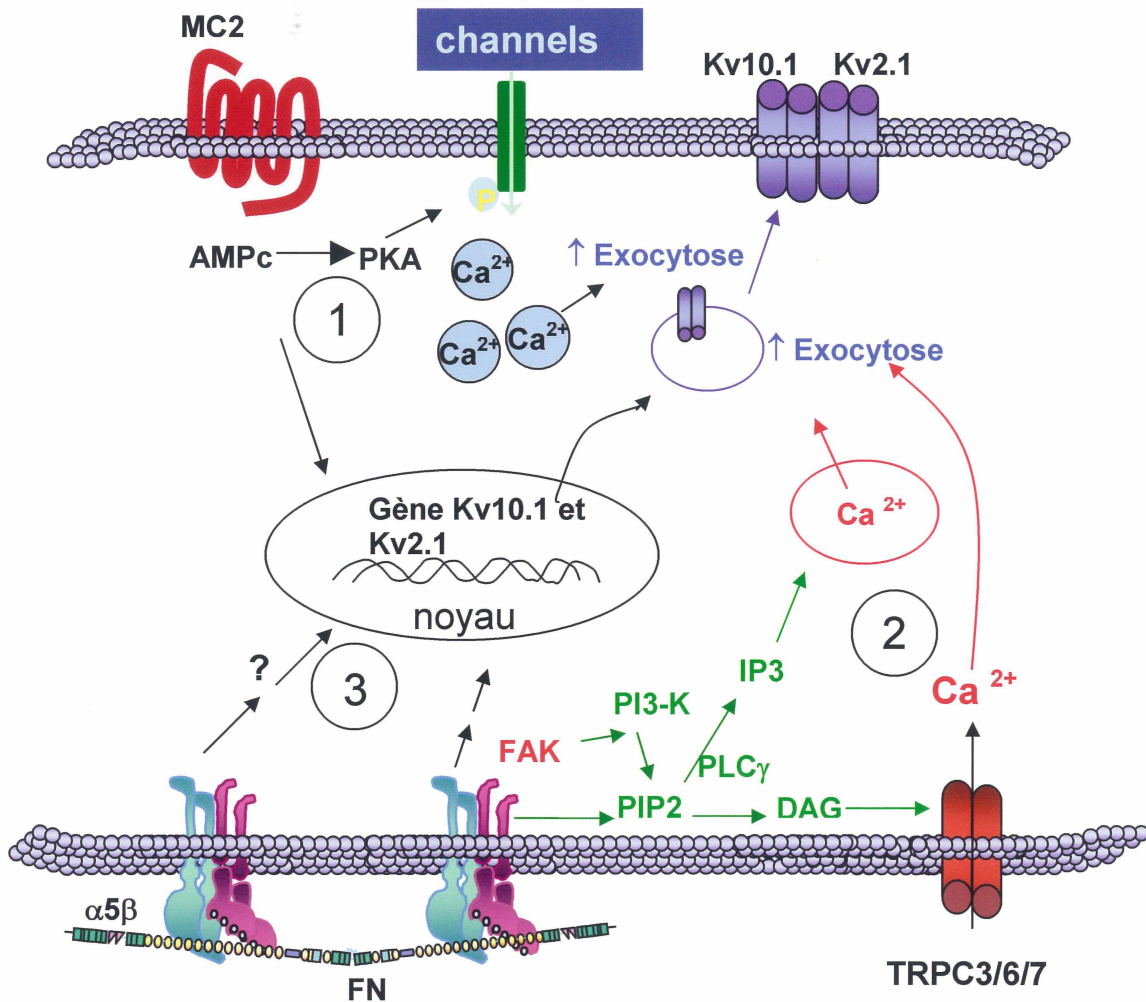


Figure 29. Hypothèse sur la régulation de la localisation du canal ether-a-gogo par l'ACTH et la fibronectine. L'activation du récepteur MC2 par l'ACTH pourrait provoquer l'exocytose des canaux Kv10.1 à la membrane plasmique en activant des canaux calciques de la membrane plasmique ou par l'expression des gènes des Kv10.1 et Kv2.1 (1). L'activation des intégrines pourrait induire l'exocytose du Kv10.1 en provoquant une entrée de Ca²⁺ par les canaux TRPC3/6/7 ou par relâche du Ca²⁺ des réserves intracellulaire (2). De plus, une hypothèse serait que l'activation des intégrines pourrait moduler l'expression des gènes codant pour le canal Kv10.1 (3).

6. CONCLUSION

Dans le premier article, nous avons mis en évidence la présence des intégrines $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ dans la glande surrénale de rat adulte. La sous-unité d'intégrine $\alpha 1$ est principalement retrouvée dans la médullosurrénale et les sous-unités $\alpha 2$, $\alpha 3$ et $\alpha 5$ au niveau du cortex surrénalien. L'expression de différentes composantes de la MEC a aussi été étudiée dans la surrénale de rat. Le Col I, Col IV, LN et FN, sont tous retrouvés dans le cortex en fibrilles plus ou moins longues et aussi dans la médullosurrénale autour des amas de cellules chromaffines. Les effets de ces protéines ont été vérifiés sur la prolifération des cellules et sur la sécrétion de stéroïdes. Le Col I, Col IV, LN et FN ont tous la propriété d'augmenter la prolifération à la fois des cellules glomérulées et cellules fasciculées en culture. Toutefois, ces matrices ont différents effets sur la sécrétion de stéroïdes. Une matrice de Col I, Col IV et FN augmentent la sécrétion d'aldostérone par les cellules glomérulées tandis qu'une matrice de LN la diminue. Le Col I et le Col IV augmente la sécrétion de corticostéroïdes par les cellules fasciculées en culture, alors que la LN la diminue et que la FN ne provoque aucun changement dans la sécrétion de ce stéroïde.

Dans le deuxième article, nous avons montré que la stimulation des cellules glomérulées de la glande surrénale de rat par la FN activait des canaux cationiques non-sélectifs de la famille des TRP. La stimulation des cellules par la FN et l'Ang II favorise l'entrée de Sr^{2+} dans les cellules glomérulées, tout comme la TG et l'OAG. L'utilisation d'ions Sr^{2+} , de l'inhibiteur SKF-96365 (inhibiteur des canaux "store-operated channels") et de l'OAG supporte l'hypothèse de l'activation des canaux TRPC3/6/7 dans les cellules glomérulées. De plus, le fait que l'Ang II, l'OAG et la TG provoquent la translocation

des canaux TRPC6 à la membrane plasmique pourrait constituer un des mécanismes d'activation des canaux TRPC6 dans les cellules glomérulées.

Finalement, nous avons montré que les cellules glomérulées de la glande surrénale de rat en culture produisaient et sécrétaient des composantes de la MEC dans leur environnement extracellulaire. La Col I, Col IV, LN-1 et FN sont sécrétés par les cellules glomérulées et semblent restées en contact étroit avec les cellules. Des expériences de double immunofluorescence montrent que la FN et la LN ne sont pas parfaitement colocalisées autour des cellules glomérulées, ce qui pourrait impliquer la présence de molécules différentes (différentes isoformes d'intégrines) participant à l'arrangement des composantes de la MEC par les cellules glomérulées.

En conclusion, les présents résultats montrent que l'activation des intégrines des cellules glomérulées et fasciculées sont impliquées dans les fonctions physiologiques des cellules du cortex surrénalien telles que la prolifération cellulaire et la sécrétion de stéroïdes (Figure 30). En plus de l'activation de voies de signalisation (pp42/44 *mapk*) menant à la prolifération cellulaire (1), l'activation des intégrines pourrait activer des canaux potassiques Kv10.1 pouvant être impliqués dans la prolifération cellulaire (2). L'activation des intégrines pourrait aussi provoquer une entrée de Ca^{2+} par les canaux TRPC3/6/7 ayant un rôle dans la sécrétion d'aldostérone (3). Finalement, l'activation des intégrines par les composantes de la MEC pourrait venir moduler les effets de l'Ang II et de l'ACTH sur la sécrétion d'aldostérone (4).

