



**HAL**  
open science

# Recherche de biomarqueurs des cellules propagatrices de glioblastome : étude de la signalisation calcique et du protéome membranaire

Emilie Audran

## ► To cite this version:

Emilie Audran. Recherche de biomarqueurs des cellules propagatrices de glioblastome : étude de la signalisation calcique et du protéome membranaire. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Strasbourg, 2012. Français. NNT : 2012STRAJ046 . tel-00767650

**HAL Id: tel-00767650**

**<https://theses.hal.science/tel-00767650>**

Submitted on 20 Dec 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

**ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé**

**UMR 7200, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique  
Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin 67400 Illkirch**

**THÈSE** présentée par :  
**Emilie AUDRAN**

soutenue le : **21 septembre 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline : Sciences de la Vie

**Recherche de Biomarqueurs des  
Cellules Propagatrices de Glioblastome  
Etude de la Signalisation Calcique et du  
Protéome Membranaire**

**THÈSE dirigée par :**  
**M HAIECH Jacques**

Professeur, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**  
**M CAPIOD Thierry**  
**M MOREAU Marc**

Docteur, INSERM U 807, Paris  
Docteur, CNRS UMS 547, Toulouse

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**  
**Mme CIANFERANI Sarah**

Docteur, Université de Strasbourg

## Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg au sein du Laboratoire d'Innovation Thérapeutique dirigé par le Pr Marcel Hibert et de l'Equipe de chimie biologie intégrative conjointement dirigée par le Pr Marcel Hibert et le Pr Jacques Haiech. Ce travail a été effectué en collaboration avec la société Transgene, présidée par Philippe Archinard, dans le département d'Immuno-pharmacologie dirigé par Ronald Rooke. Je tiens à remercier ces personnes ainsi que toutes celles qui, de près ou de loin, ont été associées à la mise en place de cette thèse et à mon accueil dans leurs laboratoires de recherche.

Je souhaite également remercier toutes les personnes qui se sont impliquées de près ou de loin dans ce projet, merci aux membres du jury pour le temps consacré à l'examen de mon travail de thèse.

Un grand merci à Jacques Haiech pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, avoir dirigé ma thèse et m'avoir permis de participer à plusieurs congrès internationaux, à des rencontres avec des entreprises, moments stimulants et très enrichissants, ainsi que pour m'avoir laissé prendre le temps d'organiser le Forum BIOTechno. Un grand merci également à Ron Rooke qui m'a fait découvrir Transgene et a fait de nombreuses démarches pour que je puisse travailler librement dans son laboratoire.

Je remercie également l'ensemble des équipes dans lesquelles j'ai été accueillie en commençant par l'équipe de chimie biologie intégrative, Marie-Claude, Maria, Jihu et Fanny pour leur présence et sympathie. Un grand grand merci à Marie pour ses conseils et les nombreux moments de discussion que nous avons eu autour d'un café, d'un repas ou au laboratoire ; tu as brillamment passé ton doctorat malgré les moments de doutes et les épreuves de cette dernière année ! Je suis sûre que tu trouveras un post-doc à la hauteur de tes qualités de chercheuse et d'encadrante.

Merci à l'équipe de PCBIS dirigée par Pascal Villa et qui m'a accueillie quotidiennement. Christel, Sophie et Adeline, merci pour votre accueil, votre disponibilité, votre grande réactivité face aux problèmes techniques (vous devriez normalement avoir un peu moins besoin de solliciter le service de maintenance de la Flex maintenant !), merci de m'avoir fait une place dans votre bureau pendant plusieurs semaines. Adeline, je souhaite que ton dévouement à ton travail se concrétise de la même façon que cela a pu se passer pour Sophie et je vous souhaite à toutes les trois une très bonne continuation.

Merci à toutes personnes que j'ai pu côtoyer dans les laboratoires de Transgène, en particulier à Mumu, Laëtitia, Caroline, Christelle et Nicolas pour m'avoir fait une place dans le

laboratoire, m'avoir passé mes cellules au FACS, m'avoir appris à manipuler les souris et surtout pour votre serviabilité, votre dynamisme, votre bonne humeur et votre joie de vivre !

Merci à l'équipe du laboratoire de spectrométrie de masse de Cronenbourg avec qui nous avons collaboré pour l'étude protéomique et qui nous a fourni des résultats d'une excellente qualité.

Un très grand merci également à Françoise et Marianne, les secrétaires de l'UMR, toujours sollicitées, qui facilitent la vie de tout le monde au laboratoire et se démenent pour que l'on obtienne nos remboursements.

Merci à l'équipe organisatrice du Forum BIOTechno de Strasbourg 2011, en particulier Marie et Daniel, avec qui j'ai passé de nombreuses heures et journées à préparer cet évènement ; ces moments furent pour moi une grande source de motivation, d'enrichissement et de fous rires. Merci également aux membres du bureau du Réseau BIOTechno qui m'ont fait découvrir la gestion d'une association nationale.

Enfin, un très grand merci à toutes les personnes qui m'ont encouragée et supportée bien avant et tout au long de cette thèse, en particulier Déborah, Suzanne et Jean-Louis, Fabien et Fanny, mes mamies, Déborah. Papa et Maman, Steve.

# Sommaire

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ENCARTS</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>XI</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>CHAPITRE 1 : GLIOBLASTOMES ET CELLULES PROPAGATRICES DE TUMEUR</b> .....	<b>1</b>
I.    LES GLIOBLASTOMES .....	2
1.    Description, classification.....	2
2.    Traitements des glioblastomes .....	18
3.    Le dogme des Cellules Souches Cancéreuses .....	24
II.   CELLULES PROPAGATRICES DE TUMEUR.....	25
1.    Historique : mise en évidence et isolation de cellules tumorigéniques .....	25
2.    Caractérisation des cellules propagatrices de glioblastome .....	29
3.    Origine de la cellule génératrice de tumeur : hypothèses .....	47
4.    Organisation et croissance de la tumeur .....	50
5.    Mécanismes de résistance aux thérapies classiques.....	68
III.  VERS DE NOUVELLES VOIES THERAPEUTIQUES .....	72
<b>CHAPITRE 2 : RECHERCHE DE MARQUEURS DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DES CELLULES PROPAGATRICES DE GLIOBLASTOME A TRAVERS LA SIGNALISATION CALCIQUE ET L'ETUDE DE LA CALMODULINE</b> .....	<b>78</b>
I.    SIGNALISATION CALCIQUE .....	79
1.    Le calcium : de la toxicité au messenger incontournable.....	80
2.    Éléments de la signalisation calcique.....	81
3.    La Calmoduline : chef d'orchestre de la signalisation calcique .....	108
4.    Utilisation d'inhibiteurs de CaM.....	115
II.   IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE PETITES MOLECULES CHIMIQUES INTERAGISSANT AVEC LA CALMODULINE .....	120
1.    Caractérisation de la liaison des sondes de CaM à SynCaM .....	120
2.    Identification et caractérisation de petites molécules interagissant avec CaM.....	123
3.    Intérêt physiologique des touches sélectionnées .....	131
III.  CARACTERISATION DE L'INTERACTION DE CAM AVEC SES CIBLES .....	135
IV.  UTILISATION DES MOLECULES INTERAGISSANT AVEC CAM POUR INHIBER LA LIAISON DE CAM AVEC SES CIBLES .....	139
1.    IC <sub>50</sub> de déplacement des peptides liés à CaM par chaque molécule .....	139
2.    Classification des molécules et CaMBDs .....	139
V.    PERTURBATION DE LA SIGNALISATION CALCIQUE DE CELLULES SELON L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA CELLULE .....	144
1.    Mesure de la concentration calcique intracellulaire .....	144

2.	<i>Caractérisation des effets des molécules sur l'homéostasie calcique de différents types cellulaires</i>	
	146	
VI.	CONCLUSION .....	158
<b>CHAPITRE 3 : RECHERCHE DE MARQUEURS MEMBRANAIRES DES CELLULES PROPAGATRICES DE</b>		
<b>GLIOBLASTOME..... 163</b>		
I.	INTRODUCTION .....	164
1.	<i>Les protéines membranaires : interface entre les milieux intra- et extracellulaire</i> .....	164
2.	<i>Protéomes de cellules de glioblastomes</i> .....	169
3.	<i>Protéomes de cellules souches de glioblastome</i> .....	170
II.	ISOLATION ET IDENTIFICATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES .....	172
1.	<i>Isolation des protéines membranaires</i> .....	172
2.	<i>Localisation cellulaire des protéines identifiées</i> .....	174
3.	<i>Sensibilité de détection des protéines</i> .....	175
4.	<i>Expression différentielle du protéome membranaire</i> .....	176
III.	CLUSTERS DE DIFFERENCIATION ET INTEGRINES .....	179
IV.	PROTEOME CALCIQUE .....	183
1.	<i>Protéines S100, marqueurs de tumeurs</i> .....	184
2.	<i>Protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique</i> .....	185
V.	CONCLUSION .....	186
<b>CONCLUSION GENERALE..... 189</b>		
<b>MATERIEL ET METHODES..... 197</b>		
I.	MATERIELS.....	198
1.	<i>Composants chimiques</i> .....	198
2.	<i>Protéines, Peptides et Sondes</i> .....	198
3.	<i>Chimiothèques</i> .....	199
II.	METHODES.....	199
1.	<i>Mesures spectroscopiques</i> .....	199
2.	<i>Mesures de polarisation de fluorescence (FP)</i> .....	200
3.	<i>Titration des sondes fluorescentes sur CaM à différentes concentrations calciques</i> .....	200
4.	<i>Identification de molécules interagissant avec CaM par essai FP compétitif</i> .....	201
5.	<i>Facteur Z'</i> .....	201
6.	<i>Titration de molécules chimiques sur SynCaM par FP compétitif avec les sondes fluorescentes</i> .....	201
7.	<i>Titration de peptides fluorescents sur CaM à différentes concentrations calciques</i> .....	202
8.	<i>Déplacement des peptides fluorescents par les molécules chimiques par essai FP compétitif</i> .....	202
9.	<i>Titration microcalorimétrique isothermique de composés sur SynCaM</i> .....	203
10.	<i>Mesure de l'index d'hydrophobicité de molécules par chromatographie (CHI)</i> .....	203

11.	<i>Culture cellulaire</i> .....	204
12.	<i>Essai de viabilité cellulaire</i> .....	206
13.	<i>Mesures du calcium cytosolique</i> .....	207
14.	<i>Extraction des membranes cellulaires (ghosts)</i> .....	208
15.	<i>Spectrométrie de masse</i> .....	208
<b>ANNEXES</b> .....		<b>209</b>
I.	ANISOTROPIE DE FLUORESCENCE .....	210
II.	CARACTERISATION DES MOLECULES INTERAGISSANT AVEC LA CALMODULINE .....	213
III.	PEPTIDES ET CONSTANTES DE DISSOCIATION A CAM EN FONCTION DE $[Ca^{2+}]$ .....	220
IV.	DEPLACEMENT DES PEPTIDES LIES A CAM PAR CHAQUE MOLECULE – $IC_{50}$ .....	221
V.	MODIFICATION DE L'HOMEOSTASIE CALCIQUE PAR DES ANTAGONISTES DE LA CALMODULINE – $EC_{50}$ .....	222
VI.	MODIFICATION DE L'HOMEOSTASIE CALCIQUE PAR DES ANTAGONISTES DE LA CALMODULINE – RELATIONS $EC_{50} / K_i$ .....	223
VII.	ÉLÉMENTS DU CALCIUM TOOLKIT IMPLIQUES DANS LES MECANISMES ON ET OFF DU SIGNAL CALCIUM.....	224
VIII.	« EF-HANDOME » : PROTEINES POSSEDANT AU MOINS UN MOTIF EF-HAND .....	231
IX.	IDENTIFICATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES – COMPARAISON BIBLIOGRAPHIQUE .....	237
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....		<b>239</b>
<b>PUBLICATIONS</b> .....		<b>279</b>

## Liste des Figures, Tableaux et Encarts

### Figures

Figure 1: Régions germinales du cerveau humain adulte.....	3
Figure 2: Neurogenèse adulte.....	4
Figure 3: Répartition des gliomes primaires du système nerveux central selon le type histologique. ....	5
Figure 4: Voies de progression des glioblastomes et altérations génétiques fréquemment associées.....	8
Figure 5: Altérations génétiques fréquentes de 3 voies de signalisation critiques des glioblastomes primaires.....	10
Figure 6: Voie de signalisation des récepteurs à tyrosine kinase. ....	11
Figure 7: Classification de Verhaak. ....	14
Figure 8: Biogenèse et mode d'action des microRNAs. ....	15
Figure 9: Classification des glioblastomes primaires selon leur profil d'expression de microRNAs. ...	17
Figure 10: Protocole de Stupp.....	19
Figure 11 : Structure du Témzolomide et activation de l'ion méthylant.....	20
Figure 12: Altération de l'ADN et apoptose induites par le Témzolomide.....	21
Figure 13 : Structure de la Carmustine.....	22
Figure 14: Essais cliniques sur les glioblastomes.....	23
Figure 15: Régénération de la tumeur par les cellules souches cancéreuses.....	24
Figure 16 : Mise en évidence des cellules souches cancéreuses. ....	26
Figure 17 : Isolation de cellules souches cancéreuses à partir de biopsies de tumeurs solides.....	28
Figure 18 : Analyse du caryotype des cellules propagatrices de glioblastome. ....	29
Figure 19 : Acquisition d'aberrations chromosomiques numériques et/ou structurelles. ....	30
Figure 20 : Voies de signalisation altérées dans les gCSCs. ....	31
Figure 21 : Modifications épigénétiques : méthylation des histones.....	36
Figure 22 : Contribution de l'EMT dans la progression de la cancérisation.....	40
Figure 23 : EMT et plasticité cellulaire.....	41
Figure 24 : Origine des CSCs.....	50



Figure 25 : Modèles de croissance tumorale .....	53
Figure 26 : Formation de microvésicules et exosomes. ....	56
Figure 27 : Voies de communication intercellulaires régulées par TGF $\beta$ dans un contexte tumoral....	58
Figure 28 : Effet Warburg. ....	62
Figure 29 : Interactions de la cellule souche cancéreuse avec les cellules de la niche immunitaire. ....	65
Figure 30 : Microenvironnement tumoral et interactions entre les différentes cellules. ....	67
Figure 31 : Mécanismes de résistance des gCSCs aux radio- et chimiothérapies. ....	68
Figure 32 : Cycle cellulaire et transitions de phases. ....	73
Figure 33: Régulation de l'homéostasie calcique de la cellule. ....	81
Figure 34: Schématisation des premiers systèmes utilisant le Ca $^{2+}$ comme messenger cellulaire. ....	82
Figure 35 : Protéines liant Ca $^{2+}$ avec un motif EF-hand.....	84
Figure 36: Schématisation des 4 unités fonctionnelles du signal Ca $^{2+}$ des premiers systèmes de signalisation calcique, I. ....	85
Figure 37: Schématisation des 4 unités fonctionnelles du signal Ca $^{2+}$ des premiers systèmes de signalisation calcique, II.....	87
Figure 38 : Structures de la Calmoduline. ....	89
Figure 39: Compartimentation de la cellule eucaryote et complexification de la signalisation calcique. ....	90
Figure 40: Modulation du signal calcium par les protéines tampon.....	93
Figure 41: Régulation du signal calcium par les protéines activées par la Calmoduline. ....	94
Figure 42: Représentation des principaux effecteurs des mécanismes ON et OFF dans la cellule.....	104
Figure 43 : Du « calcium toolkit » à l'empreinte calcique d'une cellule. ....	106
Figure 44: Aspects spatio-temporels d'un signal calcique. ....	107
Figure 45 : Modèle séquentiel de liaison du Ca $^{2+}$ à CaM.....	110
Figure 46 : Structures de la Calmoduline liée à différentes cibles. ....	111
Figure 47 : Interaction de la Calmoduline avec ses cibles en fonction du nombre d'ions calcium liés à la Calmoduline. ....	114
Figure 48 : Mécanismes d'activation de protéines par la Calmoduline. ....	115

Figure 49: Stratégie appliquée pour identifier de potentiels marqueurs de l'écosystème calcique d'une cellule.....	119
Figure 50 : Structure des sondes fluorescentes de CaM sélectionnées lors d'un criblage de molécules fluorescentes.....	120
Figure 51 : Constantes apparentes de dissociation $K_{app}$ des sondes S1, S2, S3 et S4 titrées sur SynCaM en fonction de la concentration en $Ca^{2+}$ .....	121
Figure 52 : Modèle séquentiel de la liaison des sondes ou de peptides fluorescents à la Calmoduline.....	122
Figure 53 : Criblage compétitif par anisotropie de fluorescence sur le complexe SynCaM – S1.....	124
Figure 54 : Courbes de titration des molécules interagissant avec CaM des familles amino-alkyl pyridazine et triazine par compétition avec la sonde S1.....	127
Figure 55 : Sites de liaison des molécules sur la Calmoduline.....	128
Figure 56 : Courbes de titration calorimétrique isothermique de SynCaM avec différentes molécules interagissant avec CaM.....	129
Figure 57 : Disponibilité biologique des molécules – Valeurs CHI.....	132
Figure 58 : Toxicité des composés sur les cellules TG01 et HEK.....	134
Figure 59 : Interaction des peptides avec CaM selon le nombre d'ions $Ca^{2+}$ liés à CaM.....	136
Figure 60 : Classification des CaMBDs et des molécules interagissant avec CaM selon la capacité ( $IC_{50}$ ) de chaque molécule à inhiber chaque complexe CaM – CaMBD.....	141
Figure 61 : Déplacement des CaMBDs liés à CaM selon l'antagoniste utilisé et la conformation de CaM.....	143
Figure 62 : Influence de la sonde calcique sur le signal calcium et comparaison avec le signal transmis.....	145
Figure 63 : Types de modification de l'homéostasie calcique observés après l'ajout de composés interagissant avec CaM sur les cellules.....	148
Figure 64 : Comparaison des modifications de l'homéostasie calcique induites par des antagonistes de CaM selon les CaMBDs ciblés.....	150
Figure 65: Comparaison des valeurs d' $EC_{50}$ et de $K_i$ obtenues dans chaque type cellulaire par différents composés selon leur famille chimique et le type de réponse induite.....	153
Figure 66 : Formation de métastases.....	166
Figure 67 : Ghosts membranaires.....	173

Figure 68 : Répartition des protéines identifiées par spectrométrie de masse dans les différents échantillons.....	174
Figure 69 : Expression des protéines membranaires dans les différents types cellulaires. ....	177
Figure 70 : Répartition des protéines surexprimées selon les processus biologiques impliqués.....	178
Figure 71 : Expression des CDs dans les différents types cellulaires. ....	180
Figure 72 : Expression des protéines impliquées dans la signalisation calcique.....	183
Figure 73 : Structure du composé LPS 01-08-L-G06, famille des chalcones. ....	188
Figure 74 : Structure des composés LPS 02-20-L-B05 et LPS 02-20-L-C04 .....	192
Figure 75 : Alignement des séquences de la Calmoduline.....	198
Figure 76 : Cellules en culture. ....	204
Figure 77 : Principe de mesure d'anisotropie ou de polarisation de fluorescence. ....	211
Figure 78 : Principe de criblage à haut débit par mesure d'anisotropie de fluorescence. ....	212

## Tableaux

Tableau 1: Classification des astrocytomes selon l’OMS. ....	6
Tableau 2 : Altérations génétiques des Glioblastomes primaires et secondaires. ....	9
Tableau 3 : Modèles animaux de glioblastomes établis par mutations génétiques. ....	48
Tableau 4 : Constantes d’association de l’interaction de SynCaM avec les sondes à différents degrés de saturation calcique. ....	122
Tableau 5 : Familles chimiques des antagonistes de la Calmoduline.....	126
Tableau 6 : Paramètres thermodynamiques de la liaison à SynCaM des molécules interagissant avec CaM. ....	130
Tableau 7 : Molécules induisant une modification de l’homéostasie spécifique d’un type cellulaire donné.....	150
Tableau 8: Répartition des molécules selon les groupes d’EC <sub>50</sub> pour les réponses transitoire et permanente dans les différents types cellulaires. ....	156
Tableau 9 : Molécules ayant un comportement différent dans un nombre restreint de types cellulaires .....	157
Tableau 10 : Comparaison des niveaux d’expressions transcriptomique et protéomique de 3 RCPGs. ....	176

## Encarts

Encart 1 : microRNAs .....	15
Encart 2 : Transition épithélamo-mésenchymateuse (EMT).....	40
Encart 3 : Signature ES .....	46
Encart 4 : Motif EF-hand.....	83
Encart 5 : Protéines tampon.....	91
Encart 6 : Formation de métastases.....	165
Encart 7 : Gene Ontology.....	175

## Abréviations

ABC	ATP binding cassette
ADN	Acide desoxyribonucléique
aNSCs	Adult neural stem cells
ARC	Canal sensible à l'acide arachidonique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATM	Ataxia telengectasia mutation
ATP	Adenosine tri phosphate
bFGF	Basic fibroblast growth factor
C1P	Ceramide 1 phosphate
Ca(V)	voltage dependant calcium channel
cADPR	Adénosine diphosphate reibose cyclique
CaM	Calmoduline
CaMBD	CaM binding domain
CaMK	Calmodulin dependant kinase
CaMKK	Calmodulin kinase kinase
CD	Cluster de différenciation
CHI	Chromatographic hydrophobicity index
Chk	checkpoint kinase
CICR	Calcium induced calcium release
CNG	Canal sensible aux nucléotides cycliques
CRAC	Canal activé par le relargage du $Ca^{2+}$ de l'ER
CSCs	Cancer stem cells
DAG	Diacylglycerol
DAPK	Death associated protein kinase
DISC	Death inducing signalling complex
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMMPRIN	Extracellular matrix MMP inducer
EMT	Epitheliamo-mesenchymal transition
ER	Endoplasmic reticulum
ES	Embryonic stem (cells)
FP	Fluorescence polarisation
GAD	Glutamate decarboxylase
gCSCs	Glioblastoma cancer stem cells
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GDNFRalpha1	GDNF receptor alpha 1
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GPCR	Récepteur couplé aux protéines G
HDGF	Hepatoma derived growth factor
HEK	Human embryonic kidney (cells)
HIF-1alpha	Hypoxia inducible factor 1 alpha

HSCs	Haematopoietic stem cells
Hsp90	Heat shock protein 90
IDH1	Isocitrate déshydrogénase 1
IL	Interleukine
InsP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IP3R	Insp3 receptor
ITC	Isothermic calorimetric titration
KCa	Canal potasique calcium dépendant
LSCs	Leukemia stem cells
MCT	Mono carboxylic transporteur
MDR	Multidrug resistance
MGMT	Methylguanine-DNA methyltransferase
MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
miRNA	micro ARN
MLCK	Chaîne légère de la myosine
MMP	Métalloprotéase
MMR	Mismatch repair
mNCX	Mitochondrial NCX
NAADP	Acide nicotinique adénine dinucleotide phosphate
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	NAD phosphorylé
NCID	Notch intracellular domain
NCKX	ATPase Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> dépendante
NCX	Echangeur Ca <sup>2+</sup> /Na <sup>+</sup>
nH	Nombre de Hill
NMDAR	N-méthyl-D-aspartate receptor
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PDB	Protein Data Bank
PDE1A	Phosphodiesterase 1A
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PHK	Phosphorylase kinase
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase
PLC	Phospholipase C
PMCA	Pompe calcique de la membrane plasmique
PtdInsP2	Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PTP	Pore de perméabilité de potentiel membranaire
PV	Parvalbumine
Rb	Retinoblastoma
RE	Récepteur à l'estrogène
ROC	Receptor operated channel
ROS	Reactive oxygen species
RTKs	Récepteurs à tyrosine kinase
RyR	Ryanodine receptor
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SCAMPER	Canal sensible aux sphingolipides

SDF1	Stromal derived factor 1
SERCA	Pompe calcique de l'ER
Shh	Sonic Hedgehog
siRNAs	Small interferent RNAs
SMOC	Second messenger operated channel
SOB	Sequenced and ordered binding (model)
SOC	Stock operated channel
SOCE	Stock operated calcium entry
SPCA	Pompe calcique du Golgi
STIM	Stromal interaction molecule
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TFP	Trifluoperazine
TG	Tumor generating
TGF	Tumor growth factor
TGNM	tumeur glioneuronal maligne
Tmz	Temozolomide
TNFAIP3	Tumor necrosis factor-alpha-induced protein 3
TP	Two pore channel, sensible au métabolisme cellulaire
TRP	Transient receptor potential
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VOC	Voltage operated channel

## Avant-Propos

Les glioblastomes primaires sont des tumeurs du système nerveux central au pronostic défavorable. L'échec des thérapies actuelles est notamment lié à la résistance de certaines cellules tumorales aux traitements, combinée à la sensibilité du tissu sain et au caractère infiltrant de ce type de tumeur. Au cours des 20 dernières années, des cellules particulières ont été mises en évidence dans plusieurs types de tumeurs, dont les glioblastomes : les cellules souches cancéreuses (CSCs). Ces cellules sont actuellement l'objet d'une attention toute particulière car elles permettraient d'expliquer l'échec des thérapies anti tumorales (Dick, 2008).

En effet, ces CSCs, à l'instar des cellules souches normales, ont des capacités de divisions symétriques et asymétriques, une vitesse de prolifération faible ainsi qu'une capacité à régénérer l'ensemble de la tumeur après xéno greffe malgré leur très faible représentativité au sein de la tumeur (moins de 1 %). Ces cellules sont par ailleurs radio- et chimiorésistantes aux traitements classiques visant principalement les cellules formant la masse tumorale (Bao et al., 2006a). Le développement de nouvelles stratégies permettant d'éradiquer spécifiquement ces CSCs est donc primordial (Reya et al., 2001).

À ce jour, différents marqueurs ont été proposés afin de caractériser et/ou de cibler ces CSCs (Beier et al., 2007; Blazek et al., 2007) mais il s'avère qu'aucun d'entre eux ne permet de sélectionner spécifiquement les cellules souches de glioblastome (gCSCs) (Patru et al., 2010).

D'autre part, le signal calcium contrôle de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la mort cellulaire, la migration, le métabolisme... à travers sa traduction en événements biochimiques par des protéines senseurs du signal calcium (Haiech et al., 2011) ; cette signalisation est modifiée dans les cellules tumorales. Parmi les senseurs calciques, la Calmoduline joue un rôle central et sa perturbation par des molécules chimiques permet de générer un signal calcium en absence de stimulus extérieur ; ce signal constitue une empreinte caractéristique de l'appareillage moléculaire responsable de la signalisation calcique (calcisomes) d'une cellule dans un état physiologique donné (Dagher et al., 2009).

L'**objectif** de ce travail de thèse est de déterminer des biomarqueurs des gCSCs permettant de cibler ces cellules et de caractériser leur état physiologique. Pour cela, le travail a été organisé sur deux axes principaux :



- L'identification et la caractérisation d'antagonistes de la Calmoduline permettant de générer une signature calcique spécifique des gCSCs
- L'identification de protéines exprimées exclusivement ou surexprimées à la surface des gCSCs

Dans le **Chapitre 1** de ce mémoire, nous présenterons les **glioblastomes**, leur classification selon différents critères et les traitements actuels. Nous aborderons ensuite l'état des connaissances actuelles de la biologie des **gCSCs** depuis leur découverte jusqu'à la mise en évidence de certaines de leurs propriétés leur permettant de résister aux thérapies actuelles en passant par leur caractérisation, leur mode de croissance, leur probable origine et leur rôle central dans l'organisation de l'organe tumoral. Nous verrons également que cet ensemble de propriétés des gCSCs leur confère une remarquable plasticité ainsi qu'une étonnante capacité à s'adapter aux changements ou agressions de leur environnement. Ce dernier point justifie la nécessité d'une multithérapie afin de pouvoir éradiquer ces cellules.

Dans le **Chapitre 2**, nous nous intéresserons à identifier des molécules chimiques capables de perturber différenciellement l'homéostasie calcique des gCSCs afin de les sensibiliser aux traitements thérapeutiques. Pour cela, nous nous attacherons tous d'abord à donner une vue aussi globale que possible de la régulation de la **signalisation calcique** et de l'importance de la **Calmoduline**, de la remarquable capacité de cette protéine à décoder le signal calcium pour le traduire en événements biochimiques à travers son interaction finement régulée avec une pléthore de protéines. Cette introduction permettra également de mettre en évidence la nécessité d'identifier un **panel de molécules** capables d'interagir différenciellement avec la Calmoduline, ce à quoi nous nous attacherons dans une deuxième partie. Dans une troisième partie, nous caractériserons l'interaction de la Calmoduline avec quelques-unes de ses **cibles** afin de mieux comprendre, dans une quatrième partie, la capacité des antagonistes présélectionnés à inhiber l'activation des cibles de la Calmoduline. Enfin, nous étudierons la capacité de ces antagonistes à **perturber l'homéostasie calcique** des gCSCs ainsi que d'autres types cellulaires. Cette perturbation sera caractérisée et comparée sur différents points et permettra d'identifier des molécules révélatrices de l'état physiologique particulier des gCSCs.

Dans le **Chapitre 3**, nous nous intéresserons à l'identification de protéines membranaires exprimées spécifiquement dans les gCSCs en attachant une importance particulière aux

clusters de différenciation des cellules immunitaires et aux protéines impliquées dans l'homéostasie calcique. Cette étude nous permettra d'identifier des protéines spécifiques des gCSCs et jusqu'à présent jamais rapportées dans le cadre de CSCs.

L'identification de ces deux types de marqueurs des gCSCs devrait permettre de les utiliser i) en tant qu'outils de recherche afin de mieux caractériser l'état physiologique de ces cellules, ii) en tant qu'outils de diagnostic ou de suivi d'un traitement et iii) en tant qu'outils thérapeutiques potentiels.

# **Chapitre 1**

## **Glioblastomes et Cellules Propagatrices de Tumeur**

## I. Les Glioblastomes

### 1. Description, classification

#### *1.1. Organisation du cerveau et neurogenèse adulte*

Différents types cellulaires composent le cerveau :

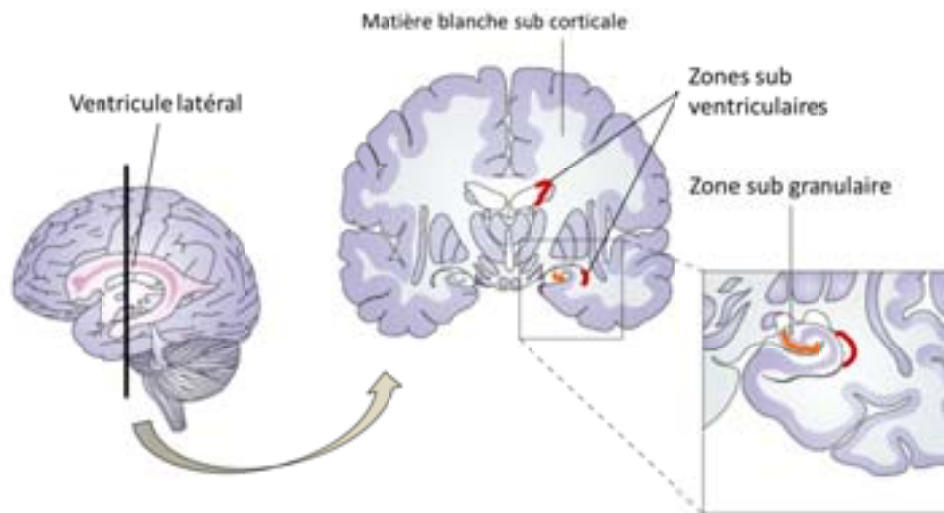
- Les neurones (environ 100 milliards) dont les corps cellulaires forment la substance grise et les prolongements cytoplasmiques forment la substance blanche
- Les cellules gliales qui assurent la nutrition et le soutien des neurones

Les **neurones** sont constitués de dendrites, receveurs de signaux extracellulaires, d'un soma, permettant l'intégration des différentes informations, et d'axones, permettant la transmission d'informations par conduction, propagation et transmission d'un signal nerveux. On distingue plusieurs types de neurones selon leur morphologie et fonction :

- les neurones sensitifs ou bipolaires (1 %) portent les informations des récepteurs sensoriels au système nerveux central
- les neurones moteurs ou multipolaires (10 %) portent les informations du système nerveux central aux cellules musculaires ou glandes. Parmi ces neurones, on trouve les cellules de Purkinje, les cellules pyramidales du cortex cérébral et les neurones du cortex cérébelleux
- les interneurones ou cellules pseudopolaires permettent les connexions entre les neurones du système nerveux central. Ils ont deux axones, l'un communiquant avec la moelle épinière et l'autre avec la peau ou le muscle

Les **cellules gliales** constituent environ 90 % des cellules du cerveau. Il s'agit d'un ensemble hétérogène de cellules composé en majorité d'**astrocytes**, d'**oligodendrocytes** et de cellules **microgliales**. Contrairement aux neurones, les cellules gliales peuvent se multiplier et sont impliquées dans les tumeurs cérébrales. Les astrocytes constituent, en association avec les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, la barrière hématoencéphalique.

L'existence de cellules souches dans les différents tissus est depuis longtemps admise ; cependant, l'isolation de **cellules souches neurales adultes** (aNSCs) est assez récente. Dans le début des années 90, la neurogenèse adulte a été démontrée chez les perroquets (Nottebohm, 1989) puis chez les souris (Reynolds and Weiss, 1992) et enfin chez l'homme à la fin des années 90 (Eriksson et al., 1998). Cette neurogenèse se situe dans des régions discrètes du cerveau, principalement au niveau de la zone subgranulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe et de la zone sub-ventriculaire (SVZ) des ventricules latéraux frontaux (Figure 1). La présence de ces cellules est indispensable à la génération et l'intégration de nouveaux neurones dans des circuits neuronaux préexistants ainsi que dans le maintien de l'intégrité du cerveau, de sa plasticité et de sa fonction optimale (Ming and Song, 2005).

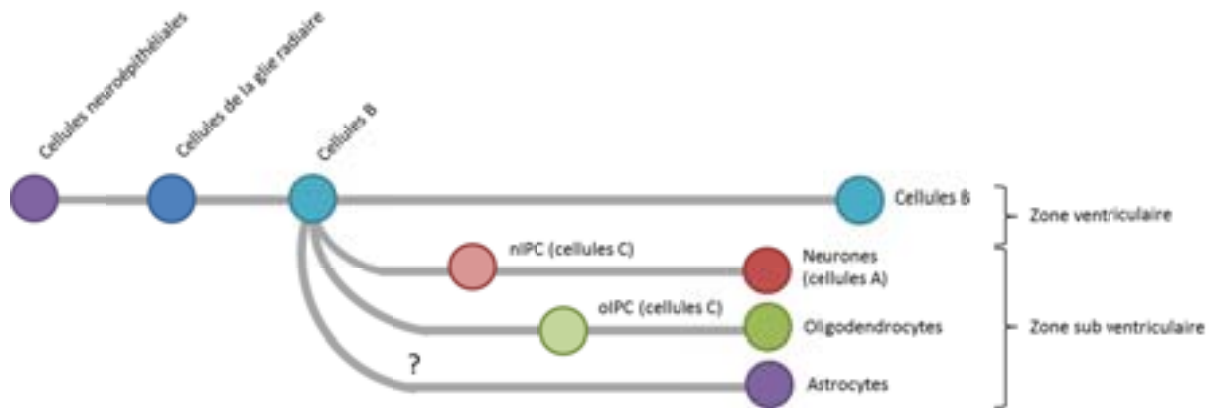


**Figure 1: Régions germinales du cerveau humain adulte**

Des cellules souches neurales adultes ont été identifiées dans 2 régions du cerveau : les zones subventriculaires (paroi des ventricules latéraux) et la zone subgranulaire au niveau du gyrus denté. Schéma d'après (Vescovi et al., 2006).

Depuis cette découverte, la structure du cerveau, et notamment l'organisation hiérarchique de ses cellules, est comparable à celle d'autres tissus (Figure 2). Le compartiment des cellules souches contient des cellules hautement différenciées ayant un potentiel d'autorenouvellement important et responsables de l'homéostasie cellulaire du tissu via leur multipotence. Malgré des controverses à propos de l'identité et la nature de ces aNSC, des cellules de la zone sub-ventriculaire exprimant un marqueur astroglial (GFAP, glial fibrillary acidic protein) ont été identifiées comme étant les aNSCs de cette région (Doetsch et al., 1999). Ces cellules, appelées cellules de type B, représentent un petit sous ensemble de la population astrocytaire de la zone sub-ventriculaire et sont capables de reconstruire la

structure neurogénétique entière quand toutes les autres cellules mitotiques ont été éliminées ; elles peuvent être différenciées des astrocytes matures par leurs propriétés de cellules souches. Les aNSCs donnent naissance à des **progéniteurs** multipotents, cellules de type C, eux-mêmes donnant naissance à des **progéniteurs matures**, cellules de type A, dont les capacités de différenciation sont limitées aux neurones (Vescovi et al., 2006).



**Figure 2: Neurogenèse adulte.**

Pendant le développement embryonnaire du système nerveux central, les cellules neuroépithéliales se multiplient à travers des divisions symétriques. Au cours du développement embryonnaire et fœtal, ces cellules s'allongent pour se transformer en cellules de la glio radiaire dans la zone ventriculaire. Au cours du développement adulte, ces cellules se transforment en cellules de type B, considérées comme les cellules souches neurales adultes. Les cellules B peuvent se diviser de façon asymétrique pour former des précurseurs intermédiaires des neurones (nIPC) et des oligodendrocytes (oIPC) (cellules C) qui migrent dans la zone sub ventriculaire et peuvent se différencier en Neurones (cellules A). Schéma réalisé d'après (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009)

### 1.2. Gliomes

Les gliomes sont des tumeurs présentant des similarités histologiques avec les cellules gliales (astrocytes, oligodendrocytes). Leur incidence est de 18,7 cas (dont 7,2 cas malins) pour 100 000 personnes par an aux USA (CBTRUS, 2010) et de 5 à 10 cas pour 100 000 habitants par an en France; il s'agit de la 4<sup>e</sup> cause de mortalité tumorale chez l'adulte et de la 2<sup>e</sup> cause chez l'enfant après les leucémies. Les gliomes apparaissent près des centres germinatifs des cellules neurales et migrent par la suite dans d'autres régions du cerveau.

1.2.1. Classification de l'OMS

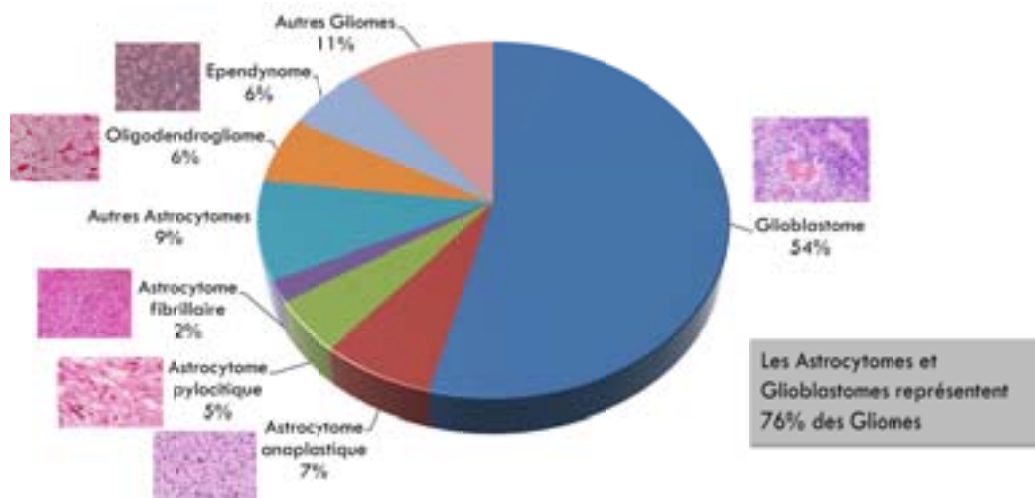


Figure 3: Répartition des gliomes primaires du système nerveux central selon le type histologique. Graphique établi sur des données de 2004-2006 aux USA sur 50 240 patients. D'après (CBTRUS, 2010).

La **classification de l'OMS** distingue plusieurs types de gliomes selon leur composition cellulaire (oligodendrogliomes, oligodendrocytomes, astrocytomes) et leur degré de malignité, traduit par 4 grades basés sur des critères histologiques et de pronostic (Louis et al., 2007) (Tableau 1). Dans les **astrocytomes**, le grade I correspond à des tumeurs bénignes ayant un faible potentiel de prolifération, bien délimitées et pouvant être totalement éliminées par chirurgie. Les néoplasmes de grade II ont une nature infiltrante et, malgré un potentiel prolifératif faible, peuvent réapparaître après chirurgie. Ces tumeurs peuvent évoluer vers des tumeurs de grade plus élevé comme des astrocytomes diffus de bas grade, des astrocytomes anaplastiques et des glioblastomes. Le grade III décrit des lésions avec une malignité beaucoup plus importante ; ce type de tumeur est traité par chimio- et radiothérapie. Les astrocytomes de **grade IV**, encore appelés glioblastomes, forment des tumeurs très **invasives**, hautement **proliférantes**, avec l'apparition de zones de **nécrose** et d'**hypoxie** et des phénomènes d'**angiogenèse** (les glioblastomes font partie des tumeurs les plus angiogéniques) ; on observe également une **zone inflammatoire** péri tumorale. Du fait du caractère très infiltrant des glioblastomes, la résection chirurgicale de la zone macroscopiquement affectée ne suffit pas à éliminer toutes les cellules tumorales, conduisant à des récives et une médiane de survie de 14,6 mois, malgré les traitements radio- et chimiothérapeutiques, ce qui fait de cette pathologie l'un des cancers au pronostic le plus sombre.

Grade	Caractéristiques
I	Astrocytomes pilocytiques localisés principalement au niveau du cervelet et des voies optiques Astrocytomes sous-épendymaires à cellules géantes
II	Tumeurs infiltrantes Astrocytes bien différenciés (de type fibrillaire, protoplasmiques, gémistocytique) Densité cellulaire faible ou modérée Absence de mitose
III	Plages d'anaplasie focales ou diffuses Augmentation de la densité cellulaire Pléomorphisme cellulaire Atypies nucléaires Pas de nécrose ni de néo-vascularisation
IV	Forte densité cellulaire, pléomorphisme cellulaire Mitoses typiques ou atypiques Prolifération vasculaire endothéliale Zones de nécrose

**Tableau 1: Classification des astrocytomes selon l'OMS.**

La classification de l'OMS distingue 4 grades d'astrocytomes selon des critères histologiques, le grade IV étant le plus agressif et de plus sombre pronostic.

### 1.2.2. Classification de l'Hôpital Ste Anne

Même si elle reste la première classification utilisée, la classification de l'OMS fait l'objet de controverses, car basée essentiellement sur des données histologiques et manquant parfois de reproductibilité. La classification de l'Hôpital Sainte-Anne complète cette classification en s'appuyant sur des données d'imagerie. Cette classification permet de définir la structure spatiale des gliomes, de préciser leur mode de croissance et de redéfinir certains critères de diagnostic. Elle permet de distinguer 3 catégories de gliomes parmi les gliomes infiltrants : les oligodendrogliomes (ou oligoastrocytomes) de grade A ou B et les glioblastomes (Daumas-Duport et al., 2000).

Cette classification découle de l'étude de biopsies étagées stéréotaxiques basées sur le scanner ou l'IRM, initialement réalisées afin de définir un volume cible, i.e. les limites de la tumeur, pour le traitement par curie thérapie. Les informations qui ont ainsi pu être acquises sur le mode de croissance des gliomes, infiltrant et/ou solide, et la traduction de ces 2 composantes en imagerie se sont avérées capitales pour en préciser le type histologique. L'acquisition d'images IRM / scanner se fait par injection d'un produit de contraste permettant de révéler le réseau capillaire (prise de contraste) ; les composantes de cellules tumorales isolées ne prennent pas le contraste mais, par l'intermédiaire de l'œdème qui leur est généralement



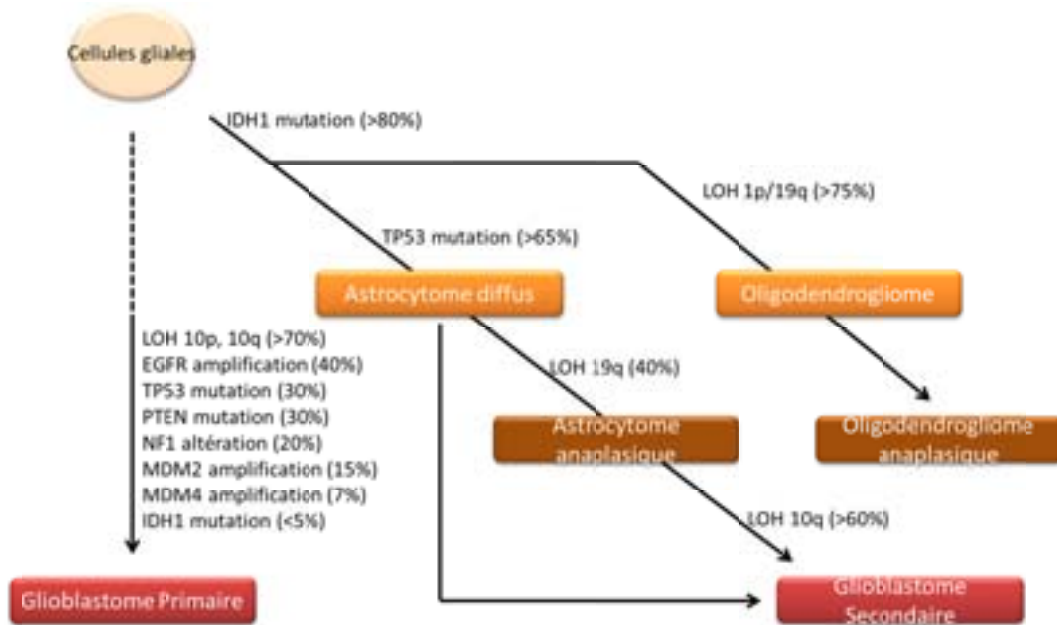
associé, elles se traduisent au scanner par une hypodensité et en IRM par un hyper signal. La classification Ste Anne est établie en fonction des paramètres suivants :

- Gliome ne prenant pas le contraste à l'IRM : il s'agit très probablement d'un oligoastrocytome de grade A
- Gliome prenant le contraste, i.e. angiogenèse associée à une tumeur astrocytaire : il peut s'agir d'un oligoastrocytome de grade B ou d'un glioblastome
  - o Si la prise de contraste est modérée, plus ou moins multicentrique et l'hyper signal présente des contours bien délimités, il s'agit probablement d'un oligoastrocytome de grade B. En général, dans ce type de gliome, les premiers symptômes surviennent avant l'âge de 45 ans
  - o Si la prise de contraste est unique, en anneau entouré d'un œdème et que le patient est âgé de plus de 45 ans, un glioblastome sera fort probable. Ce diagnostic est confirmé en présence d'une composante de tissu tumoral présentant une différenciation astrocytaire certaine et exclusive et grâce à l'aspect cytologique non oligodendrogial de la composante de cellules tumorales isolées. On observe également une zone de nécrose

La classification de Ste Anne ajoute à la classification de l'OMS une étude macroscopique de la tumeur, évitant ainsi les erreurs de diagnostic dû à la non-représentativité des échantillons tumoraux. Cependant, dans un souci de cohérence par rapport à la littérature, nous nous référons dans ce manuscrit à la classification de l'OMS.

### ***1.3. Développement des Glioblastomes et altérations génétiques majeures***

Parmi les gliomes de grade IV, on distingue les glioblastomes secondaires, évolution des grades inférieurs, des glioblastomes primaires ou *de novo*, beaucoup plus agressifs (Scherer, 1940). Bien que ces 2 types de glioblastomes se présentent de la même façon au niveau histologique, leur évolution est totalement différente (Figure 4), touchant des patients d'âges différents, se développant par le biais de mutations génétiques différentes (Tableau 2), montrant des profils d'expression d'ARNm ou de protéines différents, et pouvant différer dans la réponse aux chimio-et radiothérapies.



**Figure 4: Voies de progression des glioblastomes et altérations génétiques fréquemment associées.**

L'étude des altérations génétiques des glioblastomes permet de distinguer les glioblastomes secondaires, issus de l'évolution d'astrocytomes de grades inférieurs des glioblastomes primaires ou *de novo*. Ces 2 types de glioblastomes présentent des altérations génétiques tout à fait différentes malgré des caractéristiques histologiques similaires.

Les **glioblastomes secondaires** sont issus d'une évolution lente d'astrocytomes de bas grade. Ces glioblastomes présentent dans la majorité des cas une mutation de gène de l'isocitrate déshydrogénase 1 (IDH1) (Parsons et al., 2008; Yan et al., 2009); cette mutation est également retrouvée dans les oligodendrogliomes, suggérant une origine commune pour ces deux tumeurs (Watanabe et al., 2009; Yan et al., 2009). L'identification de la mutation de l'IDH1 est corrélée avec une survie plus importante des patients (la médiane de survie passe de 1,1 an à 3,8 ans) (Parsons et al., 2008). La mutation TP53 est également identifiée fréquemment (Ohgaki et al., 2004) ainsi que des pertes d'hétérozygotie (LOH) du chromosome 19q (Nakamura et al., 2000) et d'une partie du chromosome 10q (Ohgaki et al., 2004) au fur et à mesure de l'évolution de la tumeur.