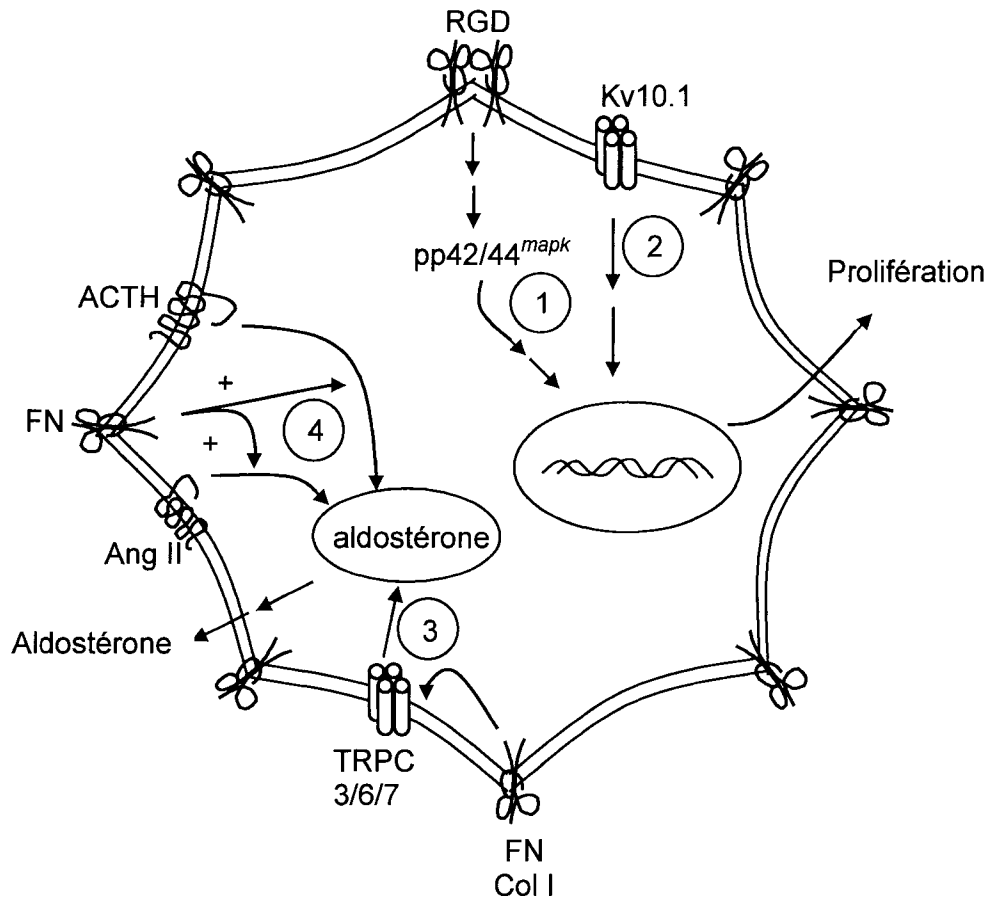


Figure 30 : Schéma récapitulatif du rôle des interactions intégrines/MEC, hormones et canaux sur les fonctions des cellules de la glande surrénale de rat adulte. 1) L'activation des intégrines par la peptide RGDS active la voies pp42/44 mapk; 2) Des canaux potassiques (Kv10.1) pourraient être impliqués dans la prolifération; 3) La FN active les canaux TRPC3/6/7 qui pourraient être impliqués dans les fonctions des cellules glomérulées; 4) La sécrétion de stéroïdes par l'Ang II et l'ACTH est modifiée par l'activation des intégrines.

7. REMERCIEMENTS

J'aimerais premièrement remercier les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté de réviser et corriger ma thèse : les Professeurs Nuria Basora, Michèle Brochu, Nathalie Fauchoux, Nicole Gallo-Payet et Marcel Daniel Payet.

J'aimerais ensuite remercier chaleureusement mon directeur de thèse, le Dr. Marcel Daniel Payet pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour son support tout au long de ma maîtrise et mon doctorat. Merci Dr. Payet pour votre passion contagieuse, votre bonne humeur, votre compréhension et les tours de moto.

Je voudrais aussi remercier le Dre Nicole Gallo-Payet, avec qui une partie de mon projet de doctorat a été élaboré. J'aimerais vous remercier pour vos judicieux conseils.

J'aimerais aussi remercier mes anciens collègues de travail : Alexandre Bourques-Viens, Peter Kilian, Yannick Blais et Lyne Bilodeau qui m'ont tous aidé dans mes expériences et qui m'ont donné des conseils tout au long de ma maîtrise et de mon doctorat. Un merci spécial à Lyne Bilodeau, ma meilleure technicienne et ma meilleure amie, merci pour nos fous rires.

Merci aussi aux membres du laboratoire du Dre Nicole Gallo-Payet. Tout spécialement, Lucie pour les expériences de sécrétion de stéroïdes, merci à Mélissa Otis pour la force et Hélène, pour la forme.

Finalement, j'aimerais remercier ma mère, Francine, mon modèle de courage et mon père Malcolm pour son support inconditionnel. Merci à ma sœur Nancy et mon cher beau-frère François, les petits, Alexandra et Vincent pour leur énergie. Mon cher Alain, je ne sais pas trop comment te remercier pour toutes ces années, presque 9 ans, à me supporter. Merci pour ton support, ta logique, tes conseils et ton amour.

8. RÉFÉRENCES

Adams, J. C. et F. M. Watt (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. Development 117 (4): 1183-98.

Akiba, Y., S. Kato, K. Katsube, M. Nakamura, K. Takeuchi, H. Ishii et T. Hibi (2004). Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. Biochem Biophys Res Commun 321 (1): 219-25.

Akiyama, S. K., K. Olden et K. M. Yamada (1995). Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev 14 (3): 173-89.

Albelda, S. M. et C. A. Buck (1990). Integrins and other cell adhesion molecules. Faseb J 4 (11): 2868-80.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et J. D. Watson (1994). Biologie moléculaire de la cellule. New York, USA, Editions Garland Publishing, Inc. : 1294.

Aota, S. et K. M. Yamada (1995). Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol 70 : 1-21.

Aplin, A. E., A. Howe, S. K. Alahari et R. L. Juliano (1998). Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. Pharmacol Rev 50 (2): 197-263.

Armulik, A. (2002). Splice variants of human beta 1 integrins: origin, biosynthesis and functions. Front Biosci 7 : d219-27.

Arteaga-Solis, E., B. Gayraud et F. Ramirez (2000). Elastic and collagenous networks in vascular diseases. Cell Struct Funct 25 (2): 69-72.

Aten, R. F., T. R. Kolodziej et H. R. Behrman (1995). A cell adhesion receptor antiserum abolishes, whereas laminin and fibronectin glycoprotein components of extracellular matrix promote, luteinization of cultured rat granulosa cells. Endocrinology 136 (4): 1753-8.

Auchus, R. J. et W. E. Rainey (2004). Adrenarche - physiology, biochemistry and human disease. Clin Endocrinol (Oxf) 60 (3): 288-96.

Aumailley, M. et B. Gayraud (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. J Mol Med 76 (3-4): 253-65.

Bader, M., J. Peters, O. Baltatu, D. N. Muller, F. C. Luft et D. Ganten (2001). Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. J Mol Med 79 (2-3): 76-102.

- Basora, N., G. Boulay, L. Bilodeau, E. Rousseau et M. D. Payet (2003). 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells. J Biol Chem 278 (34): 31709-16.
- Berridge, M. J. (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature 361 (6410): 315-25.
- Berry, M. G., A. W. Goode, J. R. Puddefoot, G. P. Vinson et R. Carpenter (2000). Integrin beta1 upregulation in MCF-7 breast cancer cells by angiotensin II. Eur J Surg Oncol 26 (1): 25-9.
- Berthod, F., L. Germain, N. Tremblay et F. A. Auger (2006). Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. J Cell Physiol 207 (2): 491-8.
- Birk, D. E., J. M. Fitch, J. P. Babiarz et T. F. Linsenmayer (1988). Collagen type I and type V are present in the same fibril in the avian corneal stroma. J Cell Biol 106 (3): 999-1008.
- Bolick, D. T., M. E. Hatley, S. Srinivasan, C. C. Hedrick et J. L. Nadler (2003). Lisofylline, a novel antiinflammatory compound, protects mesangial cells from hyperglycemia- and angiotensin II-mediated extracellular matrix deposition. Endocrinology 144 (12): 5227-31.
- Booth, R. E., J. P. Johnson et J. D. Stockand (2002). Aldosterone. Adv Physiol Educ 26 (1-4): 8-20.
- Bornstein, P. et E. H. Sage (2002). Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. Curr Opin Cell Biol 14 (5): 608-16.
- Boron, W. F. et E. L. Boulpaep (2003). Medical Physiology. A Cellular and Molecular Approach. Elsevier Science (USA) : 1319.
- Bosman, F. T. (1993). Integrins: cell adhesives and modulators of cell function. Histochem J 25 (7): 469-77.
- Bosman, F. T. et I. Stamenkovic (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. J Pathol 200 (4): 423-8.
- Brooks, P. C., A. M. Montgomery, M. Rosenfeld, R. A. Reisfeld, T. Hu, G. Klier et D. A. Cheresh (1994). Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell 79 (7): 1157-64.
- Buckingham, J. C. (2006). Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. Br J Pharmacol 147 Suppl 1 : S258-68.
- Calderwood, D. A., S. J. Shattil et M. H. Ginsberg (2000). Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. J Biol Chem 275 (30): 22607-10.

- Campbell, S., M. Otis, M. Cote, N. Gallo-Payet et M. D. Payet (2003). Connection between integrins and cell activation in rat adrenal glomerulosa cells: a role for Arg-Gly-Asp peptide in the activation of the p42/p44(mapk) pathway and intracellular calcium. Endocrinology 144 (4): 1486-1495.
- Canty, E. G. et K. E. Kadler (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. J Cell Sci 118 (Pt 7): 1341-53.
- Carragher, N. O. et M. C. Frame (2004). Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. Trends Cell Biol 14 (5): 241-9.
- Cary, L. A. et J. L. Guan (1999). Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. Front Biosci 4 : D102-13.
- Chamoux, E., L. Bolduc, J. G. Lehoux et N. Gallo-Payet (2001). Identification of extracellular matrix components and their integrin receptors in the human fetal adrenal gland. J Clin Endocrinol Metab 86 (5): 2090-8.
- Chamoux, E., L. Breault, J. G. Lehoux et N. Gallo-Payet (1999). Involvement of the angiotensin II type 2 receptor in apoptosis during human fetal adrenal gland development. J Clin Endocrinol Metab 84 (12): 4722-4730.
- Chamoux, E., A. Nancy, J. G. Lehoux et N. Gallo-Payet (2002). Fibronectin, laminin, and collagen IV as modulators of cell behavior during adrenal gland development in the human fetus. J Clin Endocrinol Metab 87 (4): 1819-28.
- Chan, D., S. R. Lamande, W. G. Cole et J. F. Bateman (1990). Regulation of procollagen synthesis and processing during ascorbate-induced extracellular matrix accumulation in vitro. Biochem J 269 (1): 175-81.
- Chen, Q., M. S. Kinch, T. H. Lin, K. Burridge et R. L. Juliano (1994). Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 269 (43): 26602-5.
- Cheng, C. Y. et P. J. Hornsby (1992). Expression of 11 beta-hydroxylase and 21-hydroxylase in long-term cultures of bovine adrenocortical cells requires extracellular matrix factors. Endocrinology 130 (5): 2883-9.
- Cheresh, D. A. (1992). Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion. Clin Lab Med 12 (2): 217-36.
- Chernousov, M. A. et D. J. Carey (2000). Schwann cell extracellular matrix molecules and their receptors. Histol Histopathol 15 (2): 593-601.
- Cherubini, A., G. Hofmann, S. Pillozzi, L. Guasti, O. Crociani, E. Cilia, P. Di Stefano, S. Degani, M. Balzi, M. Olivotto, E. Wanke, A. Becchetti, P. Defilippi, R. Wymore et A. Arcangeli (2005). Human ether-a-go-go-related gene 1 channels are physically linked to beta1 integrins and modulate adhesion-dependent signaling. Mol Biol Cell 16 (6): 2972-83.

- Chong, L. D., A. Traynor-Kaplan, G. M. Bokoch et M. A. Schwartz (1994). The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4- phosphate 5-kinase in mammalian cells. Cell 79 (3): 507-13.
- Chorvatova, A., L. Gendron, L. Bilodeau, N. Gallo-Payet et M. D. Payet (2000). A Ras-dependent chloride current activated by adrenocorticotropin in rat adrenal zona glomerulosa cells. Endocrinology 141 (2): 684-92.
- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. Cell 80 (2): 259-68.
- Clapham, D. E., C. Montell, G. Schultz et D. Julius (2003). International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. Pharmacol Rev 55 (4): 591-6.
- Clapham, D. E., L. W. Runnels et C. Strubing (2001). The TRP ion channel family. Nat Rev Neurosci 2 (6): 387-96.
- Claveau, I., Y. Mostefaoui et M. Rouabhia (2004). Basement membrane protein and matrix metalloproteinase deregulation in engineered human oral mucosa following infection with *Candida albicans*. Matrix Biol 23 (7): 477-86.
- Colognato, H. et P. D. Yurchenco (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. Dev Dyn 218 (2): 213-34.
- Cornbrooks, C. J., D. J. Carey, J. A. McDonald, R. Timpl et R. P. Bunge (1983). In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. Proc Natl Acad Sci U S A 80 (12): 3850-4.
- Cowley, S., H. Paterson, P. Kemp et C. J. Marshall (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. Cell 77 (6): 841-52.
- Cukierman, E., R. Pankov et K. M. Yamada (2002). Cell interactions with three-dimensional matrices. Curr Opin Cell Biol 14 (5): 633-9.
- Daniel, J. L., C. Dangelmaier et J. B. Smith (1994). Evidence for a role for tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma 2 in collagen-induced platelet cytosolic calcium mobilization. Biochem J 302 (Pt 2) : 617-22.
- Davey, G., M. Buzzai et R. K. Assoian (1999). Reduced expression of (alpha)5(beta)1 integrin prevents spreading- dependent cell proliferation. J Cell Sci 112 (Pt 24): 4663-72.
- Davis, M. J., X. Wu, T. R. Nurkiewicz, J. Kawasaki, P. Gui, M. A. Hill et E. Wilson (2002). Regulation of ion channels by integrins. Cell Biochem Biophys 36 (1): 41-66.
- de Kloet, E. R. (2003). Hormones, brain and stress. Endocr Regul 37 (2): 51-68.
- Dedhar, S. (1995). Integrin mediated signal transduction in oncogenesis: an overview. Cancer Metastasis Rev 14 (3): 165-72.

- Dedhar, S. (1999). Integrins and signal transduction. Curr Opin Hematol 6 (1): 37-43.
- Defilippi, P., C. Olivo, M. Venturino, L. Dolce, L. Silengo et G. Tarone (1999). Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. Microsc Res Tech 47 (1): 67-78.
- Diaz, E. S., E. Pellizzari, S. Meroni, S. Cigorraga, L. Lustig et B. Denduchis (2002). Effect of extracellular matrix proteins on in vitro testosterone production by rat Leydig cells. Mol Reprod Dev 61 (4): 493-503.
- Diaz-Gonzalez, F., J. Forsyth, B. Steiner et M. H. Ginsberg (1996). Trans-dominant inhibition of integrin function. Mol Biol Cell 7 (12): 1939-51.
- Dietrich, A., Y. S. M. Mederos, M. Gollasch, V. Gross, U. Storch, G. Dubrovskaya, M. Obst, E. Yildirim, B. Salanova, H. Kalwa, K. Essin, O. Pinkenburg, F. C. Luft, T. Gudermann et L. Birnbaumer (2005). Increased vascular smooth muscle contractility in TRPC6^{-/-} mice. Mol Cell Biol 25 (16): 6980-9.
- DiProspero, N. A., S. Meiners et H. M. Geller (1997). Inflammatory cytokines interact to modulate extracellular matrix and astrocytic support of neurite outgrowth. Exp Neurol 148 (2): 628-39.
- Dominguez-Jimenez, C., M. Yanez-Mo, A. Carreira, R. Tejedor, R. Gonzalez-Amaro, V. Alvarez et F. Sanchez-Madrid (2001). Involvement of alpha3 integrin/tetraspanin complexes in the angiogenic response induced by angiotensin II. Faseb J 15 (8): 1457-9.
- D'Souza, S. E., M. H. Ginsberg et E. F. Plow (1991). Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. Trends Biochem Sci 16 (7): 246-50.
- Dufour, S., J. L. Duband, M. J. Humphries, M. Obara, K. M. Yamada et J. P. Thiery (1988). Attachment, spreading and locomotion of avian neural crest cells are mediated by multiple adhesion sites on fibronectin molecules. Embo J 7 (9): 2661-71.
- Ehrhart-Bornstein, M., J. P. Hinson, S. R. Bornstein, W. A. Scherbaum et G. P. Vinson (1998). Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. Endocr Rev 19 (2): 101-43.
- Ekblom, P., P. Lonai et J. F. Talts (2003). Expression and biological role of laminin-1. Matrix Biol 22 (1): 35-47.
- Elamaa, H., A. Snellman, M. Rehn, H. Autio-Harmanen et T. Pihlajaniemi (2003). Characterization of the human type XVIII collagen gene and proteolytic processing and tissue location of the variant containing a frizzled motif. Matrix Biol 22 (5): 427-42.
- Elliott, A. C. (2001). Recent developments in non-excitable cell calcium entry. Cell Calcium 30 (2): 73-93.
- Engeli, S., R. Negrel et A. M. Sharma (2000). Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. Hypertension 35 (6): 1270-7.