Les **glioblastomes primaires** représentent 90 % des glioblastomes diagnostiqués et se développent rapidement sans qu'il n'y ait de lésion moins maligne préalablement identifiée. Contrairement aux glioblastomes secondaires, la mutation du gène de l'IDH1 est rarement identifiée dans les glioblastomes primaires (< 5 %) (Yan et al., 2009). D'autres mutations fréquentes ont été identifiées dans ces tumeurs, dont certaines impliquées dans l'amplification de la cascade de signalisation de l'EGFR (epidermal growth factor receptor) ou dans la mutation de la voie de signalisation de p53 : amplification du gène de l'EGFR, perte ou

mutation de PTEN, perte d'hétérozygotie (LOH) pour le chromosome 10 (Rasheed et al., 1995).

Gene		Fréquence des altérations (%)		Ref
		GBM 1	GBM 2	
<b>Amplification</b>				
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	39	0	1
		36	8	2
		40-60	10	3
MDM2	Murine Double Minute 2	7	0	4
<b>Délétion</b>				
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog	25	4	2
CDKN2A-P14 <sup>ARF</sup>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A	44	44	2
CDKN2A-P16 <sup>INK4A</sup>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A	31-32	13-19	2
		36	4	5
<b>LOH</b>				
10q (dont PTEN)	Phosphatase and Tensin homolog	70	63	6
13q (dont RB1)	Retinoblastoma 1	12	38	6
22q (dont TIMP3)	TIMP metallopeptidase inhibitor 3	41	82	7
19q		54	6	6
<b>Méthylation du promoteur</b>				
MGMT	O6-MethylGuanine-DNA-MethylTransferase	43	73	8
CDKN2A-P14 <sup>ARF</sup>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A	6	31	2
CDKN2A-P16 <sup>INK4A</sup>	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A	3	19	2
NDRG2	N-myc downstream-regulated gene 2	62	0	8
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog	9	82	9
RB1	Retinoblastoma Protein 1	14	43	10
TIMP3	TIMP metallopeptidase inhibitor 3	28	71	7
<b>Mutation</b>				
IDH1	Isocitrate Deshydrogenase 1	4-12	73-88	11, 12
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog	25-40	4	2, 13
TP53	Tumor Protein p53	28-29	65	2, 13

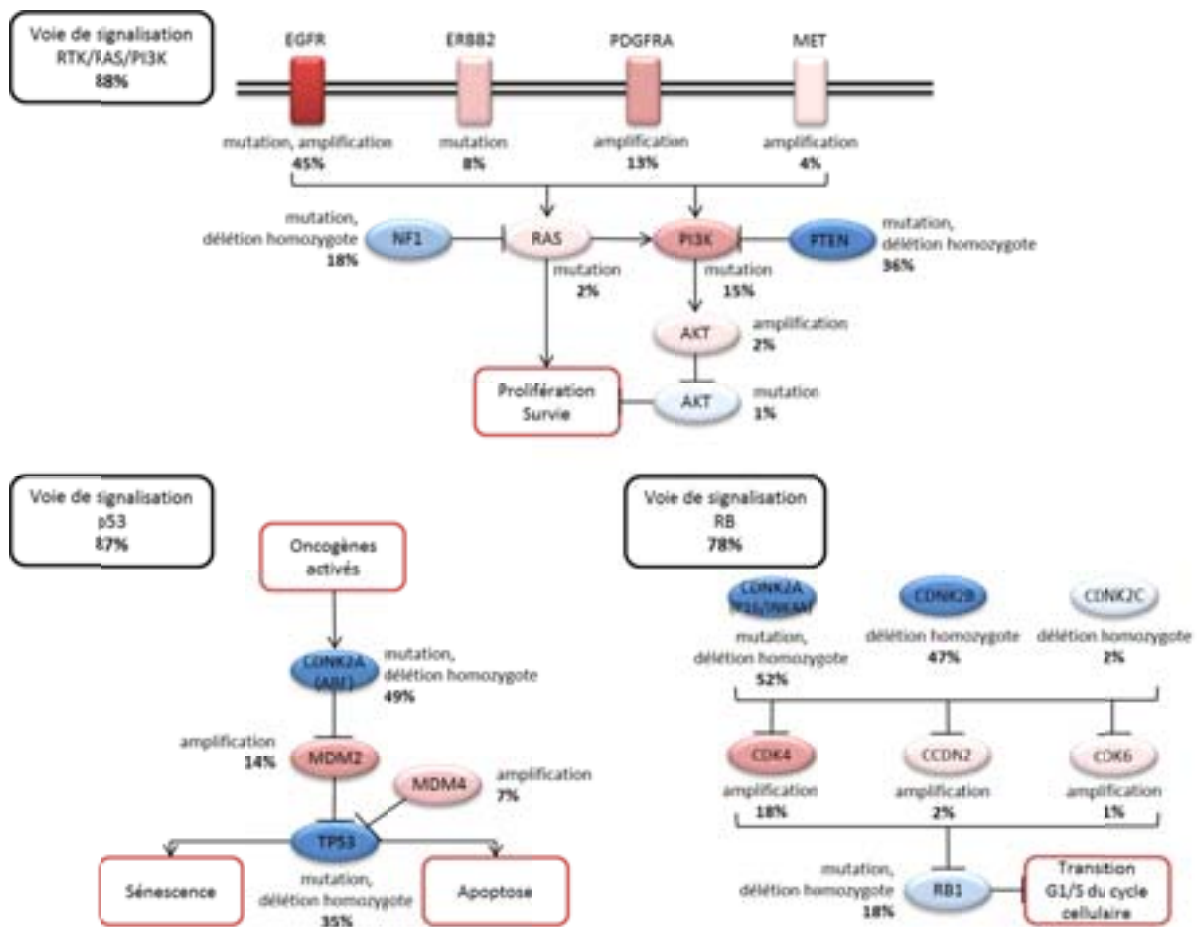
- Tohma et al., 1998. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 684.
- Ohgaki et al., 2004. *Cancer research* **64**, 6892.
- Kanu et al., 2009. *Clin Med Oncol* **3**, 39.
- Kleihues et al., 1999. *Neuro Oncol* **1**, 44.
- Biernat et al., 1997. *Acta neuropathologica* **94**, 303.
- Nakamura et al., 2000. *J Neuropathol Exp Neurol* **59**, 539.
- Nakamura et al., 2005. *Lab Invest* **85**, 165.
- Zawlik et al., 2009. *Neuroepidemiology* **32**, 21.
- Wiencke et al., 2007. *Neuro Oncol* **9**, 271.
- Nakamura et al., 2001. *Lab Invest* **81**, 77.
- Parsons et al., 2008. *Science* **321**, 1807.
- Yan et al., 2009. *N Engl J Med* **360**, 765.
- Zheng et al., 2008. *Nature* **455**, 1129.

**Tableau 2 : Altérations génétiques des Glioblastomes primaires et secondaires.**

Les glioblastomes primaires (GBM 1) sont issus *de novo* par toute une série de mutations. Les glioblastomes secondaires (GBM 2) sont issus de l'évolution d'astrocytomes grades II ou III et partagent la mutation du gène IDH1 avec les oligodendrogliomes, suggérant une origine commune. Tableau réalisé d'après Ohgaki and Kleihues, 2009.

*The Cancer Genome Atlas* (TCGA) regroupe près de 600 échantillons de biopsies de glioblastomes dont 206 ont été analysés à différents niveaux : nombre de copies et

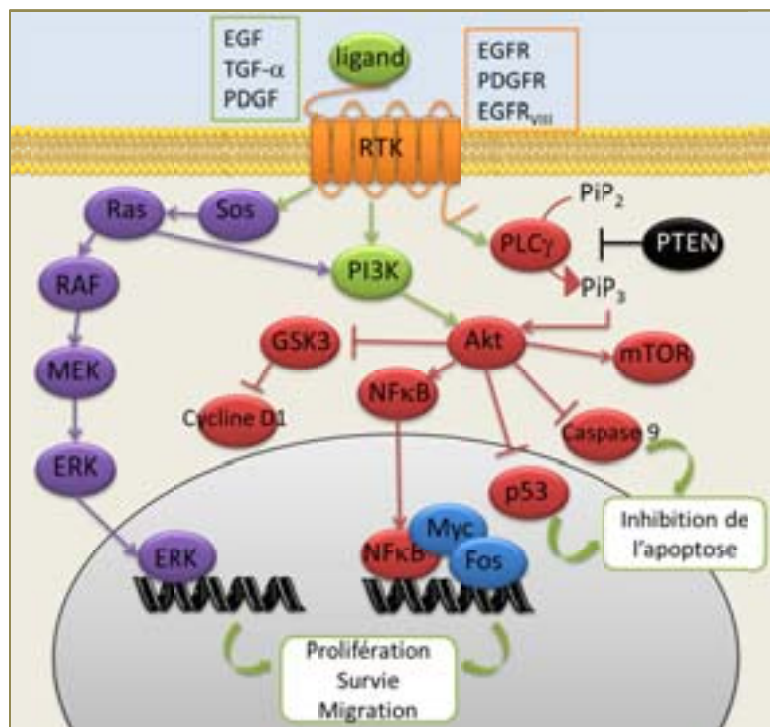
méthylation de gènes, transcriptome et microRNAs. Cette étude à grande échelle a permis de mettre en évidence 3 voies de signalisation fréquemment affectées (plus de 78 % des glioblastomes possèdent au moins une altération dans l'une des 3 voies) (Figure 5) : les voies activées par les RTKs (récepteurs à tyrosine kinase : PLC-g/PKC, RAS/Raf/MEK/ERK et PI<sub>3</sub>K/Akt-PKB/mTOR) regroupées sous la voie de signalisation de RTK/RAS/PI<sub>3</sub>K, celle de p53 et celle de Rb (Retinoblastoma) (TCGA, 2008).



**Figure 5: Altérations génétiques fréquentes de 3 voies de signalisation critiques des glioblastomes primaires.** Mutations et variations du nombre de copies des composants des voies de signalisation RTK/RAS/PI<sub>3</sub>K, p53 et RB. Les éléments rouges indiquent une altération activatrice et les éléments bleus une altération inhibitrice ; les éléments les plus foncés pour ces 2 jeux de couleurs correspondent aux altérations les plus fréquentes. Les pourcentages indiqués dans les encadrés correspondent à la fréquence des tumeurs présentant au moins l'une des altérations de la voie de signalisation concernée (TCGA, 2008).

Les récepteurs des facteurs de croissance EGFR (epidermal growth factor receptor) et PDGFR (platelet derived growth factor receptor) et leurs ligands EGF (epidermal growth factor), TGF $\alpha$  (tumor growth factor  $\alpha$ ) et PDGF (platelet derived growth factor), sont fréquemment amplifiés, surexprimés et mutés (activation constitutive des récepteurs) dans les gliomes. Les

récepteurs tyrosine kinase (RTKs) sont les médiateurs de cytokines oncogéniques et de facteurs de croissance, dont l'EGF et le bFGF (basic fibroblast growth factor) utilisés dans la culture *in vitro* des gCSCs (Lee et al., 2006a). Parmi les voies de signalisation RTKs, la signalisation de l'EGFR à travers la voie **PI3K** (phosphoinositide 3 kinase) / **Akt**, est l'une des plus caractérisées dans les glioblastomes où des mutations / amplifications de l'EGFR augmentent l'activation de cette voie de signalisation (Choe et al., 2003). Cette voie de signalisation intervient dans de multiples processus dont la survie cellulaire, la différenciation, la prolifération, l'angiogenèse, l'invasivité ou encore l'échappement apoptotique (Carracedo and Pandolfi, 2008) (Figure 6).



**Figure 6: Voie de signalisation des récepteurs à tyrosine kinase.**

L'hyperactivité des récepteurs tyrosine, kinase EGFR et PDGFR suite à la liaison de leur ligand ou leur expression constitutive (EGFR<sub>VIII</sub>), promeut la croissance cellulaire, l'angiogenèse via la voie RAS/MEK/ERK et la survie cellulaire, l'inhibition de l'apoptose via la voie PI3K/AKT.

### 1.4. Classification moléculaire des glioblastomes

L'étude des altérations génétiques permet d'identifier deux sous-groupes de glioblastomes d'origines très différentes et montre la limite de la classification de l'OMS en 4 grades. Cependant malgré la distinction glioblastome primaire / glioblastome secondaire, les glioblastomes primaires sont très hétérogènes et nécessitent une caractérisation plus précise permettant de prédire la survie du patient et la réponse au traitement.

#### 1.4.1. Classification basée sur le transcriptome

L'analyse du transcriptome de glioblastomes primaires permet de déterminer 4 sous-classes définies selon les altérations majeures présentées.

La classification basée sur le profil transcriptionnel des échantillons de glioblastome fait la distinction entre les glioblastomes proneuraux, neuraux, classiques et mésenchymateux (Verhaak et al., 2010) ; cette classification a été effectuée à partir de 91 échantillons de *The Cancer Genome Atlas* analysés avec 601 gènes. Dans cette classification, les groupes sont formés d'après plusieurs types d'altérations de l'expression de gènes (Figure 7).

Les **glioblastomes classiques** sont caractérisés par une perte du chromosome 10 et une amplification du chromosome 7, contenant le gène de l'EGFR ; cette amplification de l'EGFR, se traduisant par une augmentation d'un facteur 4 de la transcription, est retrouvée dans 97 % des glioblastomes classiques et est peu fréquente dans les autres classes. Par contre, dans le type classique, la protéine TP53 est rarement mutée bien que ce soit l'un des gènes les plus fréquemment altérés dans les glioblastomes. D'autre part, la délétion homozygote du locus du gène *CDKN2A*, codant pour les protéines suppresseurs de tumeur p16INK4A et p14ARF (Uhrbom et al., 2005), est un événement fréquent, associé à l'amplification de l'EGFR dans 94 % des cas, et représente la seule aberration de la voie de signalisation Rb. Cette sous-classe de glioblastomes est également définie par l'expression de marqueurs de précurseurs et cellules souches neuronales tels que NES, les voies de signalisation de Notch (NOTCH3, JAG1, LFNG) et sonic hedgehog (SMO, GAS1, GLI2).

Les **glioblastomes mésenchymateux** sont définis par des délétions hémizygotiques et des mutations du gène *NF1* (17q11.2), rendant ce gène altéré dans 53 % des cas. La classe mésenchymateuse est surtout caractérisée par l'expression de marqueurs mésenchymateux tels

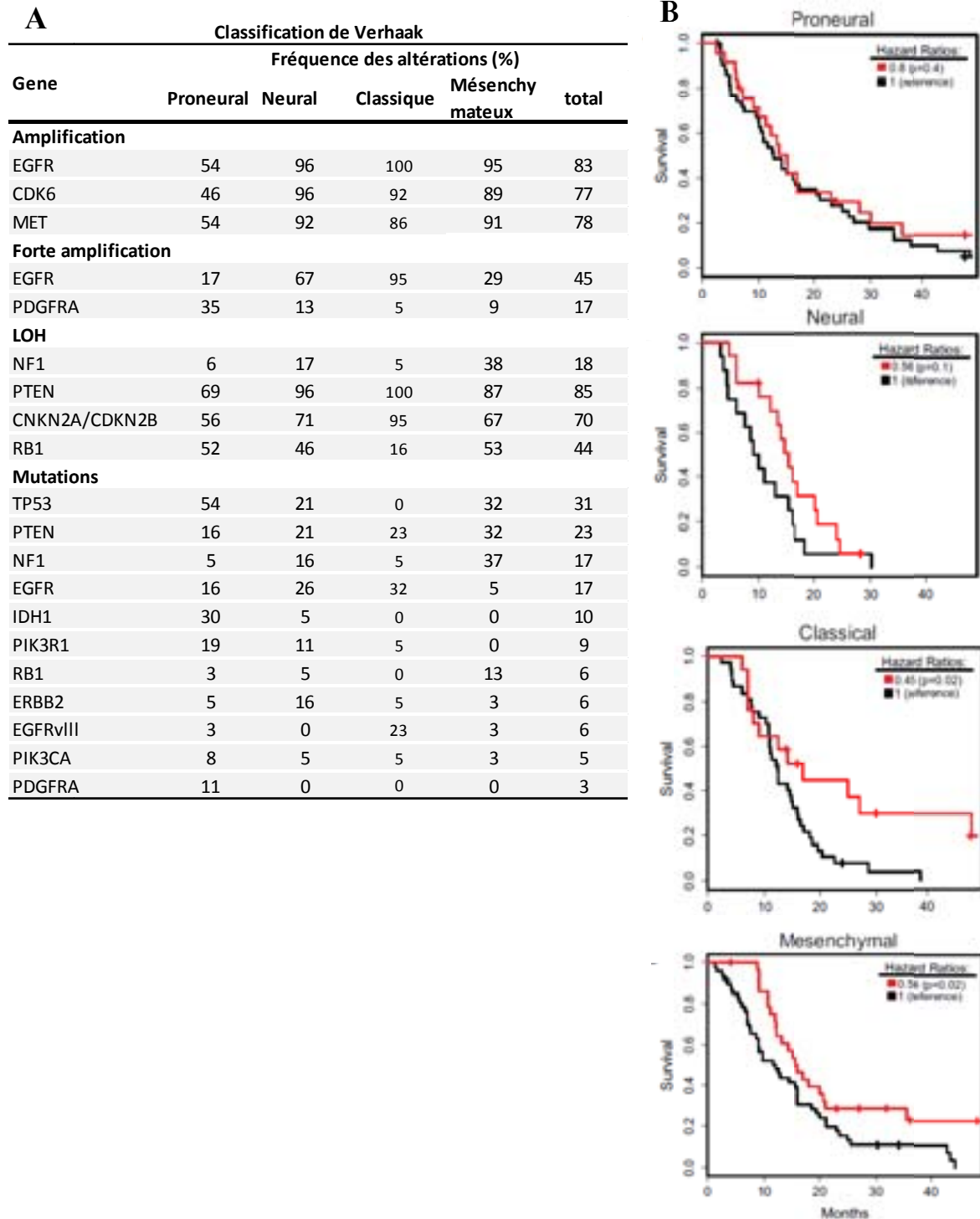
que CHI3L1 (Chitinase 3-like protein 1) et MET. CHI3L1 est un facteur de survie activé en réponse au stress physiologique subit par la cellule et inhibiteur de l'apoptose également impliqué dans l'invasion et la croissance des cellules tumorales (Ku et al., 2011) ; Met est un récepteur à tyrosine kinase activé par HGF (hepatocyte growth factor) et impliqué dans l'angiogenèse, la progression du cycle cellulaire, l'adhésion et la migration cellulaires ainsi que dans les réponses antiapoptotiques (Liu et al., 2011). La combinaison de l'augmentation de l'activité de marqueurs mésenchymateux et astrocytaires (CD44 et MERTK) est sous-jacente à une transition épithéliamo-mésenchymateuse (Encart 2) (Thiery, 2002). Les gènes de la voie de signalisation de la famille des TNF (tumor necrosis factor, TRADD, RELB, TNFRSF1A) sont surexprimés dans cette classe de glioblastomes, potentiellement du fait d'un phénomène de nécrose générale et des infiltrats inflammatoires associés à la classe mésenchymateuse.

Les **glioblastomes proneuraux** sont principalement définis par des altérations des gènes PDGFRA (amplifications du locus 4q12, parfois mutations empêchant la liaison du ligand) et IDH1 (mutations). Les mutations et pertes d'hétérozygotie de TP53 sont retrouvées majoritairement dans ce groupe. Les glioblastomes proneuraux sont également définis par une forte expression de gènes du développement oligodendrocytaire (PDGFRA, NKX2-2, OLIG2) (Noble et al., 2004), faisant de ces glioblastomes des cas atypiques. D'autre part, une forte expression d'Olig2 diminue l'expression du suppresseur de tumeur p21, augmentant ainsi la prolifération (Ligon et al., 2007). La signature proneurale contient également des gènes du développement proneural tels que SOX, DCX, DLL3, ASCL1 et TCF4.

Les **glioblastomes neuronaux** sont caractérisés par l'expression de marqueurs neuronaux tels que NEFL, GABA1, SYT1 et SLC12A5 ainsi qu'avec des marqueurs du développement des oligodendrocytes et astrocytes.

Selon cette classification, un effet significatif du traitement est observé sur la survie des patients ayant un glioblastome de type classique ou mésenchymateux alors que peu de bénéfice en est retiré pour les deux autres classes de glioblastomes (Figure 7).





**Figure 7: Classification de Verhaak.**

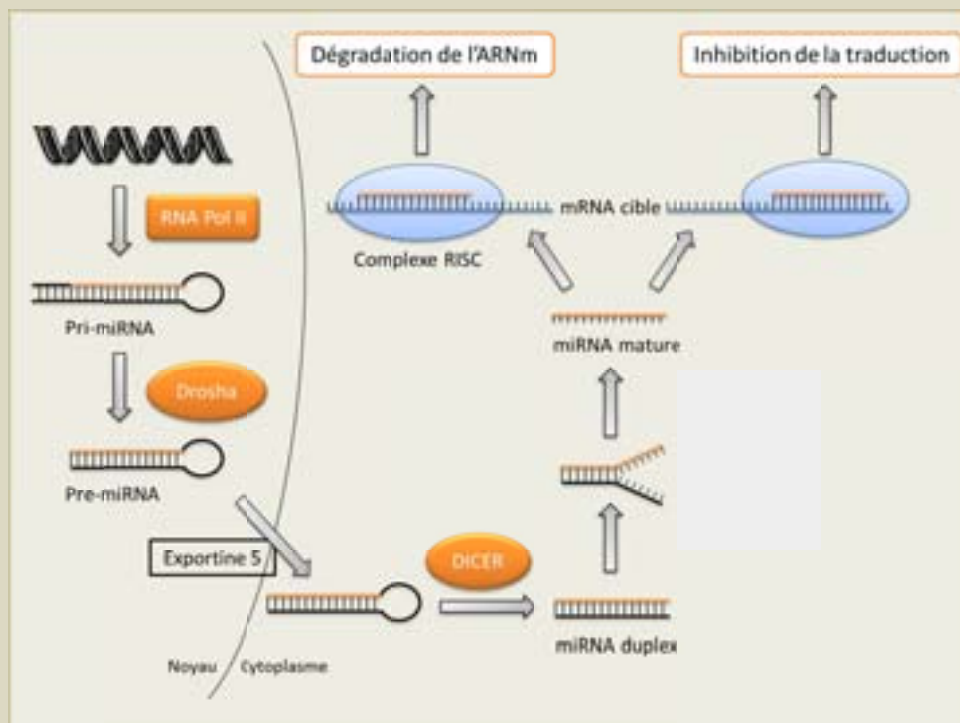
La classification de Verhaak distingue 4 catégories de glioblastomes primaires : Proneural, Neural, Classique et Mésenchymateux. **A** : Altérations géniques et transcriptionnelles des 4 sous types de glioblastomes. **B** : Probabilité de survie des patients selon le type de glioblastome et l'intensité de la thérapie. Bleu : thérapie peu intensive (chimiothérapie non concomitante à la radiothérapie ou moins de 4 cycles de chimiothérapie) ; Rouge : thérapie intensive (chimiothérapie concomitante à la radiothérapie et/ou plus de 3 cycles de chimiothérapie) (Verhaak et al., 2010).



1.4.2. Classification basée sur les microARNs

**Encart 1 : microRNAs**

Les microARNs ou miRNAs (molécules d'ARN de 20 à 22 nucléotides, <http://www.mirbase.org/>) sont de très puissants régulateurs intracellulaires, pouvant éteindre l'expression de gènes par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Les miRNAs émergent comme d'importants régulateurs du développement, de la différenciation et de la prolifération cellulaires (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Shi et al., 2010) et sont impliqués dans l'étiologie de nombreux cancers (Esquela-Kerscher and Slack, 2006). Dans le génome humain, 30 % des gènes environ sont régulés par des microRNAs ; chaque miRNA peut avoir plus d'une cible et chaque mRNA peut être éteint ou dégradé par plusieurs miRNAs.



**Figure 8: Biogenèse et mode d'action des microRNAs.**

Le gène codant pour le microRNA est transcrit par l'ARN polymérase II en un pri-miRNA, contenant une structure cap, une queue poly A et une boucle. Ce pri-miRNA est digéré par l'enzyme Drosha en pre-miRNA de 70 nucléotides environ et est exporté par l'Exportine 5 dans le cytoplasme. L'enzyme Dicer coupe la boucle du pre-miRNA pour en faire un miRNA duplex double brin. La séparation des 2 brins permet au miRNA mature d'être incorporé dans le complexe RISC. L'ARNm cible également recruté dans le complexe RISC (RNA induced silencing complex) où il se lie par complémentarité à la région 3'UTR (3' untranslated region) des mRNA. Cette interaction miRNA – mRNA bloque la translation et peut également, plus rarement, induire la dégradation endonucléolytique de l'ARNm.

La classification des glioblastomes selon l'expression de mRNAs est certes une avancée par rapport au regroupement de tous les glioblastomes primaires dans une même catégorie, mais ne permet pas de distinguer des différences de pronostiques pour l'ensemble des différentes sous-classes identifiées. Une autre classification, basée sur l'expression de miRNAs semble plus prometteuse et précise de ce point de vue (Lu et al., 2005; Rosenfeld et al., 2008).

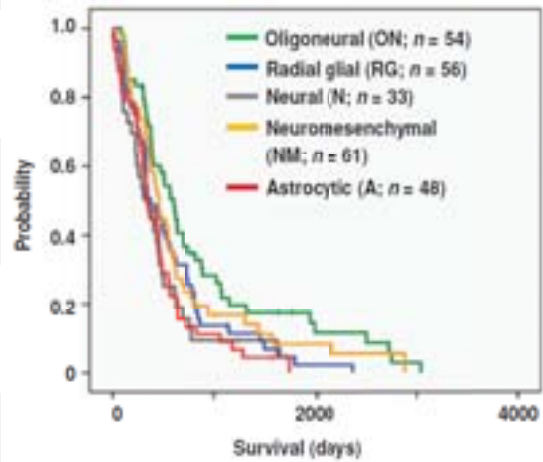
Plusieurs miRNAs ont été caractérisés comme régulateurs de la croissance des glioblastomes (Godlewski et al., 2010; Kim et al., 2011a; Silber et al., 2009; Silber et al., 2008) et il apparaît que l'expression aberrante de ces miRNAs isolés fait partie d'un cluster d'expression de miRNAs coordonné (Kim et al., 2011b). L'étude de l'expression des miRNAs permet de répartir les glioblastomes en plusieurs sous-groupes et doit permettre d'affiner le pronostic et de développer des traitements plus spécifiques. Le groupe de Park a ainsi identifié **5 sous-classes de glioblastomes** basées sur l'expression différentielle de miRNAs (étude de l'expression de 121 miRNAs dans 261 échantillons de glioblastomes de *The Cancer Genome Atlas*) et présentées en Figure 9. Chaque groupe correspond à des étapes majeures de différenciation des cellules souches neurales : signatures de **précurseurs neuronaux**, **précurseurs oligoneuronaux**, **précurseurs multipotents**, **précurseurs d'astrocytes** et **neuromésenchymale** ; ceci met en évidence la transformation de précurseurs neuronaux comme possible origine des glioblastomes (Kim et al., 2011b).

La régulation des programmes de croissance et de différenciation par les miRNAs contribue de façon significative à la diversité des glioblastomes et à la survie des patients : les glioblastomes de type proneural, définis d'après l'étude transcriptomique, et associés à un meilleur pronostic peuvent être divisés en 2 sous-groupes d'expression de miRNAs montrant des différences significatives au niveau de la survie de patients (Figure 9).

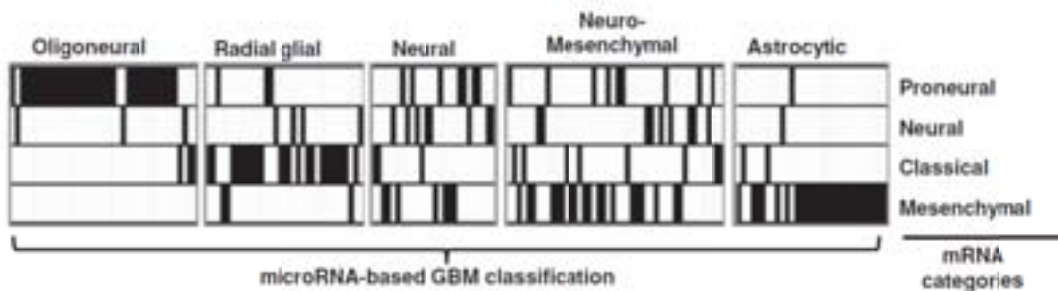
**A**

Signature	microRNAs
Précurseurs Oligo-neuronaux	miR-26a, 135b, 196a, 196b, 10b, 9*, 9, 182*, 130a, 20a, 25, 424, 340, 92, 96, 17-3p, 106a, 17-5p, 182, 18a, 183, 19a, 19b, 181a, 181b, 149, 345, 505, 362
Précurseurs multipotents	miR-99b, 125a, 92b, 30a-5p, 125b, 100, 99a, let-7c, let-7d, 26b, 98, 195, 135a, let-7e, let-7i, let-7b, let-7a, 335, 126*, 126, 146a, 143, 145
Précurseurs Neuronaux	miR-565, 487b, 504, 128a, 128b, 136, 137, 376a, 338, 218, 219, 377, 376a, 127, 124a, 7, 23b, 27b, 582
Précurseurs Neuro-mésenchymateux	miR-623, 584, 629, 630, 765, 671, 638, 663, 801, 769-3p, 452, 451, 206, 370, 490, 486, 492, 493-3p, 513, 494, 575, 572
Précurseurs Astrocytaires	miR-191, 425-5p, 192, 200b, 200a, 29c, 29a, 27a, 24, 23a, 223, 34a, 142-3p, 146b, 22, 21, 221, 222, 155, 148a, 193a, 204, 31, 34b, 210, 193b, 339

**B**



**C**



**Figure 9: Classification des glioblastomes primaires selon leur profil d'expression de microRNAs.**

**A** : Clusters de microRNAs caractérisant les 5 sous-groupes de glioblastomes dans lesquels sont retrouvés des clusters de miRNAs exprimés pendant le développement neural. **B** : Probabilité de survie des patients en fonction des sous-groupes de glioblastomes. **C** : Comparaison de la classification basée sur l'expression des miRNAs et de celle basée sur les mRNAs établies à partir des mêmes tumeurs (Kim et al., 2011b).

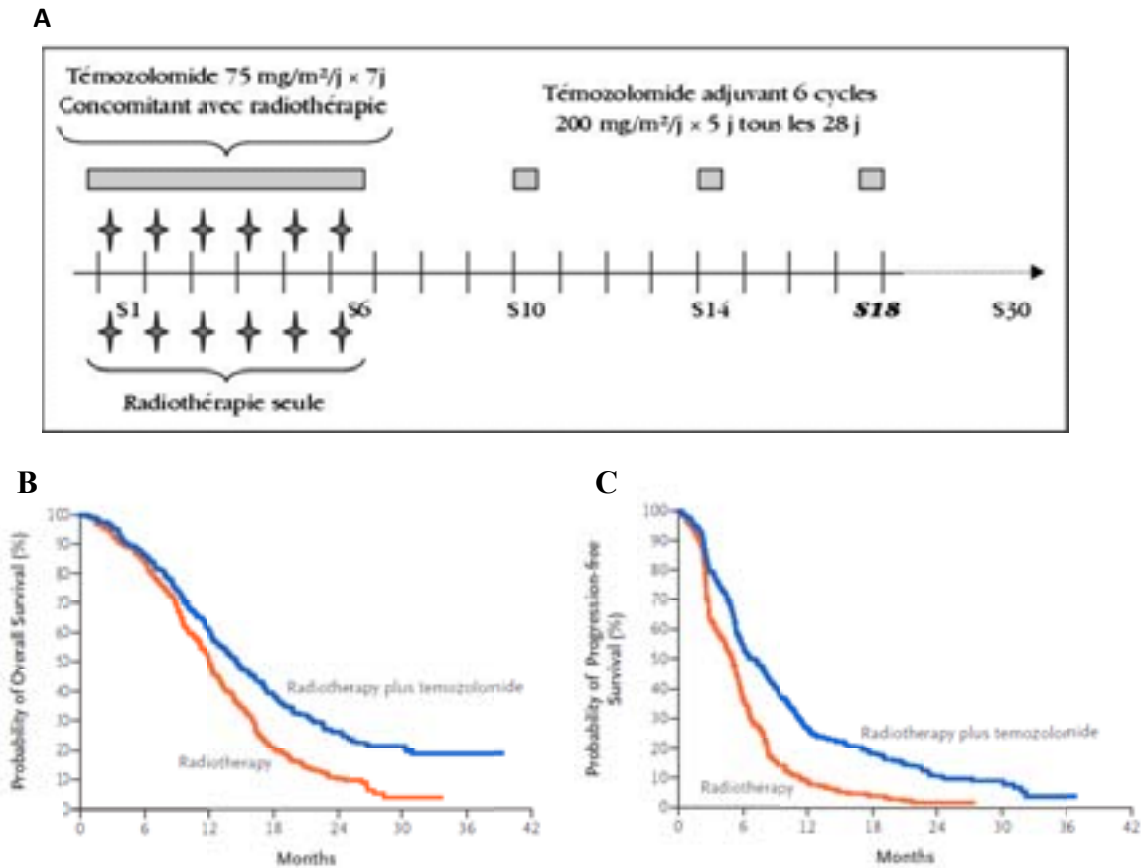
## 2. Traitements des glioblastomes

Le bénéfice de la radiothérapie dans le traitement des glioblastomes a été prouvé dans les années 1970 avec la démonstration de l'augmentation de la médiane de survie avec la radiothérapie focalisée réalisée en préopératoire (Salcman, 1980). L'impact de la chimiothérapie a été évalué par de nombreux essais thérapeutiques, montrant l'efficacité des agents alkylants de l'ADN (Chinot, 2005), dont le Témzolomide (Friedman et al., 2000; Newlands et al., 1997). Cependant, les premiers essais combinant la radiothérapie et chimiothérapie n'ont pas montré d'effet sur l'augmentation de la médiane de survie des patients, et ont relégué l'utilisation de la chimiothérapie au traitement des récurrences (Yung et al., 2000). L'intérêt de la chimiothérapie adjuvante a été relancé par le résultat d'une méta-analyse montrant un bénéfice modeste en termes de médiane de survie et de pourcentage de survivants à long terme (Stewart, 2002), et notamment par la nécessité d'augmenter le nombre de lésions de l'ADN ; les glioblastomes sont en effet des tumeurs particulièrement radio résistantes au cœur d'un organe radio sensible.

### 2.1. Protocole de Stupp

#### 2.1.1. Étapes

Aujourd'hui, le traitement classique des glioblastomes consiste en une résection chirurgicale de la partie la plus importante de la tumeur suivie d'un traitement chimio- et radiothérapeutique, illustré dans la Figure 10A (Stupp et al., 2005). L'agent chimiothérapeutique de référence est le **Témzolomide** (Tmz). Les résultats de l'étude de Stupp montrent une augmentation de la médiane de survie des patients traités par la chimiothérapie concomitante par rapport aux patients traités seulement avec la radiothérapie de 12,1 mois à 14,6 mois (Figure 10B) ainsi qu'une augmentation de la médiane de survie sans progression de 5 mois à 6,9 mois (Figure 10C) ; la probabilité de survie globale à 2 ans passe de 10,4 % à 26,5 %.



**Figure 10: Protocole de Stupp.**

**A** : Protocole appliqué lors de l'étude de phase clinique. **B** : Survie moyenne des patients ayant reçu soit la radiothérapie seule (courbe rouge) soit la radiothérapie combinée à la chimiothérapie par Témzolomide (courbe bleue). **C** : Survie moyenne sans progression de la tumeur (Stupp et al., 2005).

### 2.1.2. Radiothérapie

Les radiations n'agissent pas directement sur l'ADN mais leur interaction avec les molécules intracellulaires provoque des **ionisations** (arrachement d'électrons) ou des excitations (transfert d'électrons sur une couche supérieure) ; les excitations ont peu d'impact sur la cellule mais les ionisations entraînent des réactions physico-chimiques aboutissant à un effet biologique. Les radiations peuvent ainsi provoquer des interactions entre les **électrons** libérés et les molécules intracellulaires, dont l'ADN, ou encore entraîner la production de **radicaux libres** ( $\text{H}_2\text{O}^\circ$ ,  $\text{OH}^\circ$ ,  $\text{H}^\circ$ ,  $\text{HO}_2^\circ$ ) hautement réactifs et interagissant avec l'ADN. L'interaction de ces espèces réactives avec l'ADN entraîne des cassures simple ou double brins de l'ADN ; en cas de non-réparation, les cassures chromosomiques génèrent des aberrations chromosomiques, induisant la mort cellulaire.

### 2.1.3. Mécanisme d'action du Témzolomide

Le Témzolomide est un agent alkylant de l'ADN. Ses propriétés pharmacologiques montrent une excellente biodistribution au niveau du système nerveux central ainsi qu'une grande stabilité à pH acide, permettant son administration orale. Le mécanisme d'action de cette molécule passe par son hydrolyse en MITC (5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazole-4-carboxiamide), molécule plus active mais de faible biodistribution et dont la décomposition spontanée en **ion méthyldiazonium** très réactif s'effectue à pH plus alcalin (Figure 11) ; il n'y a donc qu'une faible fenêtre de pH permettant l'hydrolyse du Tmz en MITC puis en groupement alkylant de l'ADN (Newlands et al., 1997; Stevens et al., 1987). Les tumeurs cérébrales ont un pH plus alcalin que le tissu sain environnant, favorisant de ce fait la génération du métabolite hautement réactif avec l'ADN dans les tissus tumoraux avec une toxicité diminuée dans les tissus sains (Vaupel et al., 1989).

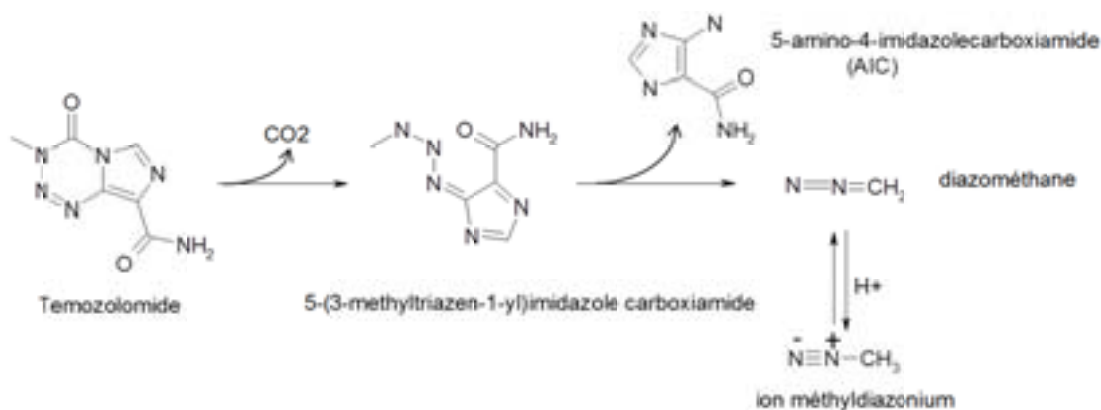
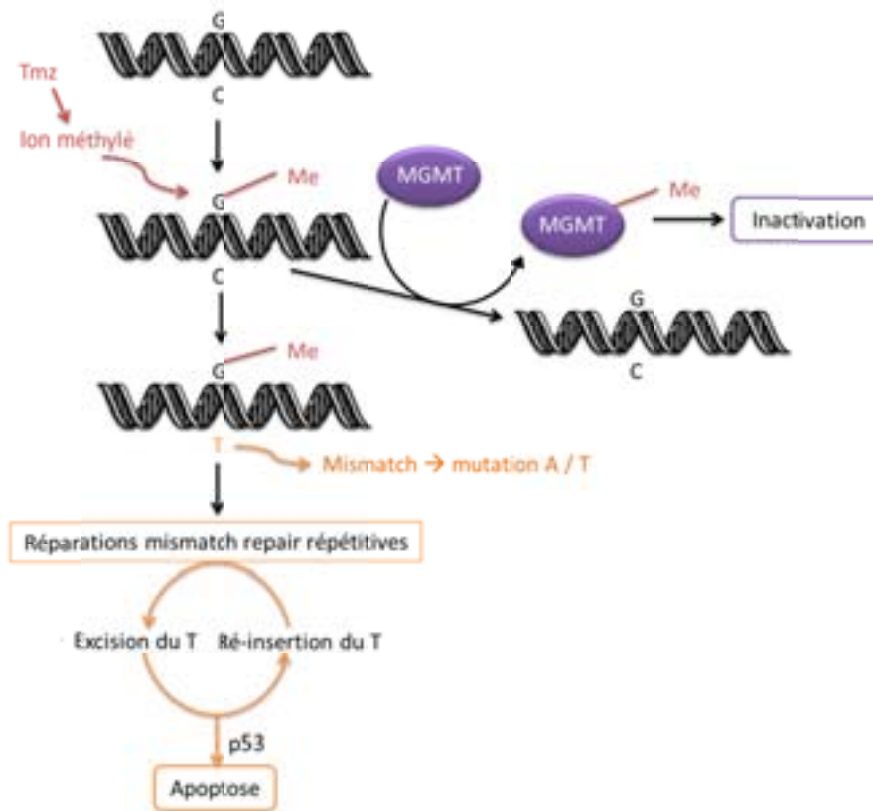


Figure 11 : Structure du Témzolomide et activation de l'ion méthylant.

Les lésions de l'ADN observées suite à l'administration du Tmz sont une méthylation en position  $\text{N}^7$ -guanine (70 %),  $\text{O}^3$ -adenine ou encore  $\text{O}^6$ -guanine (5 %) (Denny et al., 1994). Lors de la réplication de l'ADN, une désoxycytidine ou thymidine est incorporée en face de la liaison, entraînant un mésappariement de bases dans le double brin d'ADN ; en conséquence, lors des réplifications suivantes, le système Mismatch Repair (MMR) excise le morceau d'ADN entourant la base mésappariée et la nouvelle tentative de l'ADN polymérase pour combler ce trou introduit un nouveau mésappariement ; l'activation du système MMR de manière répétitive générant des cassures de l'ADN bloque le cycle cellulaire en phase G2/M (Figure 32) et déclenche l'**apoptose** de la cellule via la protéine p53 (Hirose et al., 2001; Karran et al., 1993) (Figure 12).

Cet effet est renforcé par la diminution du taux d'expression de l'enzyme de réparation de l'ADN **MGMT** (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase) observée suite à l'exposition de la cellule au Tmz : l'élimination du résidu alkyl induit par le Tmz par la MGMT se fait par le transfert de ce groupement depuis la base azotée vers l'enzyme, réduisant ainsi dans un premier temps l'action cytotoxique du Tmz (Olsson and Lindahl, 1980). Cependant, durant ce processus, l'enzyme est inactivée de façon irréversible (Tolcher et al., 2003) (Figure 12).



**Figure 12: Altération de l'ADN et apoptose induites par le Témzolomide.**

L'ion methyldiazonium transfère un groupement méthyle sur les bases guanines de l'ADN, entraînant des mésappariement de bases lors de la réplication. Ce mésappariement entraîne l'intervention répétitive du système mismatch repair et induit l'apoptose de la cellule. La MGMT est capable d'exciser le groupement méthyle des bases guanines de l'ADN, détoxifiant ainsi l'action du Témzolomide (Tmz) ; cependant ceci induit la méthylation de l'enzyme et sa conséquente inactivation.

## 2.2. Autres thérapies

Parmi les molécules chimiques approuvées par la FDA (food and drug administration) dans le traitement des glioblastomes, la **Carmustine** (Figure 13) est autorisée depuis 2002. Il s'agit d'un agent alkylant de l'ADN, généralement appliqué sous forme de patchs disposés lors de l'intervention chirurgicale. Son action est plus faible que le Témzolomide mais est prolongée dans le temps ; cependant l'action combinée du Témzolomide et de la Carmustine ne permet pas d'augmenter la survie des patients (Noel et al., 2012).

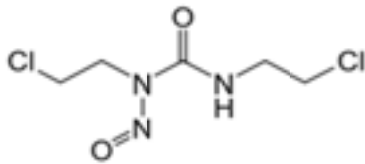


Figure 13 : Structure de la Carmustine.

La Carmustine est également connue sous le nom de BCNU (bis-chloroethylnitrosourea) et ajoute des groupements alkyles en position O<sup>6</sup>-guanine.

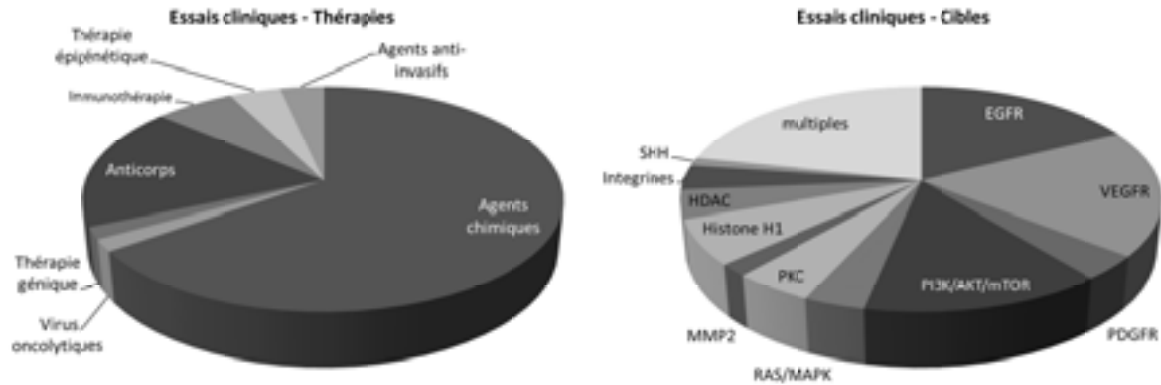
Le **Bevacizumab** (Avastin) est un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF-A (vascular endothelial growth factor A) autorisé depuis 2009 en complément du protocole de Stupp dans le cas des récurrences (Cohen et al., 2009). Cet agent thérapeutique permet d'augmenter la survie sans progression de 6 mois (Nagpal et al., 2011) et est actuellement testé dans plusieurs essais cliniques pour son utilisation dans le cas de glioblastomes nouvellement diagnostiqués (Narayana et al., 2012).

Actuellement, plus de 700 essais cliniques sont répertoriés sur les glioblastomes (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=glioblastoma>). La plupart de ces molécules est utilisée dans le but d'inhiber les voies de signalisation de survie cellulaire ou les voies anti-apoptotiques ; les anticorps monoclonaux ou inhibiteurs chimiques de la voie RTK/RAS/PI3K constituent la majeure partie des agents thérapeutiques utilisés (Figure 14). En particulier, deux inhibiteurs du domaine à activité tyrosine kinase de l'EGFR (**Erlotinib** et **Gefitinib**) ont été développés ; cependant, les essais cliniques sont décevants puisqu'aucune de ces molécules utilisées en monothérapie ne montre de bénéfice sur la survie des patients. De plus, l'inhibition de l'EGFR induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, rendant de ce fait les cellules moins sensibles au Tmz et aux radiations dans le cas de thérapies combinées. D'autres molécules ont été développées en tant qu'inhibiteurs d'AKT ou mTOR mais elles ne montrent que peu d'efficacité et induisent même une suractivation de la boucle PI3K/AKT par rétrocontrôle (O'Reilly et al., 2006). La plupart des essais cliniques se basant sur une



monothérapie chimique ne montre que très peu d'amélioration de la survie des patients par rapport au traitement de référence et des thérapies combinant plusieurs cibles se développent.

A côté des thérapies classiques utilisant des agents chimiques, des thérapies biologiques se développent à travers les anticorps monoclonaux, la virothérapie, l'immunothérapie, les thérapies génique et épigénétique (Figure 14).



**Figure 14: Essais cliniques sur les glioblastomes.**

Les essais cliniques sont classifiés selon le type de thérapie (gauche) ou selon le type de cible (droite). Graphiques réalisés à partir de (Arko et al., 2010).

### 3. Le dogme des Cellules Souches Cancéreuses

La capacité à cibler des voies de signalisation spécifiques des cellules tumorales tout en diminuant la toxicité du traitement pour les cellules saines voisines est au cœur de la recherche contre le cancer. Cette stratégie suppose de cibler les bonnes cellules alors que de plus en plus de tumeurs sont rapportées comme contenant des « cellules souches cancéreuses » (cancer stem cells ou CSCs) résistantes aux thérapies actuelles. Ces cellules ne représenteraient qu'un faible pourcentage de la masse tumorale, mais seraient responsables de nombreuses rechutes de cancer. En effet, les traitements actuels ciblent les cellules tumorales « normales » constituant l'essentiel de la masse tumorale alors que des cellules résistantes, capables de régénérer la tumeur sont épargnées. Ces cellules seraient par la suite capables de régénérer la tumeur dans son ensemble malgré les thérapies actuelles (Figure 15) (Reya et al., 2001).