- Enyeart, J. A., S. Danthi et J. J. Enyeart (2003). Corticotropin induces the expression of TREK-1 mRNA and K⁺ current in adrenocortical cells. Mol Pharmacol 64 (1): 132-42.
- Eto, H., S. Biro, M. Miyata, H. Kaieda, H. Obata, T. Kihara, K. Orihara et C. Tei (2003). Angiotensin II type 1 receptor participates in extracellular matrix production in the late stage of remodeling after vascular injury. Cardiovasc Res 59 (1): 200-11.
- Evans, J. F., Q. T. Niu, J. A. Canas, C. L. Shen, J. F. Aloia et J. K. Yeh (2004). ACTH enhances chondrogenesis in multipotential progenitor cells and matrix production in chondrocytes. Bone 35 (1): 96-107.
- Farhadian, F., F. Contard, A. Sabri, J. L. Samuel et L. Rappaport (1996). Fibronectin and basement membrane in cardiovascular organogenesis and disease pathogenesis. Cardiovasc Res 32 (3): 433-42.
- Farias, L. M., D. B. Ocana, L. Diaz, F. Larrea, E. Avila-Chavez, A. Cadena, L. M. Hinojosa, G. Lara, L. A. Villanueva, C. Vargas, E. Hernandez-Gallegos, I. Camacho-Arroyo, A. Duenas-Gonzalez, E. Perez-Cardenas, L. A. Pardo, A. Morales, L. Taja-Chayeb, J. Escamilla, C. Sanchez-Pena et J. Camacho (2004). Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. Cancer Res 64 (19): 6996-7001.
- Feige, J. J., M. Keramidas et E. M. Chambaz (1998). Hormonally regulated components of the adrenocortical cell environment and the control of adrenal cortex homeostasis. Horm Metab Res 30 (6-7): 421-5.
- Felding-Habermann, B. et D. A. Cheresh (1993). Vitronectin and its receptors. Curr Opin Cell Biol 5 (5): 864-868.
- Ficker, E., A. Dennis, Y. Kuryshev, B. A. Wible et A. M. Brown (2005). HERG channel trafficking. Novartis Found Symp 266 : 57-69; discussion 70-4, 95-9.
- Fleming, I., K. Kohlstedt et R. Busse (2006). The tissue renin-angiotensin system and intracellular signalling. Curr Opin Nephrol Hypertens 15 (1): 8-13.
- Fogerty, F. J., S. K. Akiyama, K. M. Yamada et D. F. Mosher (1990). Inhibition of binding of fibronectin to matrix assembly sites by anti- integrin (alpha 5 beta 1) antibodies. J Cell Biol 111 (2): 699-708.
- Friedman, S. L., F. J. Roll, J. Boyles et D. M. Bissell (1985). Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. Proc Natl Acad Sci U S A 82 (24): 8681-8685.
- Fujiyama, C., Z. Masaki et H. Sugihara (1993). Influence of extracellular matrix on the proliferation and differentiation of adrenocortical cells in culture. Pathol Res Pract 189 (10): 1205-1214.
- Fukami, K., T. Endo, M. Imamura et T. Takenawa (1994). alpha-Actinin and vinculin are PIP₂-binding proteins involved in signaling by tyrosine kinase. J Biol Chem 269 (2): 1518-22.

- Fukami, K., K. Furuhashi, M. Inagaki, T. Endo, S. Hatano et T. Takenawa (1992). Requirement of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate for alpha-actinin function. Nature 359 (6391): 150-2.
- Gailit, J. et E. Ruoslahti (1988). Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. J Biol Chem 263 (26): 12927-32.
- Gallo-Payet, N. et E. Escher (1985). Adrenocorticotropin receptors in rat adrenal glomerulosa cells. Endocrinology 117 (1): 38-46.
- Gallo-Payet, N., E. Grazzini, M. Cote, L. Chouinard, A. Chorvatova, L. Bilodeau, M. D. Payet et G. Guillon (1996). Role of Ca²⁺ in the action of adrenocorticotropin in cultured human adrenal glomerulosa cells. J Clin Invest 98 (2): 460-6.
- Gallo-Payet, N. et M. D. Payet (1989). Excitation-secretion coupling: involvement of potassium channels in ACTH-stimulated rat adrenocortical cells. J Endocrinol 120 (3): 409-21.
- Gallo-Payet, N. et M. D. Payet (2003). Mechanism of action of ACTH: beyond cAMP. Microsc Res Tech 61 (3): 275-287.
- Garcia, R. L. et W. P. Schilling (1997). Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines. Biochem Biophys Res Commun 239 (1): 279-83.
- Garcia-Pardo, A., E. A. Wayner, W. G. Carter et O. C. Ferreira, Jr. (1990). Human B lymphocytes define an alternative mechanism of adhesion to fibronectin. The interaction of the alpha 4 beta 1 integrin with the LHGPEILDVPST sequence of the type III connecting segment is sufficient to promote cell attachment. J Immunol 144 (9): 3361-6.
- Gehlsen, K. R., W. S. Argraves, M. D. Pierschbacher et E. Ruoslahti (1988). Inhibition of in vitro tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides. J Cell Biol 106 (3): 925-30.
- Gelse, K., E. Poschl et T. Aigner (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev 55 (12): 1531-46.
- Gendron, L., L. Laflamme, N. Rivard, C. Asselin, M. D. Payet et N. Gallo-Payet (1999). Signals from the AT2 (angiotensin type 2) receptor of angiotensin II inhibit p21ras and activate MAPK (mitogen-activated protein kinase) to induce morphological neuronal differentiation in NG108-15 cells. Mol Endocrinol 13 (9): 1615-26.
- George, E. L., E. N. Georges-Labouesse, R. S. Patel-King, H. Rayburn et R. O. Hynes (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. Development 119 (4): 1079-91.
- Ghosh, S. et M. S. Stack (2000). Proteolytic modification of laminins: functional consequences. Microsc Res Tech 51 (3): 238-46.

- Giancotti, F. G. (1997). Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. Curr Opin Cell Biol 9 (5): 691-700.
- Giancotti, F. G. (2000). Complexity and specificity of integrin signalling. Nat Cell Biol 2 (1): E13-4.
- Giancotti, F. G. et E. Ruoslahti (1990). Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. Cell 60 (5): 849-59.
- Giancotti, F. G. et E. Ruoslahti (1999). Integrin signaling. Science 285 (5430): 1028-32.
- Gilmore, A. P. et K. Burridge (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl- inositol-4-5-bisphosphate. Nature 381 (6582): 531-5.
- Ginsberg, M. H., J. C. Loftus, S. D'Souza et E. F. Plow (1990). Ligand binding to integrins: common and ligand specific recognition mechanisms. Cell Differ Dev 32 (3): 203-13.
- Ginsberg, M. H., A. Partridge et S. J. Shattil (2005). Integrin regulation. Curr Opin Cell Biol 17 (5): 509-16.
- Gong, Q., M. A. Jones et Z. Zhou (2006). Mechanisms of pharmacological rescue of trafficking-defective hERG mutant channels in human long QT syndrome. J Biol Chem 281 (7): 4069-74.
- Gonzalez-Amaro, R. et F. Sanchez-Madrid (1999). Cell adhesion molecules: selectins and integrins. Crit Rev Immunol 19 (5-6): 389-429.
- Granot, I., O. Halevy, S. Hurwitz et M. Pines (1991). Growth hormone and insulin-like growth factor I regulate collagen gene expression and extracellular collagen in cultures of avian skin fibroblasts. Mol Cell Endocrinol 80 (1-3): 1-9.
- Green, L. J., A. P. Mould et M. J. Humphries (1998). The integrin beta subunit. Int J Biochem Cell Biol 30 (2): 179-84.
- Grossmann, J. (2002). Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis--Anoikis". Apoptosis 7 (3): 247-60.
- Gu, J. et N. Taniguchi (2004). Regulation of integrin functions by N-glycans. Glycoconj J 21 (1-2): 9-15.
- Guan, J. L. (1997). Focal adhesion kinase in integrin signaling. Matrix Biol 16 (4): 195-200.
- Guan, J. L. (1997). Role of focal adhesion kinase in integrin signaling. Int J Biochem Cell Biol 29 (8-9): 1085-96.

- Guan, J. L. et R. O. Hynes (1990). Lymphoid cells recognize an alternatively spliced segment of fibronectin via the integrin receptor alpha 4 beta 1. Cell 60 (1): 53-61.
- Guilherme, A., K. Torres et M. P. Czech (1998). Cross-talk between insulin receptor and integrin alpha5 beta1 signaling pathways. J Biol Chem 273 (36): 22899-903.
- Haack, H. et R. O. Hynes (2001). Integrin receptors are required for cell survival and proliferation during development of the peripheral glial lineage. Dev Biol 233 (1): 38-55.
- Haas, T. A. et E. F. Plow (1994). Integrin-ligand interactions: a year in review. Curr Opin Cell Biol 6 (5): 656-62.
- Hanks, S. K. et T. R. Polte (1997). Signaling through focal adhesion kinase. Bioessays 19 (2): 137-45.
- Hanks, S. K., L. Ryzhova, N. Y. Shin et J. Brabek (2003). Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility. Front Biosci 8 : d982-96.
- Hato, T., N. Pampori et S. J. Shattil (1998). Complementary roles for receptor clustering and conformational change in the adhesive and signaling functions of integrin alphaIIb beta3. J Cell Biol 141 (7): 1685-95.
- Hein, L. (2005). Angiotensin II and cell-matrix adhesion: PKCepsilon is essential. Cardiovasc Res 67 (1): 6-8.
- Hendey, B. et F. R. Maxfield (1993). Regulation of neutrophil motility and adhesion by intracellular calcium transients. Blood Cells 19 (1): 143-61; discussion 161-4.
- Hill, C. S. et R. Treisman (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. Cell 80 (2): 199-211.
- Hofmann, T., A. G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann et G. Schultz (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. Nature 397 (6716): 259-63.
- Hofmann, T., M. Schaefer, G. Schultz et T. Gudermann (2000). Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. J Mol Med 78 (1): 14-25.
- Hohenester, E. et J. Engel (2002). Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. Matrix Biol 21 (2): 115-28.
- Howlett, A. R., N. Bailey, C. Damsky, O. W. Petersen et M. J. Bissell (1995). Cellular growth and survival are mediated by beta 1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. J Cell Sci 108 (Pt 5): 1945-57.
- Huet, C., C. Pisselet, B. Mandon-Pepin, P. Monget et D. Monniaux (2001). Extracellular matrix regulates ovine granulosa cell survival, proliferation and

- steroidogenesis: relationships between cell shape and function. J Endocrinol 169 (2): 347-60.
- Hughes, P. E. et M. Pfaff (1998). Integrin affinity modulation. Trends Cell Biol 8 (9): 359-64.
- Huhtala, P., M. J. Humphries, J. B. McCarthy, P. M. Tremble, Z. Werb et C. H. Damsky (1995). Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. J Cell Biol 129 (3): 867-79.
- Hulmes, D. J. (2002). Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures. J Struct Biol 137 (1-2): 2-10.
- Humphries, M. J. (2000). Integrin structure. Biochem Soc Trans 28 (4): 311-339.
- Humphries, M. J., M. A. Travis, K. Clark et A. P. Mould (2004). Mechanisms of integration of cells and extracellular matrices by integrins. Biochem Soc Trans 32 (Pt 5): 822-5.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. Cell 80 (2): 225-236.
- Hynes, R. O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69 (1): 11-25.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110 (6): 673-687.
- Idelman, S. (1970). Ultrastructure of the mammalian adrenal cortex. Int Rev Cytol 27 : 181-281.
- Ignatz, R. A. et J. Massague (1986). Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J Biol Chem 261 (9): 4337-45.
- Indyk, J. A., Z. L. Chen, S. E. Tsirka et S. Strickland (2003). Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tissue plasminogen activator/plasmin protease cascade during excitotoxic injury. Neuroscience 116 (2): 359-71.
- Iwami, K., N. Ashizawa, Y. S. Do, K. Graf et W. A. Hsueh (1996). Comparison of ANG II with other growth factors on Egr-1 and matrix gene expression in cardiac fibroblasts. Am J Physiol 270 (6 Pt 2): H2100-H2107.
- Iwanaga, T., M. Shikichi, H. Kitamura, H. Yanase et K. Nozawa-Inoue (2000). Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. Arch Histol Cytol 63 (1): 17-31.
- Janmey, P. A. et T. P. Stossel (1987). Modulation of gelsolin function by phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate. Nature 325 (6102): 362-4.

- Johansson, S., G. Svineng, K. Wennerberg, A. Armulik et L. Lohikangas (1997). Fibronectin-integrin interactions. Front Biosci 2 : d126-d146.
- Juliano, R. (1996). Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation. Bioessays 18 (11): 911-917.
- Juliano, R. L. (2002). Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. Annu Rev Pharmacol Toxicol 42 : 283-323.
- Juliano, R. L., P. Reddig, S. Alahari, M. Edin, A. Howe et A. Aplin (2004). Integrin regulation of cell signalling and motility. Biochem Soc Trans 32 (Pt3): 443-6.
- Kadler, K. E., D. F. Holmes, J. A. Trotter et J. A. Chapman (1996). Collagen fibril formation. Biochem J 316 (Pt 1) : 1-11.
- Kaido, T., M. Yebra, V. Cirulli et A. M. Montgomery (2004). Regulation of human beta-cell adhesion, motility, and insulin secretion by collagen IV and its receptor alpha1beta1. J Biol Chem 279 (51): 53762-9.
- Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer 3 (6): 422-33.
- Kanner, S. B., L. S. Grosmaire, J. A. Ledbetter et N. K. Damle (1993). Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. Proc Natl Acad Sci U S A 90 (15): 7099-103.
- Keresztes, Z., P. G. Rouxhet, C. Remacle et C. Dupont-Gillain (2006). Supramolecular assemblies of adsorbed collagen affect the adhesion of endothelial cells. J Biomed Mater Res A 76 (2): 223-33.
- Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. Nat Rev Immunol 5 (7): 546-59.
- Kirchhofer, D., J. Grzesiak et M. D. Pierschbacher (1991). Calcium as a potential physiological regulator of integrin-mediated cell adhesion. J Biol Chem 266 (7): 4471-7.
- Kiribayashi, K., T. Masaki, T. Naito, T. Ogawa, T. Ito, N. Yorioka et N. Kohno (2005). Angiotensin II induces fibronectin expression in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2 and p38 MAPK. Kidney Int 67 (3): 1126-35.
- Kornblihtt, A. R., C. G. Pesce, C. R. Alonso, P. Cramer, A. Srebrow, S. Werbajh et A. F. Muro (1996). The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. Faseb J 10 (2): 248-57.
- Kuhn, K. et J. Eble (1994). The structural bases of integrin-ligand interactions. Trends Cell Biol 4 (7): 256-61.

- Kurdi, M., W. C. De Mello et G. W. Booz (2005). Working outside the system: an update on the unconventional behavior of the renin-angiotensin system components. Int J Biochem Cell Biol 37 (7): 1357-67.
- Lafeuillade, B., S. Pellerin, M. Keramidas, M. Danik, E. M. Chambaz et J. J. Feige (1996). Opposite regulation of thrombospondin-1 and corticotropin-induced secreted protein/thrombospondin-2 expression by adrenocorticotrophic hormone in adrenocortical cells. J Cell Physiol 167 (1): 164-172.
- LaFlamme, S. E. et K. L. Auer (1996). Integrin signaling. Semin Cancer Biol 7 (3): 111-8.
- Lassing, I. et U. Lindberg (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. Nature 314 (6010): 472-4.
- Lauffenburger, D. A. et A. F. Horwitz (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. Cell 84 (3): 359-69.
- Le Bellego, F., C. Pisselet, C. Huet, P. Monget et D. Monniaux (2002). Laminin-alpha6beta1 integrin interaction enhances survival and proliferation and modulates steroidogenesis of ovine granulosa cells. J Endocrinol 172 (1): 45-59.
- Leavesley, D. I., M. A. Schwartz, M. Rosenfeld et D. A. Cheresh (1993). Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. J Cell Biol 121 (1): 163-70.
- Leitinger, B., A. McDowall, P. Stanley et N. Hogg (2000). The regulation of integrin function by Ca(2+). Biochim Biophys Acta 1498 (2-3): 91-8.
- Li, S., C. Van Den Diepstraten, S. J. D'Souza, B. M. Chan et J. G. Pickering (2003). Vascular smooth muscle cells orchestrate the assembly of type I collagen via alpha2beta1 integrin, RhoA, and fibronectin polymerization. Am J Pathol 163 (3): 1045-56.
- Liakos, P., E. M. Chambaz, J. J. Feige et G. Defaye (1998). Expression of ACTH receptors (MC2-R and MC5-R) in the glomerulosa and the fasciculata-reticularis zones of bovine adrenal cortex. Endocr Res 24 (3-4): 427-32.
- Liang, X., H. Zhang, A. Zhou et H. Wang (2003). AngRem104, an angiotensin II-induced novel upregulated gene in human mesangial cells, is potentially involved in the regulation of fibronectin expression. J Am Soc Nephrol 14 (6): 1443-51.
- Lijnen, P. J. et V. V. Petrov (2003). Role of intracardiac renin-angiotensin-aldosterone system in extracellular matrix remodeling. Methods Find Exp Clin Pharmacol 25 (7): 541-564.
- Loftus, J. C., J. W. Smith et M. H. Ginsberg (1994). Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. J Biol Chem 269 (41): 25235-8.