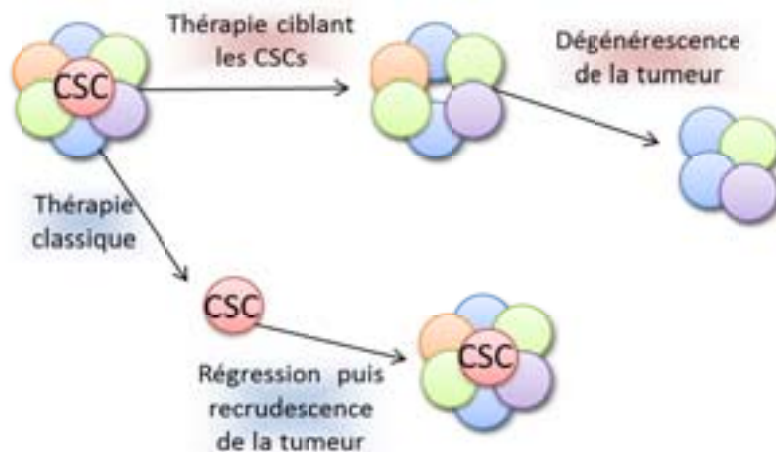


Figure 15: Régénération de la tumeur par les cellules souches cancéreuses.

D'après (Reya et al., 2001).

## II. Cellules propagatrices de tumeur

Les glioblastomes, ainsi que de nombreuses autres tumeurs, sont constitués de populations cellulaires très hétérogènes aussi bien sur le plan histologique que moléculaire. La majeure partie de ces cellules, formant la masse tumorale, est différenciée alors qu'une faible proportion de cellules a des capacités d'auto-renouvellement importantes, de différenciation à travers des divisions asymétriques et de régénération de la tumeur dans sa globalité. Le terme de cellules souches cancéreuses (ou cancer stem cells CSCs) a été défini en référence aux propriétés que partagent ces cellules tumorales avec les cellules souches normales. Ces cellules ont parfois pu être considérées comme les cellules initiatrices de la tumeur ; dans ce mémoire, nous considérerons que le terme de cellules souches tumorales se rapporte à une population clonale de cellules malignes permettant de propager la tumeur, responsables de la génération de l'ensemble de la masse tumorale et devant être éradiquées pour permettre la rémission du patient. Les CSCs seront considérées ici comme des cellules à caractère souche et propagatrices de la tumeur.

### 1. Historique : mise en évidence et isolation de cellules tumorigéniques

#### 1.1. Fin XIXe siècle

Le concept des cellules souches ou inductrices de cancer a été proposé pour la 1<sup>ère</sup> fois il y a 150 ans environ (1874), mais ce n'est que récemment que les avancées en biologie cellulaire ont pu étoffer cette hypothèse (Wicha et al., 2006).

Au milieu du XIXe siècle, Virchow nota la ressemblance histologique des tissus de tératocarcinomes avec les tissus fœtaux et émit l'hypothèse d'une relation entre les 2 tissus (Virchow, 1855). Peu de temps après, Cohnheim et Durante postulèrent que les cancers se développent à partir de rudiments embryonnaires présents dans des organes matures (Cohnheim, 1875; Durante, 1874; Rotter, 1921). En 1941, les tératocarcinomes ont été définis comme des structures malignes contenant plusieurs types de cellules différenciées ainsi que des cellules non différenciées, suggérant la présence de **cellules tumorales multipotentes** (Jackson and Brues, 1941). Il y a 50 ans, l'hypothèse de cellules souches tissue-spécifiques à l'origine des cancers a été avancée (Till and Mc, 1961), et 6 ans plus tard celle selon laquelle

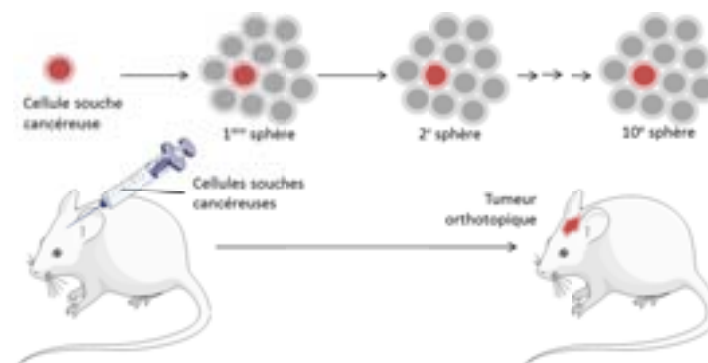
les tumeurs représentent une maturation arrêtée des cellules souches (Pierce, 1967). Deux propriétés importantes des cellules cancéreuses ont permis de faire émerger ces concepts :

- Les tumeurs émergent dans n'importe quel tissu où l'on peut trouver des cellules souches (ou leurs progéniteurs immédiats)
- Les tumeurs contiennent des composants cellulaires qui leur confèrent des propriétés de cellules souches essentielles : **auto-renouvellement** (moteur de la cancérisation), **différenciation** (hétérogénéité cellulaire)

La présence de populations cellulaires ayant des propriétés de cellules souches au sein de la tumeur a également été suggérée par des essais clonogéniques mettant en évidence des sous-populations de cellules tumorales ayant une capacité de prolifération importante, capables de former des **clones** *in vitro* (Hamburger and Salmon, 1977; Kleinsmith and Pierce, 1964) et *in vivo* (Bruce and Van Der Gaag, 1963; Furth and Kahn, 1937). Ceci est appuyé par la découverte d'une **hiérarchie cellulaire** dans les tumeurs (Pierce and Wallace, 1971).

Depuis l'apparition du concept, la définition des CSCs a très peu changé : il s'agit d'une cellule tumorale ayant des capacités de propagation de tumeur à travers l'auto renouvellement et la différenciation, par opposition à la majorité des cellules tumorales qui sont plus différenciées et ne possèdent pas ces propriétés.

La mise en évidence des CSCs repose sur la capacité d'une de ces cellules à reformer la tumeur originelle (hétérogénéité et caractéristiques phénotypiques) après transplantation dans un modèle animal ainsi que sur sa capacité d'auto renouvellement *in vitro* (Figure 16).



**Figure 16 : Mise en évidence des cellules souches cancéreuses.**

Les cellules souches cancéreuses sont définies fonctionnellement comme capables de s'auto-renouveler et de former des clones *in vitro* ainsi que de pouvoir renouveler la tumeur originelle dans sa globalité après transplantation. Schéma réalisé à l'aide de *Servier Medical Art*.

### 1.2. Tumeurs liquides

En 1994, le groupe de Dick montre que la **leucémie myéloïde sévère** est organisée de façon hiérarchique à partir d'une cellule hématopoïétique primaire et identifie pour la première fois des CSCs par transplantation dans des souris immunodéficientes. Ces cellules comptent pour 0,01 à 1 % des cellules tumorales et sont caractérisées par le phénotype  $CD34^+CD38^-$  (Bonnet and Dick, 1997; Lapidot et al., 1994).

### 1.3. Tumeurs solides

En 2003, le groupe de Clarke adapta au **cancer du sein** les méthodes utilisées pour identifier les CSCs des leucémies et mit en évidence une sous-population de cellules cancéreuses (cellules  $CD44^+/CD24^{-/lo}$ ) capables de régénérer la tumeur dans des souris NOD-SCID immunodéficientes ; une centaine de CSCs sont suffisantes pour régénérer la tumeur dans le cadre d'une xénogreffe alors que plusieurs dizaines de milliers de cellules de la masse tumorale n'en sont pas capables (Al-Hajj et al., 2003).

En 2004, le groupe de Dirks identifia pour la première fois des CSCs dans les **tumeurs du système nerveux central**, capables de former des neurosphères et de régénérer la tumeur par transplantation orthotopique dans des souris immunodéficientes ; ces cellules sont caractérisées par le marqueur  $CD133^+$  (prominine 1) (Singh et al., 2003; Singh et al., 2004). Des cellules ayant les propriétés des CSCs ont été identifiées dans la plupart des tumeurs du système nerveux central, incluant les **gliomes**, les **médulloblastomes** et les **épendymomes** (Galli et al., 2004; Hemmati et al., 2003; Ignatova et al., 2002; Singh et al., 2004; Yuan et al., 2004).

L'isolation de ces cellules se fait à partir de biopsies de tumeurs coupées en fragments de  $1\text{ mm}^3$  ; les cellules sont dissociées et mises en culture dans du milieu de culture de croissance des cellules souches neurales, sans sérum, auquel sont ajoutés des facteurs de croissance dont l'EGF (epithelial growth factor) et le bFGF (basic fibroblast growth factor). Les neurosphères formées sont isolées, dissociées, remises en culture dans les mêmes conditions et ainsi de suite pendant plus de 50 passages jusqu'à obtenir une population constituée uniquement de cellules clonogéniques (Figure 17).



**Figure 17 : Isolation de cellules souches cancéreuses à partir de biopsies de tumeurs solides.**

Les morceaux de biopsie tumorale sont mis en culture avec des agents mitogènes. Après plusieurs cycles de dissociation de ces cellules et de prolifération, on obtient des « lignées cellulaires » ne contenant que des cellules souches cancéreuses.

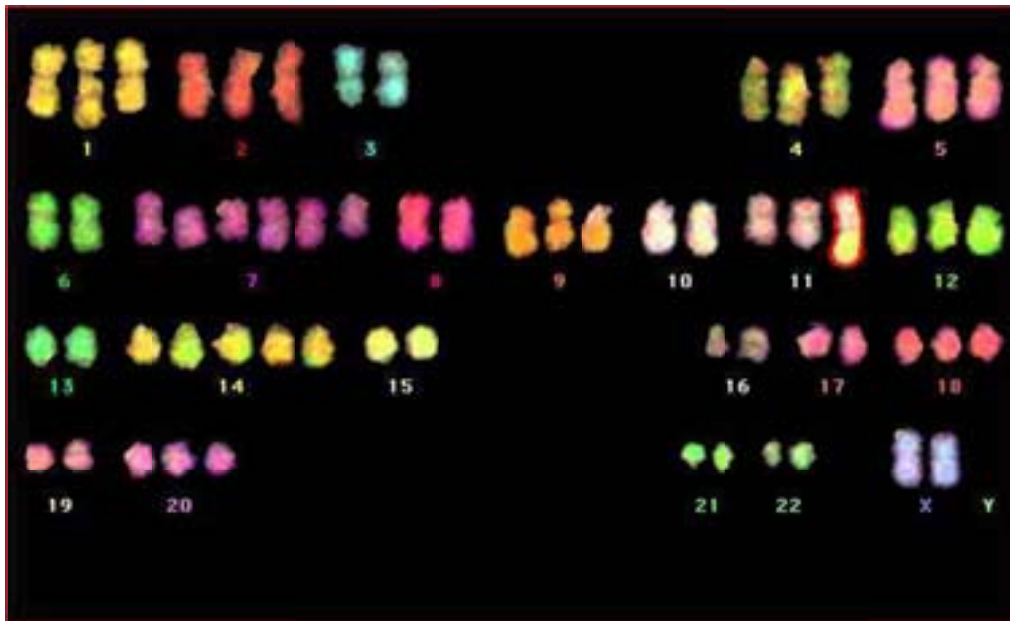
Depuis, des cellules inductrices de tumeur ont été identifiées dans les cancers du **pancréas** (Li et al., 2007), du **cou** (Prince et al., 2007), de la **prostate** (Sadri-Ardekani et al., 2009), du **côlon** (O'Brien et al., 2007) et de la **peau** (mélanomes) (Quintana et al., 2008).

Dans les différents essais menés pour isoler les CSCs et démontrer leurs propriétés, la tumorigénicité des cellules transplantées dans l'hôte dépend des conditions d'isolation des cellules de la tumeur et de la nature de l'hôte immunodéprimé. La fréquence des cellules tumorigéniques peut varier en fonction du type de tumeur et du système expérimental utilisé, allant de moins de 1 % dans les leucémies et pouvant atteindre 20 à 25 % dans les tumeurs solides (Quintana et al., 2008; Visvader and Lindeman, 2008). Cependant, certaines de ces études étudient le potentiel tumorigénique de cellules tumorales obtenues à partir de biopsies sans (ou avec peu) de culture *in vitro* intermédiaire sur le seul critère de la présence d'un marqueur ; il est fort probable dans ce cas que des cellules tumorales n'ayant pas de caractère « souche » forment des tumeurs lors de xénotransplantations. L'une des caractéristiques des CSCs est leur capacité à être maintenues en culture pendant un nombre « infini » de passages, contrairement aux cellules mortelles qui ne dépassent pas une cinquantaine de passages ; l'un des moyens de s'assurer de la présence de CSCs dans une population de cellules est donc d'effectuer des passages *in vitro* avant la xénotransplantation. Dans ce cas, la proportion de CSCs des tumeurs solides est proche de 1 %.

## 2. Caractérisation des cellules propagatrices de glioblastome

### 2.1. Génotype très instable / phénotype à peu près stable

L'analyse chromosomique des cellules propagatrices de glioblastome (**gCSC**) montre un caryotype à 62 chromosomes, comportant à la fois des gains et des pertes de parties de chromosomes. Globalement, on observe des gains au niveau des chromosomes 1q, 5, 7, 9q, 12 et 14 et des pertes au niveau des chromosomes 9p et 18q (Figure 18).



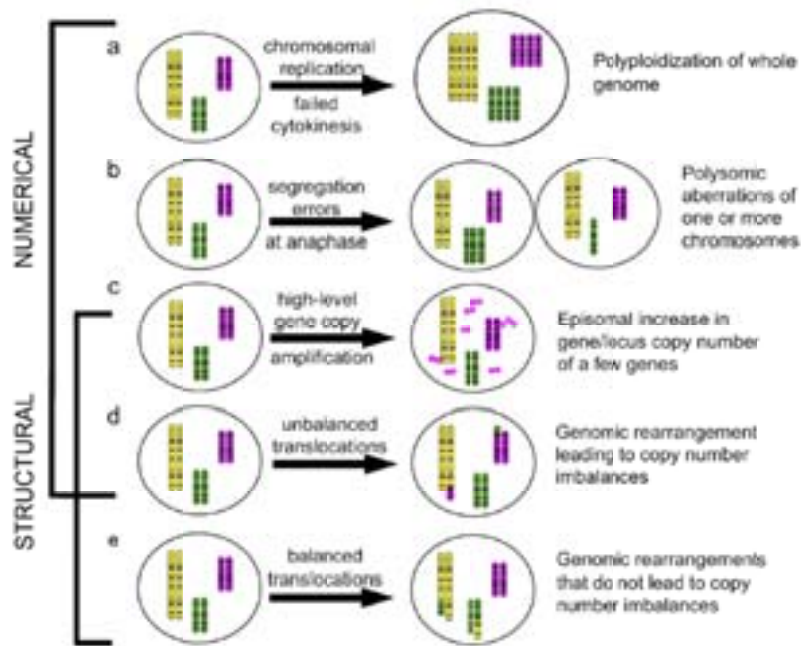
**Figure 18 : Analyse du caryotype des cellules propagatrices de glioblastome.**

L'analyse chromosomique de cellules TG01 par Multi FISH révèle une hypotriploïdie avec une surreprésentation des chromosomes 7 et 14 (Patru et al., 2010).

Contrairement aux cancers hématologiques ayant un caryotype proche de la diploïdie, de nombreuses tumeurs solides ont des cellules avec un caryotype oscillant entre la triploïdie et la tétraploïdie (Bayani and Squire, 2007). Ceci implique des mitoses avec des erreurs de ségrégation, intervenant soit au moment de la réplication de l'ADN, de l'attachement à l'appareil spindal, de l'alignement le long de la plaque métaphasique, de la ségrégation, de la migration aux pôles cellulaires ou de la cytokinèse. Dans une cellule normale, ces erreurs mitotiques poussent la cellule à l'apoptose via l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. La transformation maligne de la cellule lui confère la capacité d'échapper aux voies de signalisation apoptotiques et de conserver les anomalies mitotiques. La duplication de centrosomes a été observée dans de nombreux cancers et résulte en une ségrégation inégale du

matériel génomique (Doxsey, 2002; Kops et al., 2005; Nigg, 2002). Les changements de la ploïdie des cellules sont imputés à une absence de cytokinèse, générant ainsi une cellule tétraploïde.

Les tumeurs diploïdes subissent souvent des réarrangements chromosomiques numériques et structuraux avant la tétraploïdisation (Figure 19), résultant en des tumeurs hétérogènes et cytogénétiquement complexes, classées en termes numériques en tant que presque tétraploïde ou pseudo triploïde (Bayani et al., 2007).



**Figure 19 : Acquisition d'aberrations chromosomiques numériques et/ou structurelles.**

La cellule normale (gauche) est représentée avec 3 paires de chromosomes. **(a)** Absence de cytokinèse après la réplication des chromosomes, résultant en une cellule tétraploïde (4n). **(b)** Erreurs de ségrégations pendant l'anaphase, résultant en 2 cellules filles polysomiques, l'une ayant 1 copie et l'autre 3 copies pour l'un des chromosomes. **(c)** Amplification par 'double minute' de quelques gènes par altération structurale résultant en une augmentation épisomique du nombre de copies de quelques gènes. **(d)** Altération structurale générant 2 translocations non compensées ; cette altération est également numérique étant donné que l'altération n'est pas réciproque. **(e)** Translocation structurale compensée, sans changement du nombre de copies d'ADN. Schéma d'après (Bayani et al., 2007).

## 2.2. Altération de voies de signalisation

Les cellules souches normales et tumorales partagent plusieurs voies de signalisation impliquées dans la prolifération, le maintien de l'état différencié ou encore la résistance à l'apoptose ; dans le cas des CSCs, ces voies de signalisation sont souvent altérées (en général par une surexpression). Parmi les principales voies de signalisation concernées, on trouve la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, la voie Sonic Hedgehog et la voie Notch (Figure 20).



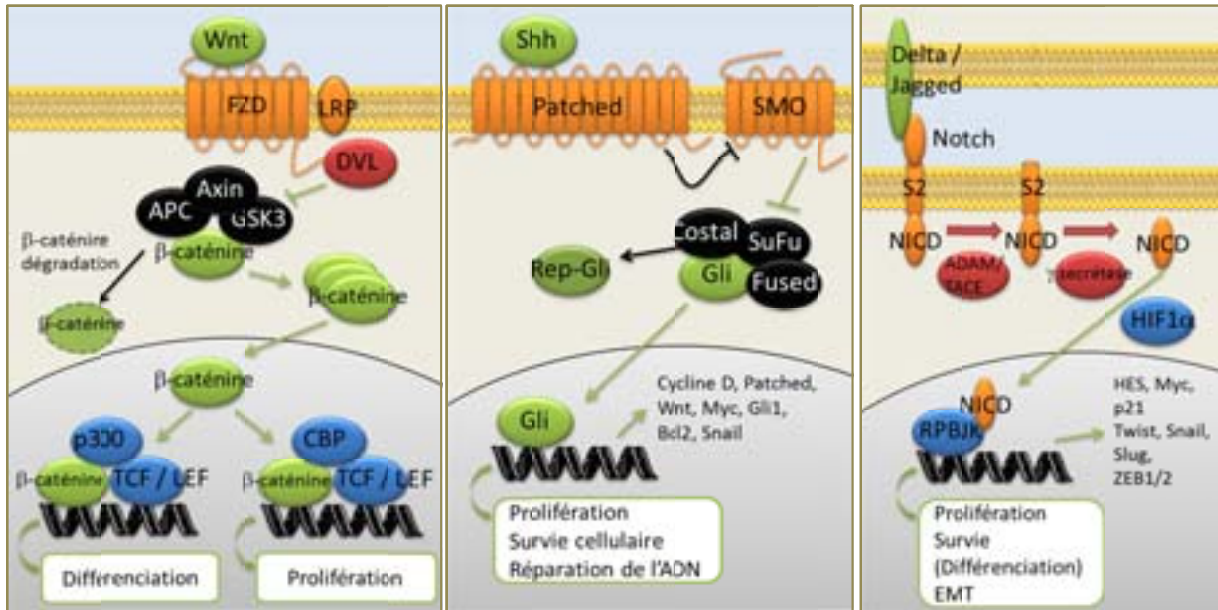


Figure 20 : Voies de signalisation altérées dans les gCSCs.

**Voie Wnt/β-caténine.** La liaison de Wnt au récepteur Frizzled (FZD) associé au corécepteur LRP active la protéine Dishevelled (DVL) qui inhibe le complexe protéique destructeur (GSK3 : glycogène synthase kinase 3, APC, Axine) auquel est associée la β-caténine (flèches noires). La β-caténine migre dans le noyau et s'associe au facteur de transcription LEF/TCF (lymphoid enhancer binding factor) et à CBP (cyclique AMP response element binding protein) ou p300 pour induire l'expression de gènes (flèches vertes) impliqués dans la différenciation, la survie et la prolifération cellulaires. **Voie Sonic-Hedgehog.** En absence d'activation (flèches noires), les facteurs de transcription Gli sont complexés à Costal2, Fused et SUFU (suppresseur de Fused), induisant la dégradation de Gli3 et la formation d'un répresseur de la transcription Rep-Gli2. La liaison de Sonic Hedgehog (Shh) sur le récepteur Patched induit la levée de l'inhibition de Smoothened (SMO) et la libération des facteurs de transcription Gli qui migrent dans le noyau (flèches vertes). Parmi les gènes activés, Myc est impliqué dans la prolifération et l'inhibition de la différenciation, Bcl2 dans la survie cellulaire, les cyclines dans la régulation du cycle cellulaire. **Voie Notch.** Suite à la liaison de l'un de ses ligands (Delta ou Jagged) sécrétés par une cellule voisine, le domaine intracellulaire (NICD) de Notch est libéré dans le cytoplasme par des métalloprotéases (ADAM/TACE) et γ-sécrétases. NICD, transloque dans le noyau et s'associe au facteur de transcription RBPJK (recombinant signal-binding protein for immunoglobulin kappa J region), induisant l'expression de gènes dont HES (hairy and enhancer of split), Myc et p21 impliqués dans la prolifération, la survie cellulaires et l'inhibition des gènes de différenciation. La présence de HIF1α en conditions hypoxiques, inhibe la transcription des gènes de différenciation et induit l'expression de gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).

### 2.2.1. Sonic Hedgehog (Shh)/Gli

La voie de signalisation de Shh est impliquée dans la prolifération et la survie cellulaires au cours du développement neural de l'embryon. En absence de ligand Shh, les facteurs de transcription Gli sont complexés à Costal2 (kinésine), Fused (sérine thréonine kinase) et SUFU (suppresseur de Fused), induisant la protéolyse de Gli en une forme répressive de la transcription. La liaison des glycoprotéines Shh sur le récepteur membranaire induit la levée de l'inhibition de Smoothened par Patched et la libération des facteurs de transcription Gli du complexe protéique inhibiteur (Onishi and Katano, 2011; Pan et al., 2006) (Figure 20). La voie de signalisation Shh est impliquée dans la progression des tumeurs, notamment via la

surexpression des facteurs Gli, et maintient les gCSCs dans un état indifférencié et invasif (Clement et al., 2007).

### 2.2.2. Notch

Suite à un contact intercellulaire, le récepteur Notch est activé par la liaison d'un ligand Delta-like (Dll 1, 3 et 4) ou Jagged (Jag 1 et 2), induisant la libération de la partie intracellulaire du récepteur NCID (Notch intracellular domain) dans le cytoplasme et sa translocation au noyau. NCID s'associe dans le noyau avec des facteurs de transcription, induisant l'expression de gènes parmi lesquels certains sont impliqués dans l'auto-renouvellement, la survie cellulaire et l'inhibition de la différenciation des cellules souches neurales et progénitrices en cellules neurales (Lathia et al., 2008) (Figure 20). En condition hypoxique, HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 alpha) interagit avec NCID et inhibe la transcription des gènes de différenciation (Gustafsson et al., 2005). Une signalisation aberrante de Notch a été identifiée dans de nombreux cancers, dont les glioblastomes (Kanamori et al., 2007) ; dans les gCSCs, l'activation de Notch permet le maintien d'un état indifférencié, pluripotent et d'auto-renouvellement (Zhang et al., 2008b) et favorise la tumorigénicité *in vivo*, notamment par l'activation de gènes impliqués dans la survie cellulaire, la mobilité et l'angiogenèse (Fan et al., 2010), ainsi que dans la transition épithéliamo-mésenchymateuse (voir point II-2.4, page 39) (Wang et al., 2010c).