- Lucic, D., J. Mollenhauer, K. E. Kilpatrick et A. A. Cole (2003). N-telopeptide of type II collagen interacts with annexin V on human chondrocytes. Connect Tissue Res 44 (5): 225-39.
- Lumbers, E. R. (1999). Angiotensin and aldosterone. Regul Pept 80 (3): 91-100.
- Lynagh, G. R., R. A. Collins et P. Kaiser (2000). Development and use of monoclonal antibodies to chicken fibronectin to show that the chicken hepatocellular carcinoma cell line, LMH, constitutively expresses fibronectin. Res Vet Sci 68 (2): 147-52.
- Malone, J. P., A. George et A. Veis (2004). Type I collagen N-telopeptides adopt an ordered structure when docked to their helix receptor during fibrillogenesis. Proteins 54 (2): 206-15.
- Malone, J. P. et A. Veis (2004). Heterotrimeric type I collagen C-telopeptide conformation as docked to its helix receptor. Biochemistry 43 (49): 15358-66.
- Mao, Y. et J. E. Schwarzbauer (2005). Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. Matrix Biol 24 (6): 389-99.
- Marks, P. W., B. Hendey et F. R. Maxfield (1991). Attachment to fibronectin or vitronectin makes human neutrophil migration sensitive to alterations in cytosolic free calcium concentration. J Cell Biol 112 (1): 149-58.
- Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell 80 (2): 179-85.
- Mautner, V. et R. O. Hynes (1977). Surface distribution of LETS protein in relation to the cytoskeleton of normal and transformed cells. J Cell Biol 75 (3): 743-68.
- Mayne, R. (1989). Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? Arthritis Rheum 32 (3): 241-6.
- McLean, G. W., E. Avizienyte et M. C. Frame (2003). Focal adhesion kinase as a potential target in oncology. Expert Opin Pharmacother 4 (2): 227-34.
- McNamee, H. P., D. E. Ingber et M. A. Schwartz (1993). Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. J Cell Biol 121 (3): 673-8.
- Meredith, J. E., Jr., B. Fazeli et M. A. Schwartz (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. Mol Biol Cell 4 (9): 953-61.
- Mesiano, S. et R. B. Jaffe (1997). Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. Endocr Rev 18 (3): 378-403.
- Milesi, V., E. A. Aiello, A. Rebolledo, A. Gomez Alvis et A. O. Grassi de Gende (1999). Role of a Ca²⁺-activated K⁺ current in the maintenance of resting membrane potential of isolated, human, saphenous vein smooth muscle cells. Pflugers Arch 437 (3): 455-61.

- Miner, J. H. et P. D. Yurchenco (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 20 : 255-84.
- Mitani, F., K. Mukai, H. Miyamoto, M. Suematsu et Y. Ishimura (2003). The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. Biochim Biophys Acta 1619 (3): 317-24.
- Miyamoto, S., B. Z. Katz, R. M. Lafrenie et K. M. Yamada (1998). Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. Ann N Y Acad Sci 857 : 119-29.
- Miyamoto, S., H. Teramoto, O. A. Coso, J. S. Gutkind, P. D. Burbelo, S. K. Akiyama et K. M. Yamada (1995). Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. J Cell Biol 131 (3): 791-805.
- Miyamoto, S., H. Teramoto, J. S. Gutkind et K. M. Yamada (1996). Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. J Cell Biol 135 (6 Pt 1): 1633-42.
- Mizejewski, G. J. (1999). Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. Proc Soc Exp Biol Med 222 (2): 124-38.
- Montell, C., L. Birnbaumer, V. Flockerzi, R. J. Bindels, E. A. Bruford, M. J. Caterina, D. E. Clapham, C. Harteneck, S. Heller, D. Julius, I. Kojima, Y. Mori, R. Penner, D. Prawitt, A. M. Scharenberg, G. Schultz, N. Shimizu et M. X. Zhu (2002). A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels. Mol Cell 9 (2): 229-31.
- Moriguchi, Y., H. Matsubara, Y. Mori, S. Murasawa, H. Masaki, K. Maruyama, Y. Tsutsumi, Y. Shibasaki, Y. Tanaka, T. Nakajima, K. Oda et T. Iwasaka (1999). Angiotensin II-induced transactivation of epidermal growth factor receptor regulates fibronectin and transforming growth factor-beta synthesis via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. Circ Res 84 (9): 1073-1084.
- Morino, N., T. Mimura, K. Hamasaki, K. Tobe, K. Ueki, K. Kikuchi, K. Takehara, T. Kadowaki, Y. Yazaki et Y. Nojima (1995). Matrix/integrin interaction activates the mitogen-activated protein kinase, p44erk-1 and p42erk-2. J Biol Chem 270 (1): 269-273.
- Morla, A. O. et J. E. Mogford (2000). Control of smooth muscle cell proliferation and phenotype by integrin signaling through focal adhesion kinase. Biochem Biophys Res Commun 272 (1): 298-302.
- Mosher, D. F. (1984). Physiology of fibronectin. Annu Rev Med 35 : 561-575.
- Mould, A. P. et M. J. Humphries (1991). Identification of a novel recognition sequence for the integrin alpha 4 beta 1 in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. Embo J 10 (13): 4089-4095.

- Mould, A. P., A. Komoriya, K. M. Yamada et M. J. Humphries (1991). The CS5 peptide is a second site in the IIICS region of fibronectin recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Inhibition of alpha 4 beta 1 function by RGD peptide homologues. J Biol Chem 266 (6): 3579-85.
- Mould, A. P., L. A. Wheldon, A. Komoriya, E. A. Wayner, K. M. Yamada et M. J. Humphries (1990). Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as the integrin alpha 4 beta 1. J Biol Chem 265 (7): 4020-4024.
- Mountjoy, K. G., L. S. Robbins, M. T. Mortrud et R. D. Cone (1992). The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. Science 257 (5074): 1248-51.
- Muir, H. (1995). The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays 17 (12): 1039-48.
- Muller, U., B. Bossy, K. Venstrom et L. F. Reichardt (1995). Integrin alpha 8 beta 1 promotes attachment, cell spreading, and neurite outgrowth on fibronectin. Mol Biol Cell 6 (4): 433-48.
- Mulrow, P. J. (1999). Angiotensin II and aldosterone regulation. Regul Pept 80 (1-2): 27-32.
- Myllyharju, J. (2003). Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. Matrix Biol 22 (1): 15-24.
- Negoescu, A., B. Lafeuillade, S. Pellerin, E. M. Chambaz et J. J. Feige (1995). Transforming growth factors beta stimulate both thrombospondin-1 and CISP/thrombospondin-2 synthesis by bovine adrenocortical cells. Exp Cell Res 217 (2): 404-409.
- Ng-Sikorski, J., R. Andersson, M. Patarroyo et T. Andersson (1991). Calcium signaling capacity of the CD11b/CD18 integrin on human neutrophils. Exp Cell Res 195 (2): 504-8.
- Nilius, B. et G. Droogmans (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. Physiol Rev 81 (4): 1415-59.
- Occhiodoro, T., L. Bernheim, J. H. Liu, P. Bijlenga, M. Sinnreich, C. R. Bader et J. Fischer-Lougheed (1998). Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion. FEBS Lett 434 (1-2): 177-82.
- Oesser, S. et J. Seifert (2003). Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. Cell Tissue Res 311 (3): 393-9.
- Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurosaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizu, K. Ikenaka, K. Imoto et Y. Mori (1999). Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7.

- Ca²⁺)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor. J Biol Chem 274 (39): 27359-70.
- Otis, M., S. Campbell, M. D. Payet et N. Gallo-Payet (2005). Angiotensin II stimulates protein synthesis and inhibits proliferation in primary cultures of rat adrenal glomerulosa cells. Endocrinology 146 (2): 633-42.
- Ottani, V., M. Raspanti et A. Ruggeri (2001). Collagen structure and functional implications. Micron 32 (3): 251-60.
- Otschysch, N., A. Raes, D. Van Hoorick et D. J. Snyders (2002). Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. Proc Natl Acad Sci U S A 99 (12): 7986-91.
- Pankov, R. et K. M. Yamada (2002). Fibronectin at a glance. J Cell Sci 115 (Pt 20): 3861-3.
- Pardi, R., J. R. Bender, C. Dettori, E. Giannazza et E. G. Engleman (1989). Heterogeneous distribution and transmembrane signaling properties of lymphocyte function-associated antigen (LFA-1) in human lymphocyte subsets. J Immunol 143 (10): 3157-66.
- Pardo, L. A., D. del Camino, A. Sanchez, F. Alves, A. Bruggemann, S. Beckh et W. Stuhmer (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. Embo J 18 (20): 5540-7.
- Payet, M. D., L. Bilodeau, P. Drolet, J. Ibarondo, G. Guillon et N. Gallo-Payet (1995). Modulation of a Ca²⁺-activated K⁺ channel by angiotensin II in rat adrenal glomerulosa cells: involvement of a G protein. Mol Endocrinol 9 (8): 935-47.
- Payet, N. et J. G. Lehoux (1980). A comparative study of the role of vasopressin and ACTH in the regulation of growth and function of rat adrenal glands. J Steroid Biochem 12 : 461-7.
- Payne, D. M., A. J. Rossomando, P. Martino, A. K. Erickson, J. H. Her, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, M. J. Weber et T. W. Sturgill (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen- activated protein kinase (MAP kinase). Embo J 10 (4): 885-92.
- Pellerin, S., M. Keramidas, E. M. Chambaz et J. J. Feige (1997). Expression of laminin and its possible role in adrenal cortex homeostasis. Endocrinology 138 (3): 1321-1327.
- Pfau, S., D. Leitenberg, H. Rinder, B. R. Smith, R. Pardi et J. R. Bender (1995). Lymphocyte adhesion-dependent calcium signaling in human endothelial cells. J Cell Biol 128 (5): 969-78.
- Pierschbacher, M. D. et E. Ruoslahti (1984). Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. Proc Natl Acad Sci U S A 81 (19): 5985-8.

- Plopper, G. E., H. P. McNamee, L. E. Dike, K. Bojanowski et D. E. Ingber (1995). Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. Mol Biol Cell 6 (10): 1349-65.
- Plow, E. F., T. A. Haas, L. Zhang, J. Loftus et J. W. Smith (2000). Ligand binding to integrins. J Biol Chem 275 (29): 21785-8.
- Prockop, D. J. et K. I. Kivirikko (1995). Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem 64 : 403-434.
- Properzi, F. et J. W. Fawcett (2004). Proteoglycans and brain repair. News Physiol Sci 19 : 33-38.
- Qi, W., X. Chen, S. Twigg, T. S. Polhill, R. E. Gilbert et C. A. Pollock (2006). Tranilast attenuates connective tissue growth factor-induced extracellular matrix accumulation in renal cells. Kidney Int 69 (6): 989-95.
- Qian, F., P. Huang, L. Ma, A. Kuznetsov, N. Tamarina et L. H. Philipson (2002). TRP genes: candidates for nonselective cation channels and store-operated channels in insulin-secreting cells. Diabetes 51 Suppl 1 : S183-9.
- Rautavuoma, K., K. Takaluoma, R. Sormunen, J. Myllyharju, K. I. Kivirikko et R. Soininen (2004). Premature aggregation of type IV collagen and early lethality in lysyl hydroxylase 3 null mice. Proc Natl Acad Sci U S A 101 (39): 14120-5.
- Re, F., A. Zanetti, M. Sironi, N. Polentarutti, L. Lanfranccone, E. Dejana et F. Colotta (1994). Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. J Cell Biol 127 (2): 537-46.
- Reed, M. J. et V. H. James (1989). Regulation of steroid synthesis and metabolism by growth factors. Clin Endocrinol (Oxf) 31 (4): 511-525.
- Reincke, M., F. Beuschlein, G. Menig, G. Hofmockel, W. Arlt, R. Lehmann, M. Karl et B. Allolio (1998). Localization and expression of adrenocorticotrophic hormone receptor mRNA in normal and neoplastic human adrenal cortex. J Endocrinol 156 (3): 415-23.
- Ren, X. D., G. M. Bokoch, A. Traynor-Kaplan, G. H. Jenkins, R. A. Anderson et M. A. Schwartz (1996). Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 cells. Mol Biol Cell 7 (3): 435-42.
- Renshaw, M. W., X. D. Ren et M. A. Schwartz (1997). Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. Embo J 16 (18): 5592-5599.
- Richiert, D. M. et M. E. Ireland (1999). TGF-beta elicits fibronectin secretion and proliferation in cultured chick lens epithelial cells. Curr Eye Res 18 (1): 62-71.
- Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons et A. R. Horwitz (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. Science 302 (5651): 1704-9.

- Roberts, A. B., M. B. Sporn, R. K. Assoian, J. M. Smith, N. S. Roche, L. M. Wakefield, U. I. Heine, L. A. Liotta, V. Falanga, J. H. Kehrl et al. (1986). Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 83 (12): 4167-71.
- Roman, J., R. M. LaChance, T. J. Broekelmann, C. J. Kennedy, E. A. Wayner, W. G. Carter et J. A. McDonald (1989). The fibronectin receptor is organized by extracellular matrix fibronectin: implications for oncogenic transformation and for cell recognition of fibronectin matrices. J Cell Biol 108 (6): 2529-43.
- Romberger, D. J. (1997). Fibronectin. Int J Biochem Cell Biol 29 (7): 939-943.
- Ross, F. P., J. Chappel, J. I. Alvarez, D. Sander, W. T. Butler, M. C. Farach-Carson, K. A. Mintz, P. G. Robey, S. L. Teitelbaum et D. A. Cheresch (1993). Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin alpha v beta 3 potentiate bone resorption. J Biol Chem 268 (13): 9901-7.
- Ruoslahti, E. (1988). Fibronectin and its receptors. Annu Rev Biochem 57 : 375-413.
- Ruttiger, L., M. Sausbier, U. Zimmermann, H. Winter, C. Braig, J. Engel, M. Knirsch, C. Arntz, P. Langer, B. Hirt, M. Muller, I. Kopschall, M. Pfister, S. Munkner, K. Rohbock, I. Pfaff, A. Rusch, P. Ruth et M. Knipper (2004). Deletion of the Ca²⁺-activated potassium (BK) alpha-subunit but not the BKbeta1-subunit leads to progressive hearing loss. Proc Natl Acad Sci U S A 101 (35): 12922-7.
- Ryan, M. C. et L. J. Sandell (1990). Differential expression of a cysteine-rich domain in the amino-terminal propeptide of type II (cartilage) procollagen by alternative splicing of mRNA. J Biol Chem 265 (18): 10334-9.
- Sapolsky, R. M., L. M. Romero et A. U. Munck (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocr Rev 21 (1): 55-89.
- Sastry, S. K. et A. F. Horwitz (1993). Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. Curr Opin Cell Biol 5 (5): 819-831.
- Schaller, M. D. et J. T. Parsons (1993). Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase. Trends Cell Biol 3 (8): 258-262.
- Schimmer, B. P., M. Cordova, H. Cheng, A. Tsao, A. B. Goryachev, A. D. Schimmer et Q. Morris (2006). Global Profiles of Gene Expression Induced by Acth in Y1 Mouse Adrenal Cells. Endocrinology .
- Schlaepfer, D. D., C. R. Hauck et D. J. Sieg (1999). Signaling through focal adhesion kinase. Prog Biophys Mol Biol 71 (3-4): 435-478.
- Schlaepfer, D. D. et T. Hunter (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? Trends Cell Biol 8 (4): 151-157.

- Schnapp, L. M., N. Hatch, D. M. Ramos, I. V. Klimanskaya, D. Sheppard et R. Pytela (1995). The human integrin alpha 8 beta 1 functions as a receptor for tenascin, fibronectin, and vitronectin. J Biol Chem 270 (39): 23196-202.
- Schneller, M., K. Vuori et E. Ruoslahti (1997). Alphavbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFbeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. Embo J 16 (18): 5600-5607.
- Schroeder, J. A., L. F. Jackson, D. C. Lee et T. D. Camenisch (2003). Form and function of developing heart valves: coordination by extracellular matrix and growth factor signaling. J Mol Med 81 (7): 392-403.
- Schwartz, M. A. (1992). Transmembrane signalling by integrins. Trends Cell Biol 2 (10): 304-8.
- Schwartz, M. A. (1993). Spreading of human endothelial cells on fibronectin or vitronectin triggers elevation of intracellular free calcium. J Cell Biol 120 (4): 1003-10.
- Schwartz, M. A. et R. K. Assoian (2001). Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. J Cell Sci 114 (Pt 14): 2553-60.
- Schwartz, M. A., G. Both et C. Lechene (1989). Effect of cell spreading on cytoplasmic pH in normal and transformed fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 86 (12): 4525-9.
- Schwartz, M. A. et K. Denninghoff (1994). 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 (15): 11133-7.
- Schwartz, M. A., C. Lechene et D. E. Ingber (1991). Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cell shape. Proc Natl Acad Sci U S A 88 (17): 7849-53.
- Schwartz, M. A., M. D. Schaller et M. H. Ginsberg (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. Annu Rev Cell Dev Biol 11 : 549-99.
- Seematter, G., C. Binnert, J. L. Martin et L. Tappy (2004). Relationship between stress, inflammation and metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 7 (2): 169-73.
- Shankar, G., I. Davison, M. H. Helfrich, W. T. Mason et M. A. Horton (1993). Integrin receptor-mediated mobilisation of intranuclear calcium in rat osteoclasts. J Cell Sci 105 (Pt 1): 61-8.
- Shattil, S. J. et P. J. Newman (2004). Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. Blood 104 (6): 1606-15.
- Sheetz, M. P., D. P. Felsenfeld et C. G. Galbraith (1998). Cell migration: regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. Trends Cell Biol 8 (2): 51-4.