### 2.2.3. Wnt / $\beta$ -caténine

Les cascades de signalisation induites par la fixation de Wnt sur son récepteur Frizzled (FZD) dépendent du corécepteur associé : les corécepteurs LRP5 et LRP6 contrôlent la voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine impliquée dans le devenir de la cellule et les corécepteurs ROR2 et RYK la voie non canonique gérant les mouvements cellulaires et la polarité des tissus ; à ce jour 19 protéines Wnt et 10 récepteurs Frizzled ont été identifiés (Katoh, 2007). Dans la voie canonique et en absence de Wnt, la  $\beta$ -caténine est associée à un complexe multiprotéique de destruction, phosphorylée, ubiquitinée et dégradée par le protéasome. La liaison de Wnt à son récepteur (FZD – LRP5/LRP6) libère la  $\beta$ -caténine qui s'associe dans le noyau avec p300 ou CBP (cyclic AMP response element binding protein) pour agir en tant que facteur de transcription sur des gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires (Figure 20). L'étude des composants nucléaires d'échantillons de glioblastome de

type mésenchymateux de *The Cancer Genome Atlas* a corrélé une forte activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine avec une durée de vie plus faible des patients (Cooper et al., 2012). La suractivation de cette voie de signalisation dans les gCSCs et l'accumulation de  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme sont responsables du caractère souche des cellules, de leur invasivité via l'induction d'une transition épithéliamo-mésenchymateuse (voir point II-2.4, page 39) (Jin et al., 2011; Zhao et al., 2011) ou encore de la tumorigénicité des cellules *in vivo* (Pulvirenti et al., 2011).

### 2.3. Modifications épigénétiques

Les mécanismes épigénétiques sont de très puissants régulateurs de l'expression de gènes et du cycle cellulaire, de la survie de la cellule. Ces mécanismes permettent également à une population de cellules d'acquérir une grande variabilité phénotypique et de s'adapter aux changements microenvironnementaux.

#### 2.3.1. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN sur des résidus cytosines dans les îlots CpG est l'un des mécanismes de répression de gènes les mieux caractérisés. Les îlots CpG ont en moyenne une longueur de 1 kb et contiennent 5 fois plus de CpGs que le reste du génome ; ces séquences sont estimées à 30 000 environ et représentent 7 % de l'ensemble des CpGs (Rollins et al., 2006). Les promoteurs contenant une forte densité de CpGs sont couramment associés à des gènes du développement (Saxonov et al., 2006). La plupart des CpGs ne sont pas méthylés dans les tissus sains, excepté au niveau du chromosome X inactif ou de façon tissu spécifique.

L'**hyperméthylation** de certains îlots CpG dans les cancers est associée avec la répression de gènes suppresseurs de tumeurs (Baylin and Herman, 2000). Dans les gCSCs, certains promoteurs de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'invasion, l'angiogenèse et la résistance aux substances chimiques sont fréquemment hyperméthylés, et donc inactifs ; la méthylation de MGMT (O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase) est associée à un meilleur pronostic pour les patients traités par radiothérapie et par l'agent alkylant de l'ADN, le Témzolomide (Hegi et al., 2005).

Parmi ces gènes hyperméthylés, une forte proportion est régulée par une chromatine ambivalente dans les cellules embryonnaires (Easwaran et al., 2012). La **structure ambivalente** de la chromatine est définie par de l'ADN non méthylé mais portant à la fois des marques répressives (marque H3K27me3, voir paragraphe suivant) et inductrices (marque H3K4me2/me3) de la transcription de gènes ; ceci induit une très faible expression des gènes cibles. Dans les cellules embryonnaires, ce type de régulation est identifié au niveau des gènes du développement et permet de maintenir les caractéristiques « souche » et d'autorenouvellement des cellules, inhibe l'expression des gènes de différenciation. Dans les cellules tumorales, l'hyperméthylation induit une conformation de la chromatine répressive beaucoup plus importante que la structure ambivalente ; cette hyperméthylation est observée au niveau de nombreux gènes intervenant dans la régulation du développement et confère une signature de cellules souches aux cellules tumorales concernées (Easwaran et al., 2012).

La méthylation de l'ensemble du génome est inférieure à 50 % dans les glioblastomes primaires (contre 75 % dans les tissus sains du cerveau) (Cadieux et al., 2006). L'**hypométhylation** peut en effet contribuer à la tumorigénicité de la cellule par l'activation d'oncogènes, la perte d'empreinte parentale (perte de la régulation monoallélique normalement conférée par la méthylation spécifique de l'ADN parental lors de la réplication de l'ADN) (Holm et al., 2005) et le non-masquage d'éléments répétitifs (environ 45 % du génome, plus d'1/3 des méthylations de l'ADN dans les tissus sains), source d'instabilité génomique et d'altération structurelle des régions chromosomiques adjacentes (Eden et al., 2003). En particulier, la déméthylation de **Sat2**, proche du centromère du chromosome 1, prédispose à des cassures du chromosome et à une altération du nombre de copies de l'euchromatine adjacente (gains ou pertes) (Cadieux et al., 2006; Fanelli et al., 2008). L'étude de l'expression de **Sox2** dans les gCSCs et échantillons de glioblastomes montre une amplification du locus de Sox2 (3q26.33) dans 10 % des cas environ mais surtout une hypométhylation du promoteur dans 100 % des cas, suggérant que cette hypométhylation est le principal facteur de la surexpression de Sox2 (Alonso et al., 2011). L'hypométhylation du promoteur de Sox2 dans les gCSCs et les lignées de glioblastomes confère, de la même façon que dans les cellules souches, des propriétés d'auto-renouvellement et d'inhibition de la différenciation cellulaire.

La modification de l'expression des **ADN méthyltransférases** (DNMTs), notamment la surexpression de DNMT1 et la sous-expression de DNMT3a, serait à l'origine des aberrations

de méthylation de l'ADN. En effet, l'induction de l'expression de DNMT3a dans des cellules de glioblastome permet de retrouver quasi totalement des niveaux de méthylation normaux, dont celui de Sat2 ; par contre, la perte de DNMT3a n'engendre pas forcément la déméthylation de Sat2. Ces effets seraient dus à une faible expression de DNMT3a pendant la période post natale alors qu'une augmentation de cette expression dans les progéniteurs neuronaux est nécessaire au bon développement du système nerveux central ; la méthylation incomplète des régions péri-centromériques créerait des instabilités dans l'ADN génomique et l'héritage de ces anomalies serait amplifié dans les cellules progénitrices neurales avec l'accumulation de nouvelles altérations génétiques. Ces modifications pourraient être à l'origine de la cellule initiatrice de glioblastome à l'âge adulte (Fanelli et al., 2008).

### 2.3.2. Méthylation des histones

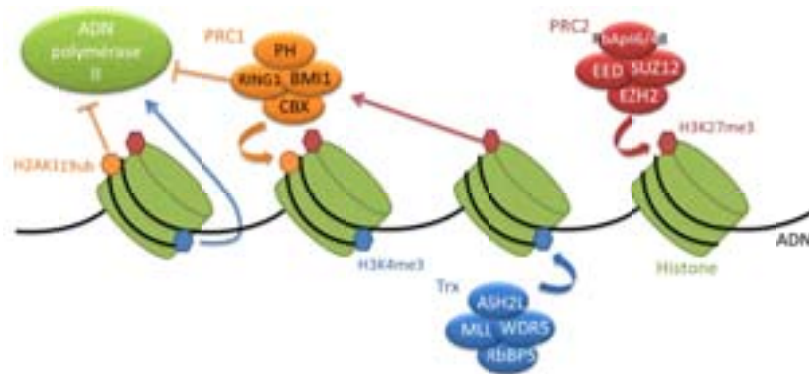
Les protéines **Polycomb** sont regroupées en complexes répressifs (PRC1 et PRC2), induisant la triméthylation des histones H3 au niveau de la lysine 27 et l'inhibition de la transcription. Les complexes PRC contribuent ainsi à la répression de la pluripotence et à la définition du potentiel développemental de cellules progénitrices du système nerveux central (Sparmann and van Lohuizen, 2006) ; 75 % des sites de méthylation de l'ADN sont occupés par des complexes Polycomb dans les cellules souches et progénitrices adultes. Dans les glioblastomes, l'expression aberrante des gènes *polycomb* (en particulier *Bmi-1* et *EZH2*) inhibe la différenciation et les gènes suppresseurs de tumeurs, active les gènes impliqués dans la transformation et l'invasion et active la prolifération des gCSCs (Dimov et al., 2011).

**EZH2** est le composant principal du complexe Polycomb 2, inhibant la transcription de gènes par la triméthylation des lysines 27 et 9 des histones H3 (Figure 21). Dans les cellules souches embryonnaires, des promoteurs de gènes cibles des complexes Polycomb sont occupés par les facteurs de transcription Oct-4, Sox-2 et Nanog, essentiels dans le maintien de l'état pluripotent des cellules (Lee et al., 2006b) ; dans les cellules différenciées, la triméthylation H3K27 est retrouvée dans les régions promotrices de gènes du développement. Dans les cellules tumorales, parmi les gènes réprimés on trouve des gènes suppresseurs de tumeur, dont les gènes CDKN2A et CDKN2B codant pour p14 (ARF), p15 (INK4B) et p16 (INK4A) (Gil and Peters, 2006; Kotake et al., 2007) ou les gènes *casz1*, *clu*, *runx3* et *ngfr* récemment identifiées comme gènes suppresseurs de tumeur dans les neuroblastomes (Wang et al., 2012).

L'inhibition de EZH2 inhibe l'autorenouvellement des cellules gCSCs *in vitro* et la formation de tumeurs *in vivo* (Suva et al., 2009).

**Bmi-1** fait partie du complexe PRC1 catalysant la monoubiquitination des histones H2A au niveau de la lysine 119 (Figure 21); dans les tissus sains, cette modification épigénétique est retrouvée sur environ 10 % des histones H2A. Bmi-1 réprime les voies de signalisation alternatives de suppression de tumeur qui tentent de compenser les délétions de *INK4a/ARF/P53* et l'hyperactivation de la voie de signalisation PI3K/AKT (Bruggeman et al., 2007). La diminution du taux d'expression de Bmi-1 dans des cellules de glioblastome inhibe leur prolifération et réduit l'auto-renouvellement des gCSCs (Abdouh et al., 2009; Godlewski et al., 2008).

Les **complexes Trithorax** sont également impliqués dans la tumorigénicité. Ces protéines laissent, de la même façon que les groupes Polycomb, des marques sur les histones (H3K4me3) mais celles-ci sont liées à l'activation de la transcription et non plus à la répression (Figure 21) (Schuettengruber et al., 2007).



**Figure 21 : Modifications épigénétiques : méthylation des histones.**

Le complexe PRC2 induit la méthylation de H3K27, ce qui permet de recruter le complexe PRC1 via les protéines CBX. PRC1 transfère un résidu monoubiquitine sur H2AK119 : PRC1 interprète les modifications établies par PRC2 pour les gènes qu'ils ont en commun en inhibant l'activation de l'ADN polymérase II à la fois par le complexe PRC1 lui-même et par les marques H2AK119ub. Les complexes Trithorax sont responsables de la méthylation de H3K4, marque d'activation de l'ADN polymérase II. PRC: Polycomb repressive complex, EZH2: enhancer of zeste (histone méthyltransferase), SUZ12: suppressor of zeste 12, EED: embryonic ectoderm development protein, CBX: chromobox homolog, RING1: ring finger protein 1, Bmi1: homolog of leukemia viral murine Bmi-1 oncogene, PH: polyhomeotic like, ASH2L: drosophila absent small or homeotic discs 2-like, MLL: myeloid/lymphoid or mixed lineage leukemia gene, WDR5: WD repeat containing protein 5, RbBP5: retinoblastoma binding protein 5. Schéma adapté de (Richly et al., 2011).

### 2.3.3. Acétylation des histones

L'acétylation des histones au niveau des lysines est catalysée par les histone acetyl transférase (**HATs**), résultant en une diminution de la charge nette positive des lysines et se



traduisant en une diminution de l'affinité des histones pour l'ADN et en une facilitation de la liaison de médiateurs de la transcription (Shukla et al., 2008). Parmi les sites d'acétylation identifiés, on trouve notamment la position H3K56, associée à l'apoptose et la réparation de l'ADN et corrélée à un état dédifférencié ; certaines positions sont à la fois sujettes à la méthylation et l'acétylation (H3K9, H3K27) (van Vlerken et al., 2012).

Tout comme la méthylation, l'acétylation des histones est un processus réversible catalysé par des histone désacétylases (**HDACs**), inhibant la liaison de facteurs de transcription. Cependant, ces enzymes ont également un rôle en tant que cofacteurs de transcription en interaction avec les facteurs E2f, Stat3, p53, Rb, NF- $\kappa$ B, ... (Ropero and Esteller, 2007). Les enzymes HDACs de classe I, HDAC1 et HDAC2, jouent un rôle clé dans le développement et sont surexprimées dans les tissus tumoraux. Ces deux protéines sont impliquées dans l'inhibition de l'apoptose des cellules tumorales (Marchion et al., 2009) et induisent notamment l'accumulation de H3K56ac au niveau des lésions de l'ADN, diminuant ainsi la sensibilité des cellules aux agents altérants de l'ADN (Miller et al., 2010). Les enzymes HDACs de classes II et IV sont sous exprimées dans les glioblastomes et induisent une suracétylation globale des histones H3 (Lucio-Eterovic et al., 2008). Plusieurs essais cliniques utilisant des inhibiteurs d'HDACs sont en cours ; parmi les effets de ces inhibiteurs, on note l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose, de l'angiogenèse, de l'autophagie et de la transition épithélialo-mésenchymateuse (Encart 2). Cependant, si les tumeurs hématopoïétiques répondent bien à ces inhibiteurs, l'effet sur les tumeurs solides n'est à ce jour pas satisfaisant (Khan and La Thangue, 2012).

### 2.3.4. Micro ARNs

Le récent intérêt porté aux miRNAs montre leur importance dans les processus de prolifération, différenciation (Encart 1) ainsi que leur activité en tant que suppresseurs de tumeurs ou oncogènes dans de nombreux cancers. Dans les gCSCs, les miRNAs impliqués dans la régulation de mécanismes conférant un avantage vis-à-vis de la survie, résistance, et prolifération des cellules sont surexprimés de façon significative (Gonzalez-Gomez et al., 2011; Silber et al., 2009). L'étude de l'expression des miRNAs des gCSCs par rapport à différentes populations cellulaires de référence a permis de mettre en évidence la surexpression / sous expression de différents miRNAs.

Par comparaison avec le tissu cérébral sain, les glioblastomes et astrocytomes anaplasiques montrent une sous-expression de 2 miRNAs (miR-124 et miR-137) ; la transfection de ces deux miRNAs inhibe la prolifération par induction de la différenciation des cellules de glioblastome (Silber et al., 2008). Plusieurs sites potentiels de liaison de NF- $\kappa$ B et c-Myc ont été identifiés au niveau de promoteurs de plusieurs miRNAs surexprimés dans les glioblastomes, impliquant ces facteurs de transcription dans la régulation de l'expression des miRNAs.

La comparaison avec des cellules de glioblastome n'ayant pas de caractère souche montre une sous-expression de plusieurs miRNAs dans les gCSCs dont miR-451, miR-486 et miR-425. La transfection de ces miRNAs dans les gCSCs inhibe la formation de neurosphères et la transfection de miR-451 inhibe la croissance cellulaire (Gal et al., 2008). La région promotrice de miR-451 a été identifiée comme le site de fixation de SMAD3 et 4, dont la transfection dans les cellules de glioblastome inhibe leur croissance, suggérant que SMAD peut être un moteur de la différenciation des gCSCs à travers l'expression de miRNAs (Zhou et al., 2010). D'autres miRNAs ont été identifiés comme sous exprimés et impliqués dans des voies de signalisation dérégulées dans les gCSCs : miR-7 inhibe normalement l'expression de l'EGFR et de la voie de signalisation AKT (Kefas et al., 2008), miR-1, miR-34, miR-146, miR-199 et la famille des miRNAs Let-7 inhibent le facteur Notch dans des cellules saines ; ces miRNAs sont impliqués dans plusieurs cancers dont les gliomes et sont souvent sélectionnés comme candidats de thérapies anticancéreuses (Wang et al., 2010b).

Récemment, une étude différentielle de l'expression de miRNAs entre les gCSCs et les NSCs a mis en évidence la surexpression de 8 miRNAs et la sous-expression de 2 miRNAs dans les gCSCs participant à la tumorigenèse (Lang et al., 2012).

Enfin, une étude portant sur la répression de l'état souche des gCSCs a mis en évidence le rôle du cluster miR 302-367. Ce cluster est en effet rapidement surexprimé lors de la mise en culture des gCSCs dans un milieu contenant du sérum, et sa translocation dans des gCSCs permet d'inhiber l'auto-renouvellement, l'expression de gènes associés à l'état souche des cellules et l'infiltration des cellules à travers l'inhibition de la voie de signalisation de CXCR4 (Fareh et al., 2012).



### 2.4. Transition épithéliamo mésenchymateuse

Les biopsies de glioblastomes primaires ainsi que l'étude du transcriptome et de l'expression des miRNAs ont permis de mettre en évidence la co-expression de gènes associés aux phénotypes de cellules souches neurales et mésenchymateuses ainsi que des antigènes de surface caractéristiques de cellules souches mésenchymateuses (Kim et al., 2011b; Phillips et al., 2006; Tso et al., 2006; Verhaak et al., 2010).

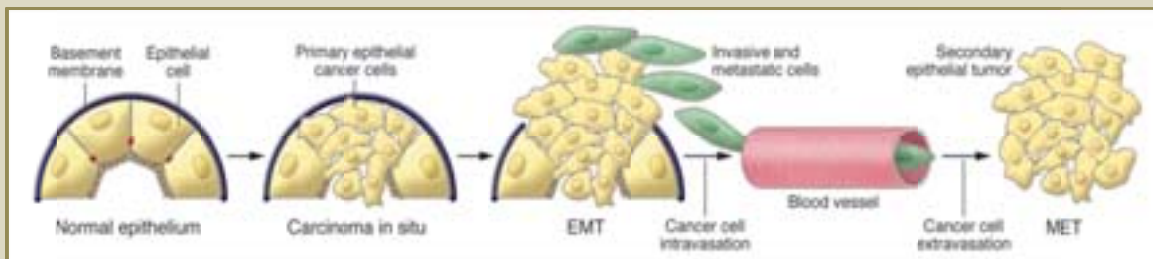
En 2008, le groupe de De Maria a démontré que certaines gCSCs peuvent avoir un potentiel de différenciation neural mais également mésenchymateux selon les stimuli du microenvironnement : *in vitro*, ces cellules sont capables, de différenciation chondro-ostéogénique ou neurale et dans les xénogreffes, la différenciation mésenchymateuse est associée à une réduction du taux de prolifération et de l'index mitotique de ces cellules. Ce groupe a ainsi pu mettre en évidence l'importante plasticité des gCSCs et le rôle essentiel du microenvironnement dans la différenciation des gCSCs. La limitation de la différenciation des gCSCs au lignage neuronal correspondrait alors à une perte de multipotence ou à un microenvironnement non favorable à la formation de cellules mésenchymateuses. On observe ainsi environ 2 % des glioblastomes avec une différenciation mésenchymateuse dans le cerveau, ce pourcentage passe à 28 et 57 % dans les cas respectifs de xénogreffe sous-cutanée et de culture *in vitro* (Ricci-Vitiani et al., 2008).

La présence de phénotypes neural et mésenchymateux au sein d'un même glioblastome a suggéré dans un premier temps des origines différentes de ces deux types de cellules, mais l'observation de mêmes anomalies renforce l'hypothèse d'une origine clonale commune (Borota et al., 2006) et l'acquisition du phénotype mésenchymateux à travers une transition épithéliamo-mésenchymateuse (EMT, Encart 2). Cette transition est caractérisée par l'expression de plusieurs facteurs de transcription définissant la signature mésenchymateuse et est présente dans plusieurs types de tumeurs solides. Certains de ces gènes sont caractéristiques du développement alors que d'autres entrent dans la composition de la matrice extracellulaire et du collagène (Cheng et al., 2012).

**Encart 2 : Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)**

L'EMT est un processus développemental conservé au cours de l'évolution, permettant à une cellule épithéliale (polarisée, fonctions de sécrétions et de barrière établie par des jonctions entre cellules et avec la membrane basale) de subir des changements biologiques multiples pour acquérir un phénotype mésenchymateux, incluant une capacité de migration, d'invasion, de résistance à l'apoptose et de production de composés de la matrice extracellulaire. Ce processus est tout à fait réversible à travers la transition mésenchymo-épithéliale (MET).

Plusieurs processus biologiques nécessitent une EMT. Au cours du **développement embryonnaire** et de la formation des organes, certaines cellules épithéliales subissent des changements morphogénétiques profonds pour acquérir des propriétés de migration et d'invasivité, être recrutées à des sites spécifiques de l'embryon en développement où elles se redifférencient à travers une MET pour former des tissus épithéliaux à des localisations distantes (EMT de type 1). L'EMT est également observée lors de la **réparation tissulaire** (EMT de type 2) ou encore au cours d'un **stress pathologique** (inflammation, carcinome de haut grade) (EMT de type 3). Dans le cas de la cancérisation, l'EMT permet l'invasion tissulaire et la formation de métastases pour les cellules situées au niveau du « front » de la tumeur. Cependant, les cellules tumorales migrantes dérivées d'une EMT et formant des colonies tumorales secondaires à des sites distants ressemblent aux cellules de la tumeur primaire : le phénotype mésenchymateux est abandonné, probablement au cours d'un processus MET (Kalluri and Weinberg, 2009).

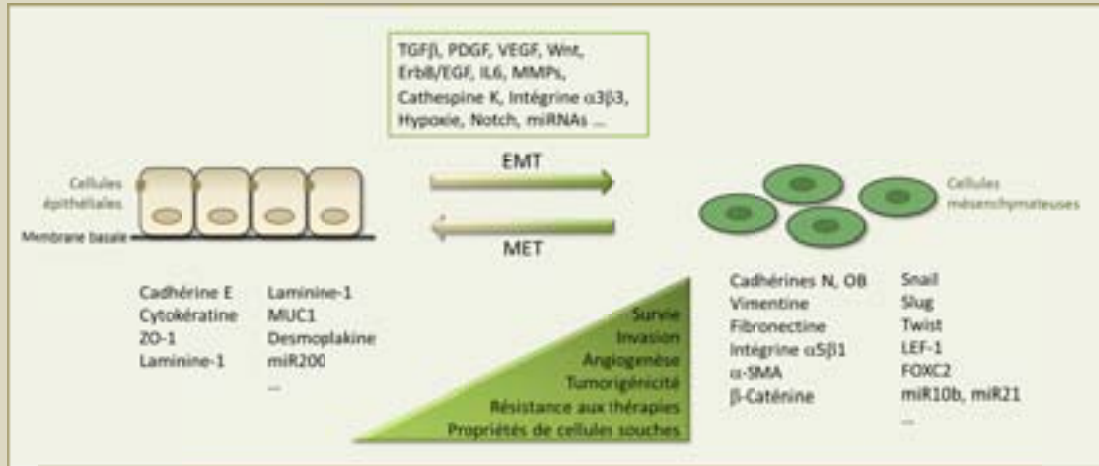


**Figure 22 : Contribution de l'EMT dans la progression de la cancérisation.**

L'acquisition du caractère invasif des cellules tumorales passe par une perte de la polarisation de la cellule, une perte d'adhérence à la membrane basale et une modification de la composition de cette membrane basale. L'EMT favorise la dispersion des cellules tumorales dans la circulation, l'établissement de ces cellules à des localisations distantes de la tumeur primaire. Une MET promeut ensuite le retour à un phénotype épithélial de ces cellules formant une tumeur secondaire (Kalluri and Weinberg, 2009)

L'EMT est dépendante du microenvironnement et peut être induite par plusieurs facteurs dont le **TGF-β** (transforming growth factor beta) ou des ligands des **récepteurs tyrosine kinase**. L'une des conséquences de l'expression de ces facteurs est la surexpression de répresseurs transcriptionnels tels que Snail, Slug, Zeb1, Zeb2/S1P, bHLH, Twist et E47 (Peinado et al., 2007). Ces différentes protéines se lient aux promoteurs de gènes dont notamment ceux codant pour la Cadhérine E, intervenant dans les jonctions adhérentes, et recrutent des histones déacétylases dans un processus de condensation de la chromatine. Ajouté à cela, la modulation de l'activité des Rho GTPases induit la perte de la polarité de la cellule, l'augmentation de la stabilité et l'accumulation cytoplasmique de la β-caténine intervenant dans les jonctions adhérentes et la modification de l'expression de gènes en coopération avec la signalisation Wnt. S'ensuivent ainsi une perte de marqueurs épithéliaux et une

augmentation de marqueurs mésenchymateux, dont la Fibronectine et la Vimentine (Zeisberg and Neilson, 2009) (Figure 23).



**Figure 23 : EMT et plasticité cellulaire.**

L'EMT est une transition fonctionnelle incluant la perte de marqueurs épithéliaux et l'apparition de marqueurs mésenchymateux (marqueurs de surface, protéines du cytosquelette, activation de facteurs de transcription, expression de miRNAs...) et permettant à la cellule d'acquies des propriétés de survie cellulaire, d'invasion, d'angiogenèse, de tumorigénicité, de dédifférenciation, ... Certains effecteurs du microenvironnement et des voies de signalisation (encadré vert) ont été identifiés comme éléments stimulants l'EMT.

Il a récemment été suggéré que le caractère souche de certaines cellules tumorales est étroitement corrélé avec une EMT. Dans certains modèles, l'EMT peut en effet induire des capacités d'auto-renouvellement, de différenciation et d'invasion (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008; Singh and Settleman, 2010), notamment à travers la diminution de l'expression des miRNAs répresseurs du caractère souche des cellules (Shimono et al., 2009; Wellner et al., 2009) ou par l'induction de Bmi-1, composant du complexe répresseur Polycombe 1 (Yang et al., 2010) (Figure 23).

D'autre part, une étude récente d'échantillons de glioblastomes de *The Cancer Genome Atlas* a mis en évidence une corrélation inverse entre la survie des patients, le temps de récurrence de la tumeur et la présence d'une signature de transition mésenchymateuse (Cheng et al., 2012), renforçant l'idée de l'importance de l'EMT et des CSCs dans l'agressivité de la tumeur.

### 2.5. « Marqueurs » connus

Plusieurs marqueurs ont été proposés pour caractériser et isoler les gCSCs. Parmi ces marqueurs, certains sont caractéristiques des NSCs ou des précurseurs neuronaux et d'autres de cellules différenciées du système nerveux central, mettant en évidence la complexité et la particularité des gCSCs. Historiquement, la Nestine et CD133 sont les marqueurs les plus décrits dans l'identification des NSCs ; leur utilisation dans l'isolation des gCSCs a joué un rôle fondamental dans la détermination des propriétés de ces cellules, telles que la progression tumorale et la résistance aux chimio- et radiothérapie.

#### 2.5.1. Nestine

La Nestine est une protéine des filaments intermédiaires du cytosquelette exprimée par les cellules souches neuro-épithéliales ; cette protéine est impliquée dans l'organisation du cytosquelette, la signalisation cellulaire, l'organogenèse, le métabolisme cellulaire et est un marqueur de cellules proliférantes et migrantes (Dell'Albani, 2008). La différenciation cellulaire s'accompagne de la perte du marqueur Nestine et de l'augmentation de l'expression de **neurofilaments** dans les neurones ou de **GFAP** (glial fibrillary acidic protein) dans les précurseurs des cellules gliales (Messam et al., 2000).

L'expression de filaments intermédiaires dans plusieurs types de cancers est associée à la mobilité et au caractère invasif des cellules (Strojnik et al., 2007) et la présence de la Nestine dans le noyau des cellules issues de glioblastomes suggère son implication dans l'organisation de la chromatine lors des divisions symétriques ou asymétriques des cellules souches ou dans la régulation de l'expression de gènes (Veselska et al., 2006). La Nestine a été identifiée dans de nombreuses gCSCs (Patru et al., 2010) mais son caractère non spécifique ne permet pas de l'utiliser en tant que marqueur d'isolation de gCSCs ; par contre la corrélation de l'expression de la Nestine avec une survie plus faible des patients permettrait d'utiliser cette protéine en tant que marqueur pronostique (Zhang et al., 2008a).

#### 2.5.2. CD133/Prominine

CD133/Prominine-1 est une glycoprotéine membranaire initialement identifiée dans les cellules souches neuro-épithéliales murines (Weigmann et al., 1997). Depuis, la protéine a été identifiée dans différents types de cellules souches, de cellules tumorales et est réprimée dans

les cellules différenciées (Kania et al., 2005). La localisation membranaire de CD133 au niveau de protrusions suggère une implication de cette protéine dans des mécanismes influençant la polarité de la cellule, la migration et l'interaction des cellules souches avec les cellules voisines et/ou la matrice extracellulaire.

Les cellules de glioblastome immunoréactives pour CD133 ont des propriétés de cellules souches *in vitro* et sont capables de former une tumeur *in vivo* (Singh et al., 2003; Singh et al., 2004), suggérant que les cellules CD133<sup>+</sup> sont des gCSCs et faisant de CD133 un marqueur d'identification de choix de ces cellules. Cependant, le groupe de Beier a mis en évidence peu de temps après que les cellules CD133<sup>-</sup> peuvent elles aussi avoir des propriétés de cellules souches et de tumorigénicité dans des expériences de xéno greffes orthotopiques (Beier et al., 2007). Depuis, il a été démontré que la xéno greffe de cellules CD133<sup>-</sup> peut donner naissance à des cellules CD133<sup>+</sup> (Wang et al., 2008) et que l'expression de CD133 peut être perdue lors de cultures *in vitro* sans pour autant que les cellules perdent leurs caractéristiques de cellules souches (formation de neurosphères, résistance au Témzolomide) (Patru et al., 2010). Le marqueur CD133 ne semble donc pas être indispensable à la biologie des gCSCs mais serait plutôt un marqueur de stress environnemental (Griguer et al., 2008) ou pourrait révéler la nature de la cellule d'origine de la tumeur : les cellules CD133<sup>-</sup> ont un profil transcriptomique proche des **NSCs fœtales** (signature proneurale, de type I) alors que les cellules CD133<sup>+</sup> sont plus proches **des NSCs adultes** (signature mésenchymateuse, de type II) (Gunther et al., 2008; Lottaz et al., 2010). La coexpression de CD133 et Nestine est associée à un mauvais pronostic des gliomes malins (Zhang et al., 2008a).

### 2.5.3. CD15/Lewis X/ssea1

CD15/Lex/ssea1 (stage-specific embryonic antigen 1) a récemment été proposé comme marqueur d'enrichissement des gCSCs (Son et al., 2009). Cet antigène est fortement exprimé dans de nombreuses cellules souches pluripotentes telles que les cellules souches embryonnaires dans les zones germinales du CNS en développement, certains astrocytes du CNS adulte et les NSCs des zones neurogéniques adultes (Capela and Temple, 2002). Les cellules CD15<sup>+</sup>, contrairement aux cellules CD15<sup>-</sup>, sont tumorigéniques *in vivo*, peuvent donner naissance à des cellules CD15<sup>-</sup> et CD15<sup>+</sup> à travers des divisions asymétriques, et sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation en plusieurs lignages cellulaires (Son et

al., 2009). Cependant, la capacité des cellules dérivées de glioblastome à former des neurosphères *in vitro*, propriété caractéristique des gCSCs, ne semble plus corrélée avec l'expression de CD15 après quelques semaines (Patru et al., 2010).

### 2.5.4. CXCR4

CXCR4 est impliqué dans une voie de signalisation régulant de nombreux processus, tels que la mobilité des cellules souches, la différenciation, l'angiogenèse, l'apoptose ou l'attraction des lymphocytes. CXCR4 et son unique ligand connu, CXCL12/SDF-1 sont exprimés de façon constitutive dans les cerveaux fœtal et adulte à la fois dans les cellules gliales et neuronales, et sont impliqués dans la neurogenèse et la connectivité (Zheng et al., 2007; Zhu et al., 2002). CXCR4 est surexprimé dans les gCSCs par rapport aux cellules plus différenciées de la même tumeur (Ehtesham et al., 2006) et joue un rôle dans le maintien de la quiescence de ces cellules (Khan et al., 2003) ainsi que dans le potentiel de forte invasion des gliomes (Ehtesham et al., 2006).

### 2.5.5. CD44

CD44 est l'un des marqueurs principaux de cellules souches ainsi que des cellules souches cancéreuses (Chan et al., 2009; Collins et al., 2005; Du et al., 2008a). Il appartient à une famille polymorphique de molécules d'adhésion jouant un rôle dans les mécanismes d'invasion tumorale et de métastases. L'expression de CD44 est surtout localisée sur le front de la tumeur et peut être utilisée pour déterminer le caractère invasif des gliomes (Khoshyomn et al., 1997; Ranuncolo et al., 2002). CD44 est surexprimé dans les glioblastomes, bloquant ainsi la croissance tumorale et sensibilisant les cellules aux agents cytotoxiques *in vivo*. CD44 apporte à la tumeur une résistance aux espèces réactives d'oxygène et aux agents cytotoxiques (Xu et al., 2010). L'expression de CD44 est plus élevée dans les tumeurs de grade plus avancé, ainsi que dans le corps de la tumeur par rapport aux régions périphériques ; de plus faibles niveaux d'expression de CD44 sont corrélés de façon surprenante avec une durée de survie statistiquement plus courte des patients (Wei et al., 2010b).

### 2.5.6. Sox2

Sox2 est un facteur de transcription permettant le maintien du potentiel de prolifération des cellules souches neurogliales et inhibant la différenciation neuronale (Graham et al., 2003),

surexprimé dans les glioblastomes et en particulier dans les gCSCs (amplification du locus du gène, surexpression, hypométhylation du promoteur). L'utilisation de siRNAs dirigés contre Sox2 dans des gCSCs induit la différenciation de ces cellules : perte de la capacité à former des neurosphères, profil d'expression de cellules différenciées (diminution des marqueurs Nestin, Oct-4 et REST, augmentation des marqueurs BMP4,  $\beta$ -Tubuline, GFAP), diminution de la viabilité cellulaire, accumulation des cellules en phase G0/G1 du cycle cellulaire, et perte des propriétés de migration et d'invasion. Cependant, l'introduction de Sox2 dans une lignée Sox2 négative ne permet ni d'induire la formation de neurosphères ni l'auto-renouvellement mais augmente de façon significative les capacités d'invasion et de migration. L'expression de Sox2 conditionne donc le maintien de l'expression d'un phénotype indifférencié dans les gCSCs mais n'est pas le seul facteur permettant d'induire des propriétés de cellules souches dans les cellules de glioblastome (Alonso et al., 2011). Cependant, Sox2 a également été identifié dans l'ensemble de la masse tumorale et serait donc un indicateur de différenciation aberrante plutôt que de gCSCs (Phi et al., 2008).

Sox2 fait partie, avec **Oct4**, **Nanog** et **c-Myc**, de la **signature des cellules ES** (Encart 3) retrouvée dans les tumeurs histologiquement peu différenciées, dont les glioblastomes, et plus particulièrement dans les CSCs ; l'expression de la signature ES est corrélée avec le grade tumoral (Ben-Porath et al., 2008b; Murat et al., 2008).

### 2.5.7. GalNAc et GlcNAc

Une étude récente a mis en évidence l'expression membranaire différentielle de GlcNAc (alpha-N-acétylglucosamine) et GalNAc (alpha-N-acétylgalactosamine) selon le degré de différenciation des cellules, permettant d'identifier les gCSCs au sein d'une population de cellules issues de glioblastomes ; ces cellules ont des capacités d'auto-renouvellement *in vitro* et de tumorigenèse *in vivo*. Ces marqueurs n'ont à ce jour pas été challengés et les auteurs suggèrent leur utilisation en tant que biomarqueurs d'identification des gCSCs au sein de la tumeur (Tucker-Burden et al., 2012).

De nombreux marqueurs des NSCs sont identifiés dans les glioblastomes et en particulier dans les gCSCs. Certains de ces marqueurs de surface, notamment CD133 et CD44, ont été utilisés pour isoler les CSCs de différentes tumeurs solides ; cependant, le rôle de l'expression de ces protéines n'est pas connu dans les CSCs. De plus, aucun de ces marqueurs n'est



exprimé exclusivement par les gCSCs, et ne permet pas de présager de la capacité des cellules à former des sphères secondaires *in vitro* ou des tumeurs *in vivo* (Patru et al., 2010) ; la plupart des gCSCs isolées expriment une combinaison de CD133, Nestin, Sox2, CD15, Bmi1, Ezh2, L1CAM, Olig2 mais il n'y a pas de marqueur unique exprimé à la fois de façon ubiquitaire et exclusive dans ces cellules (Schmalz et al., 2011) : aujourd'hui l'utilisation de marqueurs de surface multiples est nécessaire pour caractériser complètement les gCSCs. La récente identification des glycanes GalNAc et GlcNAc comme potentiels biomarqueurs des gCSCs au sein de la masse tumorale reste à confirmer mais pourrait ouvrir une nouvelle voie dans la caractérisation des gCSCs.

### Encart 3 : Signature ES

La signature des cellules souches embryonnaires (ES) définit les éléments régulateurs clés de l'identité de ces cellules, parmi lesquels OCT4, SOX2 et NANOG. Ces 3 facteurs de transcription sont essentiels au maintien des propriétés des cellules souches, i.e. maintien de la pluripotence par activation / répression de gènes, auto-renouvellement, régulation du cycle cellulaire à travers l'expression de miRNAs. Ces 3 facteurs s'auto régulent en se liant à leurs propres promoteurs et en se stabilisant mutuellement : SOX2 maintient le niveau d'expression d'OCT4 requis pour le maintien de la pluripotence, SOX2 et OCT4 régulent l'expression de NANOG (Jopling et al., 2011).

En plus du maintien des propriétés des cellules souches, ces facteurs de transcription sont récemment apparus comme nécessaires et suffisants à l'induction de cellules pluripotentes (IPS). La formation de cellules IPS a dans un premier temps été démontrée par la transfection des facteurs de transcription **OCT4, SOX2, KLF4 et MYC** dans des fibroblastes (Takahashi and Yamanaka, 2006) ; il a ensuite été montré que tous ces facteurs de transcription ne sont pas indispensables, selon le type cellulaire d'origine considéré (Giorgetti et al., 2009; Nakagawa et al., 2008), jusqu'à la reprogrammation de NSCs avec le facteur OCT4 uniquement (Kim et al., 2009). *In vivo*, des cellules IPS ont pu générer un organisme entier viable jusque l'âge adulte et pouvant avoir une descendance : les cellules IPS peuvent être totalement pluripotentes (Boland et al., 2009; Kang et al., 2011). Au cours de ces reprogrammations, les modifications épigénétiques de la chromatine (degré de compaction, méthylation des histones et de l'ADN) ainsi que l'expression des miRNAs sont essentielles (Hochedlinger and Plath, 2009; Mallanna and Rizzino, 2010; Meshorer and Misteli, 2006).



### 3. Origine de la cellule génératrice de tumeur : hypothèses

Le développement tumoral peut être expliqué par une succession d'altérations génétiques et épigénétiques et d'étapes de sélection donnant naissance à des cellules présentant des avantages de survie et de prolifération ; l'hétérogénéité des cellules tumorales reflète alors la coexistence de populations évoluant en synergie et ayant des potentiels oncogéniques différents. Durant la progression tumorale, l'acquisition de mutations supplémentaires peut permettre l'apparition de CSCs, capables de prolifération et de différenciation. Ces dernières sont souvent confondues avec la cellule d'origine, cellule normale dans laquelle les premières mutations oncogéniques se produisent et dont la multiplication forme une masse tumorale ; d'un autre côté les CSCs sont définies comme les cellules capables de maintenir ou de régénérer une tumeur préformée (Visvader, 2011).

#### 3.1. Cellule souche normale ou progénitrice

Historiquement, il a été proposé que les astrocytomes trouvent leur origine dans les astrocytes matures. Cependant, la mise en évidence des gCSCs et la forte ressemblance de celles-ci avec les NSCs a favorisé l'hypothèse d'une cellule souche ou progénitrice neurale comme cellule d'origine des gCSCs, d'autant plus que l'auto-renouvellement des cellules souches leur permet d'accumuler des mutations. Cette hypothèse a également été émise dans nombre de tumeurs où ont été identifiées des CSCs et est renforcée par les **modèles animaux** dans lesquels les changements d'expression de quelques oncogènes ou suppresseurs de tumeurs sont suffisants pour induire une tumeur (Tableau 3). En particulier la réactivation des gènes **Ras** et **Akt** dans des progéniteurs neuronaux (Holland, 2001; Holland et al., 2000) ou encore l'inactivation de **Pten** et **P53** dans des NSCs (Jacques et al., 2010) permet d'induire un glioblastome dans des souris immunodéprimées. Ces observations sont renforcées par l'apparition des glioblastomes dans les zones sub-ventriculaires, régions où se trouvent les cellules souches et progénitrices neuronales (Gil-Perotin et al., 2006).

Les CSCs des leucémies sont à ce jour les plus étudiées ; le suivi des clones de tumeurs liquides (LSCs) et l'établissement de greffes secondaires et tertiaires permet de mettre en évidence 3 sous types de LSCs selon leur taux d'auto renouvellement : les LSCs à court terme, les LSCs à long terme et les LSCs quiescentes à long terme (clones transitoires ou stables). Ces LSCs montrent une organisation hiérarchique identique à celle de

l'hématopoïèse normale (Hope et al., 2004) ainsi que des phénotypes de surface similaires à ceux des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) (Lapidot et al., 1994) ou progénitrices (Krivtsov et al., 2006). De plus, la fusion de gènes **MLL** (mixed-lineage leukemia) (retrouvée dans plus de 50 % des leucémies) dans des cellules hématopoïétiques primitives génère des protéines ayant un fort potentiel de transcription, permettant l'expression aberrante de gènes de l'homéobox (facteurs de transcription impliqués dans le développement embryonnaire et dans la différenciation des cellules hématopoïétiques) (Barabe et al., 2007). Grâce à ces observations, l'origine des LSCs est fortement suggérée dans le compartiment des HSCs (HSCs ou progéniteurs) ; les LSCs suivraient un programme de développement similaire à celui des HSCs avec quelques erreurs, plutôt que la génération d'une cellule aberrante ressemblant aux HSCs.

Modèle Génétique	Cellule d'origine	Ref
RAS, AKT activation	Progéniteur neural	1
P16 <sup>Ink4a</sup> /p19 <sup>Arf</sup> , BMI1 inactivation ; EGFR mutant	Progéniteur neural et astrocyte	2, 3
P53, NF1 et/ou PTEN inactivation	Progéniteur neural ou NSC	4
PDGFB activation	Progéniteur oligodendrocytaire	5
RAS, AKT activation ; p53 inactivation	Progéniteur multipotent	6
P53 mutant	Progéniteur neural, NSC	7
PTEN, p53 inactivation	Progéniteur multipotent, NSC	8

1. E. C. Holland *et al.*, 2000. *Nat Genet* **25**, 55.
2. R. M. Bachoo *et al.*, 2002. *Cancer cell* **1**, 269.
3. S. W. Bruggeman *et al.*, 2007. *Cancer cell* **12**, 328.
4. S. Alcantara Llaguno *et al.*, 2009. *Cancer cell* **15**, 45.
5. N. Lindberg *et al.*, 2009. *Oncogene* **28**, 2266.
6. T. Marumoto *et al.*, 2009. *Nature medicine* **15**, 110.
7. Y. Wang *et al.*, 2009. *Cancer cell* **15**, 514.
8. T. S. Jacques *et al.*, 2010. *Embo J* **29**, 222.

**Tableau 3 : Modèles animaux de glioblastomes établis par mutations génétiques.**  
Adapté de (Visvader, 2011).

### 3.2. Cellule différenciée

En réponse à une exposition au **TGF $\alpha$**  (transforming growth factor alpha), fréquemment surexprimé dans les premiers stades des gliomes, des cellules d'astrocytes matures peuvent se différencier *in vitro* en cellules ayant des propriétés de cellules progénitrices neurales (Sharif et al., 2007) et sont sensibilisées à la cancérisation, capables d'induire un glioblastome *in vivo* suite à une irradiation aux rayons gamma (Dufour et al., 2009).

L'acquisition d'un phénotype de cellules souches par des cellules différenciées à travers la **transition épithélamo-mésenchymateuse** a été abordée au point II-2.4 (page 39) et est

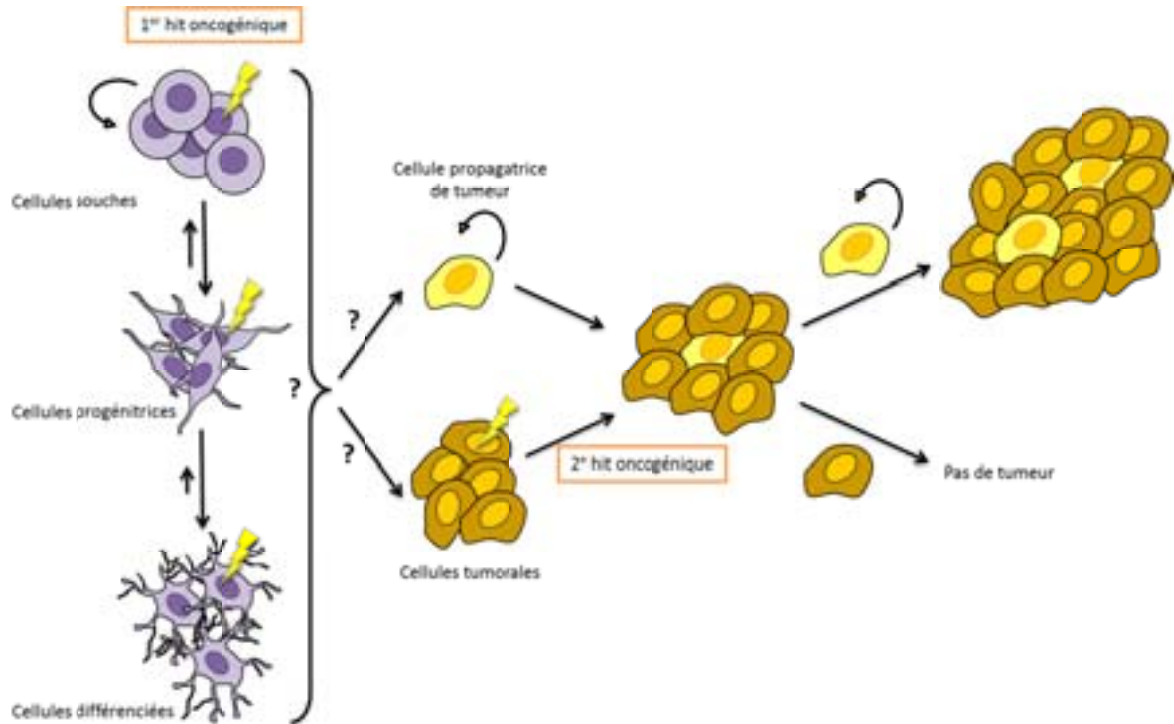
supportée par l'observation d'une signature mésenchymateuse dans les gCSCs (Cheng et al., 2012) ainsi que par l'expression aberrante de facteurs de transcription inducteurs d'EMT dans plusieurs tumeurs dont les gliomes (Ansieau et al., 2010; Elias et al., 2005). L'hypothèse de l'EMT comme origine des CSCs est également fortement suggérée dans le cancer du sein : les facteurs de transcription TWIST1 et SNAIL1, impliqués dans l'EMT, sont fréquemment détectés *in situ* dans la tumeur avant même la dissémination de métastases, et l'expression combinée de TWIST1 et RAS dans des cellules épithéliales mammaires est suffisante pour induire une tumeur (Morel et al., 2012).

### **3.3. Modèle des deux hits tumorigéniques**

La distinction des cellules initiatrices et propagatrices de tumeur suppose deux évènements majeurs d'acquisition de mutations oncogéniques : un premier évènement permettant à la cellule de se multiplier et d'accumuler des mutations et un deuxième évènement permettant à l'une des cellules de la masse tumorale d'acquérir les propriétés de CSCs décrites jusqu'ici. Cette hypothèse est supportée par la reprogrammation de cellules tumorales différenciées en cellules ayant des caractères de CSCs dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses à travers l'expression de facteurs de transcription (Chiou et al., 2010; King et al., 2011), dont le facteur Oct4 dans des cellules de glioblastome (Li and Laterra, 2012). De la même façon, l'expression/répression de certains miRNAs permet à une cellule tumorale d'acquérir des propriétés de cellule souche (Lin et al., 2008; Wellner et al., 2009).

Parmi les mutations « candidates » au premier hit tumorigénique, on trouve les mutations décrites dans l'une des 3 voies les plus fréquemment mutées des glioblastomes, à savoir les voies des RTKs, de P53 et de Rb, décrites au point I-1.3 (page 7).

Les mutations du second hit tumorigénique sont plus difficiles à identifier mais on peut envisager la mutation Kras, isoforme de Ras retrouvée dans plusieurs tumeurs, favorisant l'expansion des cellules souches / progénitrices tout en bloquant leur différenciation. Des mutations peuvent également être acquises dans les voies de signalisation altérées des gCSCs (Shh, Notch, Wnt/ $\beta$ -caténine) résultant en l'activation aberrante de certains gènes, dont certains activateurs d'une EMT (ZEB1, Twist, Snail) (Kahlert et al., 2012).