- Shi, D. L., C. Savona, E. M. Chambaz et J. J. Feige (1990). Stimulation of fibronectin production by TGF-beta 1 is independent of effects on cell proliferation: the example of bovine adrenocortical cells. J Cell Physiol 145 (1): 60-68.
- Shikata, Y., K. Shikata, M. Matsuda, K. Hiragushi, D. Ogawa, H. Sugimoto, J. Wada et H. Makino (1999). Integrins mediate the inhibitory effect of focal adhesion on angiotensin II-induced p44/42 mitogen-activated protein (MAP) kinase activity in human mesangial cells. Biochem Biophys Res Commun 261 (3): 820-3.
- Silver, F. H., I. Horvath et D. J. Foran (2002). Mechanical implications of the domain structure of fiber-forming collagens: comparison of the molecular and fibrillar flexibilities of the alpha1-chains found in types I-III collagen. J Theor Biol 216 (2): 243-54.
- Sjaastad, M. D., B. Angres, R. S. Lewis et W. J. Nelson (1994). Feedback regulation of cell-substratum adhesion by integrin-mediated intracellular Ca²⁺ signaling. Proc Natl Acad Sci U S A 91 (17): 8214-8.
- Skorstengaard, K., H. C. Thogersen et T. E. Petersen (1984). Complete primary structure of the collagen-binding domain of bovine fibronectin. Eur J Biochem 140 (2): 235-43.
- Sonnenberg, A. (1993). Integrins and their ligands. Curr Top Microbiol Immunol 184 : 7-35.
- Spat, A. et L. Hunyady (2004). Control of aldosterone secretion: a model for convergence in cellular signaling pathways. Physiol Rev 84 (2): 489-539.
- Spencer, S. J., S. Mesiano, J. Y. Lee et R. B. Jaffe (1999). Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. J Clin Endocrinol Metab 84 (3): 1110-1115.
- Stallmach, A., T. Giese, K. Pfister, B. M. Wittig, S. Kunne, M. Humphries, M. Zeitz et S. C. Meuer (2001). Activation of beta(1) integrins mediates proliferation and inhibits apoptosis of intestinal CD4-positive lymphocytes. Eur J Immunol 31 (4): 1228-38.
- Stawowy, P., C. Margeta, F. Blaschke, C. Lindschau, C. Spencer-Hansch, M. Leitges, G. Biagini, E. Fleck et K. Graf (2005). Protein kinase C epsilon mediates angiotensin II-induced activation of beta1-integrins in cardiac fibroblasts. Cardiovasc Res 67 (1): 50-9.
- Stefanovic, L., C. E. Stephens, D. Boykin et B. Stefanovic (2005). Inhibitory effect of dicationic diphenylfurans on production of type I collagen by human fibroblasts and activated hepatic stellate cells. Life Sci 76 (17): 2011-26.
- Sticht, H., A. R. Pickford, J. R. Potts et I. D. Campbell (1998). Solution structure of the glycosylated second type 2 module of fibronectin. J Mol Biol 276 (1): 177-87.

- Stiemer, B., G. Springmeier, L. el-Jarad et C. Schroter-Kermani (1993). Matrix production of smooth muscle cells from rat aorta in vitro. Histol Histopathol 8 (1): 63-72.
- Stossel, T. P. (1989). From signal to pseudopod. How cells control cytoplasmic actin assembly. J Biol Chem 264 (31): 18261-4.
- Sturgill, T. W., L. B. Ray, E. Erikson et J. L. Maller (1988). Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. Nature 334 (6184): 715-8.
- Thibault, G., M. J. Lacombe, L. M. Schnapp, A. Lacasse, F. Bouzeghrane et G. Lapalme (2001). Upregulation of alpha(8)beta(1)-integrin in cardiac fibroblast by angiotensin II and transforming growth factor-beta1. Am J Physiol Cell Physiol 281 (5): C1457-C1467.
- Tiger, C. F., M. F. Champlaud, F. Pedrosa-Domellof, L. E. Thornell, P. Ekblom et D. Gullberg (1997). Presence of laminin alpha5 chain and lack of laminin alpha1 chain during human muscle development and in muscular dystrophies. J Biol Chem 272 (45): 28590-5.
- Timpl, R. et J. C. Brown (1996). Supramolecular assembly of basement membranes. Bioessays 18 (2): 123-32.
- Touyz, R. M. et C. Berry (2002). Recent advances in angiotensin II signaling. Braz J Med Biol Res 35 (9): 1001-15.
- Trebak, M., G. Vazquez, G. S. Bird et J. W. Putney, Jr. (2003). The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. Cell Calcium 33 (5-6): 451-61.
- Tuckwell, D. S., A. Brass et M. J. Humphries (1992). Homology modelling of integrin EF-hands. Evidence for widespread use of a conserved cation-binding site. Biochem J 285 (Pt 1): 325-31.
- Tunggal, P., N. Smyth, M. Paulsson et M. C. Ott (2000). Laminins: structure and genetic regulation. Microsc Res Tech 51 (3): 214-27.
- Turner, C. E. (1998). Paxillin. Int J Biochem Cell Biol 30 (9): 955-9.
- Turner, C. E. (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. Nat Cell Biol 2 (12): E231-E236.
- Vacca, A., R. Ria, M. Presta, D. Ribatti, M. Iurlaro, F. Merchionne, E. Tanghetti et F. Dammacco (2001). alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. Exp Hematol 29 (8): 993-1003.
- van der Flier, A. et A. Sonnenberg (2001). Function and interactions of integrins. Cell Tissue Res 305 (3): 285-298.

- van der Rest, M. et R. Garrone (1991). Collagen family of proteins. Faseb J 5 (13): 2814-23.
- Vinson, G. P. (2003). Adrenocortical zonation and ACTH. Microsc Res Tech 61 (3): 227-39.
- Vinson, G. P. (2004). Glomerulosa function and aldosterone synthesis in the rat. Mol Cell Endocrinol 217 (1-2): 59-65.
- Wayner, E. A., A. Garcia-Pardo, M. J. Humphries, J. A. McDonald et W. G. Carter (1989). Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. J Cell Biol 109 (3): 1321-1330.
- Wennerberg, K., L. Lohikangas, D. Gullberg, M. Pfaff, S. Johansson et R. Fassler (1996). Beta 1 integrin-dependent and -independent polymerization of fibronectin. J Cell Biol 132 (1-2): 227-38.
- White, D. J., S. Puranen, M. S. Johnson et J. Heino (2004). The collagen receptor subfamily of the integrins. Int J Biochem Cell Biol 36 (8): 1405-10.
- Wierzbicka-Patynowski, I. et J. E. Schwarzbauer (2003). The ins and outs of fibronectin matrix assembly. J Cell Sci 116 (Pt 16): 3269-76.
- Wikner, N. E. et R. A. Clark (1988). Chemotactic fragments of fibronectin. Methods Enzymol 162 : 214-22.
- Williams, C. A. et B. L. Allen-Hoffmann (1990). Transforming growth factor-beta 1 stimulates fibronectin production in bovine adrenocortical cells in culture. J Biol Chem 265 (11): 6467-72.
- Williams, G. H. (2005). Aldosterone biosynthesis, regulation, and classical mechanism of action. Heart Fail Rev 10 (1): 7-13.
- Winklbauer, R. et C. Stoltz (1995). Fibronectin fibril growth in the extracellular matrix of the *Xenopus* embryo. J Cell Sci 108 (Pt 4): 1575-86.
- Wolkersdorfer, G. W. et S. R. Bornstein (1998). Tissue remodelling in the adrenal gland. Biochem Pharmacol 56 (2): 163-171.
- Wozniak, M. A., K. Modzelewska, L. Kwong et P. J. Keely (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. Biochim Biophys Acta 1692 (2-3): 103-19.
- Wu, C., V. M. Keivens, T. E. O'Toole, J. A. McDonald et M. H. Ginsberg (1995). Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix. Cell 83 (5): 715-24.
- Yamada, K. M. (1991). Adhesive recognition sequences. J Biol Chem 266 (20): 12809-12.

Yang, W. L., A. K. Godwin et X. X. Xu (2004). Tumor necrosis factor-alpha-induced matrix proteolytic enzyme production and basement membrane remodeling by human ovarian surface epithelial cells: molecular basis linking ovulation and cancer risk. Cancer Res 64 (4): 1534-40.

Yurochko, A. D., D. Y. Liu, D. Eierman et S. Haskill (1992). Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. Proc Natl Acad Sci U S A 89 (19): 9034-8.

Zaidel-Bar, R., M. Cohen, L. Addadi et B. Geiger (2004). Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. Biochem Soc Trans 32 (Pt3): 416-20.

Zhang, Z., A. O. Morla, K. Vuori, J. S. Bauer, R. L. Juliano et E. Ruoslahti (1993). The alpha v beta 1 integrin functions as a fibronectin receptor but does not support fibronectin matrix assembly and cell migration on fibronectin. J Cell Biol 122 (1): 235-42.

Zhu, X. et R. K. Assoian (1995). Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. Mol Biol Cell 6 (3): 273-82.

Zitt, C., C. R. Halaszovich et A. Luckhoff (2002). The TRP family of cation channels: probing and advancing the concepts on receptor-activated calcium entry. Prog Neurobiol 66 (4): 243-64.