**Figure 24 : Origine des CSCs.**

L'origine des gCSCs n'est pas connue et plusieurs hypothèses sont proposées. Il peut s'agir de la transformation d'une cellule souche / progénitrice neurale ou d'une cellule différenciée (astrocyte) donnant naissance à une cellule ayant les caractéristiques de gCSCs, capable de générer une masse tumorale. Dans ce cas, la cellule initiatrice de la tumeur est une cellule souche cancéreuse. Dans le 2<sup>e</sup> cas de figure, une cellule normale (cellule souche, progénitrice, astrocyte) subit une première mutation lui permettant d'acquérir des capacités de prolifération dérégulée et la rendant plus permissive à certains événements mutagènes ; une 2<sup>e</sup> mutation permet d'acquérir des propriétés de cellule souche tumorale. Dans les deux cas, la cellule souche cancéreuse (par opposition aux autres cellules de la masse tumorale) est la seule capable de reformer une tumeur semblable à la tumeur originelle dans le cas de xénogreffes ou de métastases.

#### 4. Organisation et croissance de la tumeur

L'apparition du concept des CSCs est corrélée à l'organisation hiérarchique de la tumeur : de la même façon que pour un organe normal, les CSCs subissent des divisions asymétriques pour donner naissance à des cellules différenciées, ayant un potentiel de prolifération réduit et peuvent s'auto-renouveler pour régénérer le pool de cellules souches. La considération de la tumeur comme une caricature d'un organe normal est apparue dans les années 1960 (Pierce et al., 1960; Pierce and Speers, 1988).

Bien que les CSCs aient été identifiées dans de nombreux types tumoraux, la relation que ces cellules entretiennent entre elles pour maintenir la croissance tumorale n'est pas claire et différents modèles ont été proposés (Figure 25).

### 4.1. Modèles de croissance

#### 4.1.1. Modèle hiérarchique ou de cellule souche cancéreuse

Ce modèle dérive directement de l'identification des CSCs et l'organisation hiérarchique de la tumeur est définie suivant celle d'un tissu sain : seule une petite sous population de cellules tumorales a une capacité de prolifération, de différenciation et ainsi la capacité de générer une nouvelle tumeur en donnant naissance à des cellules progénitrices ayant une capacité de prolifération limitée. Dans ce modèle, la différence entre les cellules tumorigéniques et non tumorigéniques repose sur des **variations épigénétiques** et non génétiques ; ces variations épigénétiques sont irréversibles, permettant ainsi une hiérarchisation de la tumeur.

La proportion de ces cellules, par rapport aux cellules différenciées de la masse tumorale, est variable selon les tumeurs et leur grade, mais est généralement faible (0,01 % - 5 %) (Dell'Albani, 2008).

D'un point de vue thérapeutique, l'élimination de ces CSCs suffit à éradiquer la croissance tumorale et la possibilité d'une récurrence ; les éventuelles récurrences sont expliquées par la résistance de l'un des clones de CSCs.

#### 4.1.2. Modèle stochastique ou de l'évolution clonale

En 1963, un modèle d'évolution clonale a été proposé chez des patients atteints de leucémie où deux « lignées » cellulaires génétiquement différentes ont été identifiées (Levan et al., 1963).

Selon ce modèle, les cellules tumorales sont hétérogènes mais ont toutes le même potentiel tumorigénique, l'entrée dans le cycle cellulaire étant un événement se produisant de façon non synchronisée et avec une faible probabilité dans certaines cellules. Dans cette hypothèse, l'hétérogénéité des cellules tumorigéniques est générée par des **mécanismes génétiques et épigénétiques** ; la hiérarchie cellulaire est définie par une petite portion de cellules qui, à un moment donné, expriment les caractéristiques des CSCs, les autres cellules tumorales ayant des capacités limitées de réplication et pouvant contribuer à la masse tumorale mais pas à son maintien ni à sa régénération dans le cadre de xénogreffes.

Ce modèle explique notamment pourquoi la caractérisation moléculaire des CSCs est difficile. Par exemple, 25 % des cellules de mélanome ont été identifiées comme ayant un potentiel tumorigène sans qu'aucun marqueur n'ait pu être identifié pour les différencier des cellules non tumorigènes (Quintana et al., 2008).

La distinction entre ces deux modèles de croissance tumorale repose surtout sur la détermination d'une population distincte de cellules dans la masse tumorale qui passe par la caractérisation de marqueurs de cellules souches cancéreuses.

Bien que ces deux modèles aient été souvent présentés comme étant mutuellement exclusifs, ils apparaissent complémentaires dans un bon nombre de tumeurs : la plupart des cancers dans lesquels des CSCs ont été identifiées présente une hétérogénéité interclonale, suggérant une évolution à travers l'apparition de différents clones (Barabe et al., 2007).

### 4.1.3. Modèle de la coopérativité interclonale

Ce modèle prend en compte les interactions des cellules tumorales entre elles et leur rôle dans le maintien de l'hétérogénéité. Ceci suppose un réseau complexe d'interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement, les interactions apportant un bénéfice mutuel aux différents clones cellulaires et expliquant le maintien de l'hétérogénéité au détriment de l'émergence d'un seul clone dominant (Bonavia et al., 2011). Dans ce modèle, une minorité de cellules de phénotypes distincts peut avoir un impact important sur le comportement des autres cellules tumorales à travers la production de facteurs conférant un avantage aux clones environnants. Ces facteurs paracrines peuvent notamment promouvoir la croissance de cellules à priori non *per se* tumorigéniques : ce phénomène a été observé par la coculture ou co-injection de cellules non tumorales rendues tumorigéniques par la présence de cellules tumorales exprimant le facteur Wnt ou une mutation du récepteur EGFR (Inda et al., 2010; Vermeulen et al., 2010).

Les interactions interclonales peuvent être soit compétitives pour l'accès à l'oxygène, les nutriments, l'espace et aboutissant à l'émergence de clones dominants à travers une sélection naturelle, soit coopératives à travers des **échanges mutualistes** (échanges coopératifs réciproques) ou **commensalistes** (l'échange ne profite qu'à un clone).

Cette coopérativité pourrait être à l'origine d'un partage de propriétés de résistance aux thérapies, d'un affaiblissement de la réponse immunitaire ou encore d'une croissance tumorale et de capacités d'invasion plus importantes.

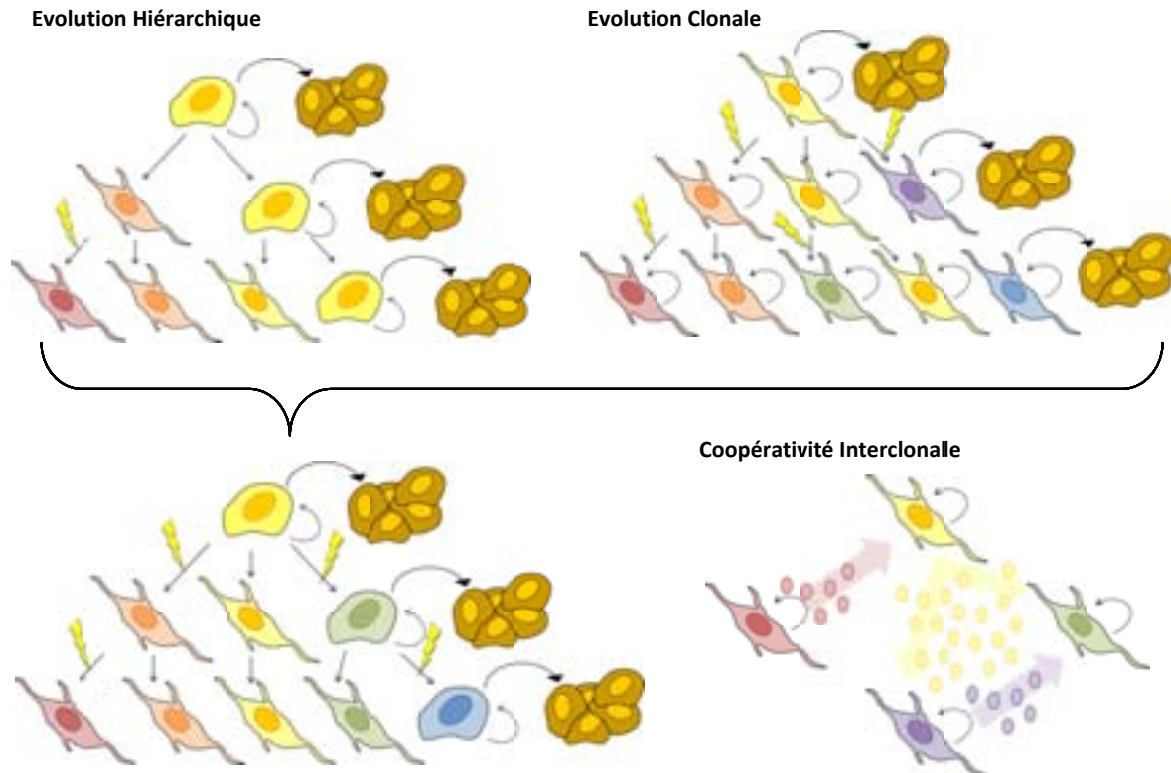


Figure 25 : Modèles de croissance tumorale

#### 4.2. Échanges intercellulaires

Des conversions bidirectionnelles entre les CSCs et les cellules de la masse tumorale plus différenciées ont été mises en évidence; ces mécanismes reposent sur des modifications épigénétiques, des réseaux de facteurs de transcription ou encore l'activation / inhibition de voies de signalisation. Les cellules peuvent ainsi échanger de l'information, de la matière ou encore de l'énergie.



### 4.2.1. Informations

L'échange intercellulaire d'informations et l'interaction ligand-récepteur peuvent se faire de plusieurs façons :

- échange autocrine : autostimulation de la cellule, des cellules d'un même tissu (EGF / EGFR)
- échange juxtacrine : interaction entre un récepteur et un ligand lié à la surface d'une cellule voisine (Delta-like / Notch)
- échange paracrine : interaction entre un récepteur et un ligand soluble sécrété par des cellules du tissu environnant ou voisin (VEGF / VEGFR)
- échange récréine : sécrétion d'un récepteur dans des microvésicules et incorporation de ce récepteur à une cellule voisine (EGFR<sub>VIII</sub>)

Une multitude de facteurs autocrines permet la transmission d'informations et la stimulation intercellulaire au sein de la tumeur (Charles et al., 2011; Hoelzinger et al., 2007). Les voies de signalisation oncogéniques, dont Wnt, Notch, Shh, TGF- $\beta$ , RTKs, sont ainsi stimulées par la liaison d'un **ligand extracellulaire** sur le récepteur membranaire de chacune d'entre elles ; ces voies de signalisation sont majoritairement impliquées dans la prolifération et l'invasion des cellules tumorales. Les **chimiokines** (CXCL12/SDF1) jouent également un rôle important dans l'invasion des cellules ainsi que les phospholipides (autotaxine, acide lipophosphatidique, sphingosine-1-phosphate). Parmi les boucles de signalisation plus inhabituelles stimulant la mobilité des cellules, le GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) fait partie d'une boucle de signalisation à trois parties surexprimée dans les glioblastomes : la liaison du GDF au GDNFR $\alpha$ 1 (GDNF receptor alpha 1) active c-Ret dont l'activité tyrosine kinase active les voies de signalisation RAS / MEK / ERK1/2 et PI3K / AKT impliquées dans la mobilité cellulaire (Figure 6) (Song and Moon, 2006).

Le **calcium** est un élément universel de transduction du signal (décrit dans le Chapitre II de ce manuscrit), permettant de contrôler de multiples processus tels que la sécrétion, la prolifération la différenciation cellulaires, l'expression de gènes... et coordonne ainsi l'activité d'une population de cellules donnée. Ainsi, une stimulation mécanique (déformation de la membrane plasmique) induit une augmentation du calcium cytoplasmique intracellulaire qui peut se propager de façon concentrique aux cellules voisines à travers les jonctions gap



(connexines) ou par la sécrétion d'un médiateur extracellulaire (ATP, ADP) (Himpens and Vereecke, 2000) ou encore par un mécanisme impliquant un récepteur senseur du calcium extracellulaire couplé à une protéine G (CaR). Dans ce dernier cas, le calcium rejeté dans l'espace extracellulaire par une première cellule suite à la génération d'un signal calcique intracellulaire est détecté et potentiellement traduit par les cellules voisines exprimant CaR (Hofer et al., 2000).

### 4.2.2. Matière

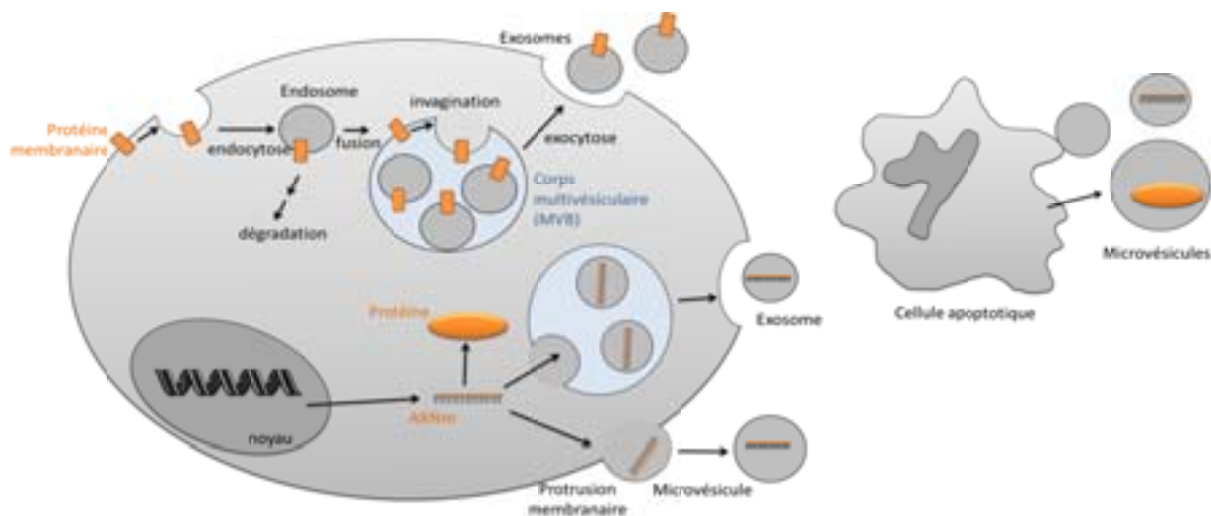
Les cellules de tumeurs agressives relâchent des **microvésicules** (100 nm – 1 µm de diamètre) et des **exosomes** (40 – 100 nm de diamètre) contenant des ARN messagers (ARNm), de l'ADN, des enzymes, des récepteurs oncogéniques, des facteurs de croissance ou encore des miRNAs qui vont pouvoir être intégrés par des cellules voisines et y induire le phénotype associé. La quantité de microvésicules formées par les cellules tumorales est corrélée à l'invasivité de ces cellules que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Ginestra et al., 1998; Ginestra et al., 1999). Les microvésicules peuvent être générées par 3 processus différents : apoptose, protrusion membranaire, exosomes (Figure 26). Une fois formées, ces microvésicules permettent un transfert horizontal de **molécules bioactives** et leur phénotype associé aux cellules cibles (Al-Nedawi et al., 2009).

Dans les glioblastomes, seule une petite proportion de cellules expriment la forme tronquée oncogénique de l'EGFR (EGFR<sub>VIII</sub>) alors que la plupart des cellules exprime de façon constitutive l'EGFR, caractéristique de la forme oncogénique. Une étude a montré que l'EGFR<sub>VIII</sub> peut être partagé par les cellules tumorales par des transferts intercellulaires de microvésicules dérivées de la membrane plasmique qui, suite à la fusion avec la membrane de cellules voisines, peuvent transférer l'activité oncogénique du récepteur par l'activation des voies de signalisation Akt et MAPK (Al-Nedawi et al., 2008) (Figure 6). De la même façon, les microvésicules permettent le partage de la protéine P-gp, médiatrice de la résistance des cellules aux agents chimiothérapeutiques (point II-5.2 page 70) (Bebawy et al., 2009; Levchenko et al., 2005). Une autre étude a montré que des exosomes dérivés de cellules tumorales peuvent être intégrés par des cellules saines, telles que des cellules endothéliales de la microvasculature : les microvésicules dérivées de cellules tumorales et enrichies en

protéines angiogéniques favorisent la formation de vaisseaux par les cellules endothéliales (Skog et al., 2008).

Les exosomes peuvent également contenir un répertoire d'ARNm ou miRNAs associés à la croissance tumorale, l'invasion et la répression immunitaire (Skog et al., 2008; Valadi et al., 2007) ou encore des molécules d'ADN (ADNc et ADN génomique), permettant ainsi un transfert horizontal de gènes. L'incorporation d'oncogènes dans les microvésicules résulte probablement de la grande activité de reverse transcription dans les cellules tumorales ou encore de régions chromosomiques amplifiées se retrouvant dans le cytoplasme suite à la dégradation de la membrane nucléaire au cours de la mitose (Balaj et al., 2011).

L'échange de molécules entre cellules voisines peut également se faire à travers des **jonctions gap** ; ceci a été démontré dans le cas de miRNAs pro-oncogéniques permettant d'inhiber un certain nombre d'ARNm de la cellule cible adjacente non tumorale et d'induire la tumorigénicité de celle-ci (Katakowski et al., 2010).



**Figure 26 : Formation de microvésicules et exosomes.**

Les microvésicules peuvent être formées à partir d'exosomes, de protrusions membranaires ou de cellules apoptotiques. Ces microvésicules permettent le transfert horizontal de différentes molécules, protéines, ADN, ARNm, miRNAs.

### 4.2.3. Énergie

Le **couplage métabolique** est un processus physiologique normal existant notamment dans le cerveau : la sécrétion de glutamate par les neurones stimule la glycolyse dans les astrocytes, produisant du lactate utilisé par les neurones dans un métabolisme oxydatif mitochondrial et permettant la synthèse d'ATP (Pellerin and Magistretti, 1994). Les cellules tumorales utilisent également ce couplage métabolique pour permettre une importante synthèse d'ATP à partir de métabolites riches en énergie (lactate, cétones, glutamine, acides gras) produits par les cellules stromales (fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales, macrophages). L'un des mécanismes employés par les cellules tumorales afin d'obtenir ces métabolites est de sécréter du peroxyde d'hydrogène induisant un stress oxydatif dans les fibroblastes adjacents. Les fibroblastes ainsi activés entrent en glycolyse aérobie et produisent des nutriments cataboliques stimulant le métabolisme oxydatif des cellules tumorales : il s'agit de l'**effet Warburg inverse** (la glycolyse et la synthèse d'ATP ne se font pas dans la même cellule) (Martinez-Outschoorn et al., 2011a). Les cellules tumorales se comportent dans ce cas comme un organisme parasite pour promouvoir leur croissance à travers un transfert d'énergie entre les cellules stromales et tumorales (Martinez-Outschoorn et al., 2011b).

### *4.3. Influence des niches et du microenvironnement*

La contribution du tissu sain, pouvant représenter une large proportion de la masse tumorale, ainsi que la quantité variable de tissu à proximité immédiate de la tumeur constituent le microenvironnement tumoral. Les cellules y sont affectées par la présence de la tumeur si bien qu'elles ne sont pas de simples « spectatrices » mais peuvent influencer la biologie de la tumeur. Le microenvironnement joue un rôle important dans l'initiation et la progression tumorales comme en témoignent la sélection de certains clones métastatiques ou la formation de tumeurs par des cellules cancéreuses, injectées en intraveineuse, seulement si elles trouvent un environnement permissif (Suzuki et al., 2006).

Dans les tumeurs cérébrales, le microenvironnement est composé de cellules microgliales, macrophages, astrocytes, oligodendrocytes, neurones, progéniteurs de cellules gliales et neuronales, matrice extracellulaire, péricytes et cellules endothéliales. Cette structure complexe est à la base d'un réseau dans lequel se forment des interactions entre des cellules tumorales et non tumorales produisant ainsi un environnement favorable à la croissance

tumorale, la migration cellulaire, la résistance à la thérapie ou encore l'échappement immunitaire.

Le microenvironnement représente des échanges complexes et dynamiques entre les différents types cellulaires pouvant influencer l'évolution de certains clones tumoraux et donc l'évolution de la tumeur. Par exemple, **TGF- $\beta$**  (transforming growth factor beta) est l'une des molécules régulant l'écosystème de la tumeur, pouvant être soit un activateur soit un suppresseur de tumeur. Comme illustré dans la Figure 27, TGF- $\beta$  influence non seulement la communication des cellules tumorales entre elles mais également l'activité de différents types cellulaires du microenvironnement de la tumeur, tels que les fibroblastes, les cellules immunitaires ou encore la matrice extracellulaire ; ces interactions sont réciproques et les signaux du microenvironnement influencent les capacités de TGF $\beta$  à stimuler ou inhiber la progression tumorale et la formation de métastases (Bierie and Moses, 2006).

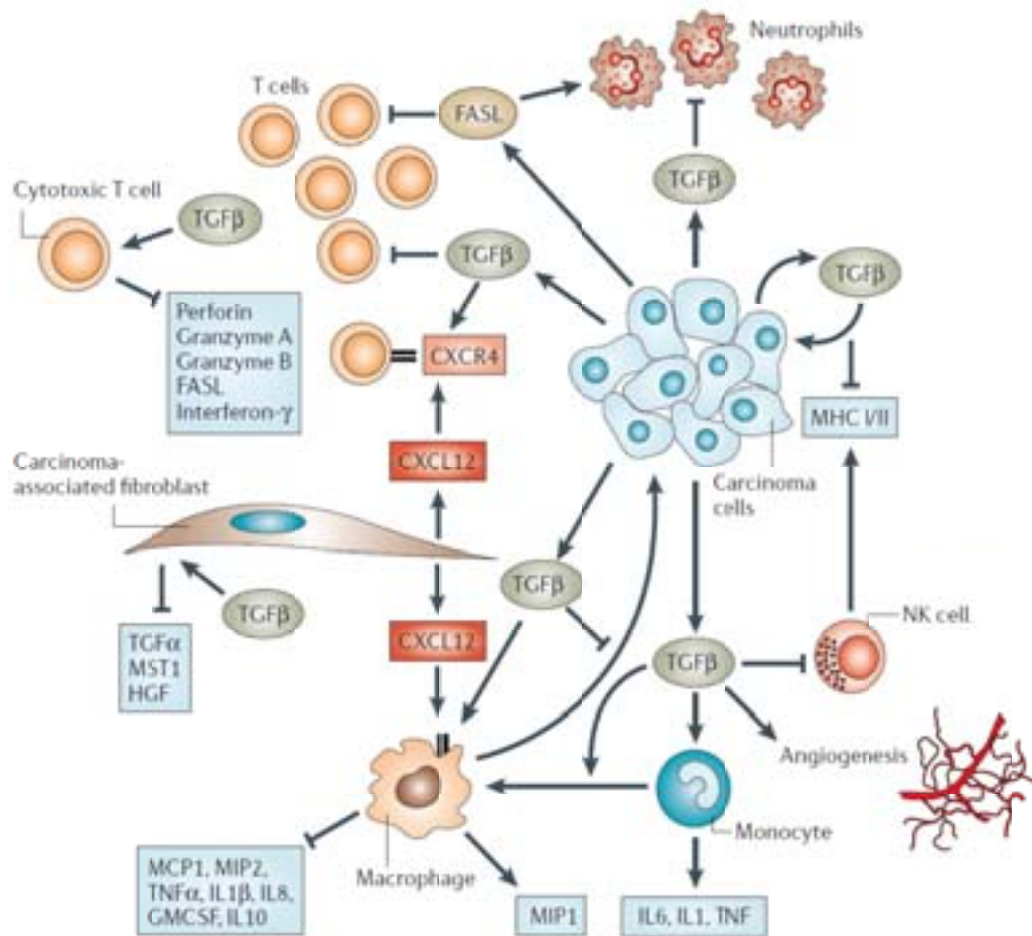


Figure 27 : Voies de communication intercellulaires régulées par TGF $\beta$  dans un contexte tumoral.

TGF $\beta$  est un régulateur des cellules T, neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules NK (natural killer), fibroblastes associés à la tumeur. TGF $\beta$  contribue également à la régulation de l'angiogenèse par des mécanismes directs et indirects, stimule la migration des fibroblastes, cellules T, neutrophiles et monocytes, et influence leur activité pour stopper ou stimuler la progression tumorale. TGF $\beta$  inhibe l'activité des cellules T, la sécrétion par ces mêmes cellules de facteurs cytolytiques, stimule la différenciation des monocytes en macrophages mais inhibe la fonction effectrice de ces macrophages. TGF $\beta$  stimule également les cellules T et macrophages associés à la tumeur en potentialisant l'activité de CXCR4 suite à la fixation de son ligand CXCL12 sécrété par les fibroblastes associés à la tumeur. TGF $\beta$  permet l'expression du ligand FAS (FASL) en inhibant l'activation des neutrophiles, cellules induisant la mort cellulaire suite à la reconnaissance de cette molécule. Ce rôle de TGF $\beta$  est important dans la progression tumorale car l'expression de FASL permet l'échappement immunitaire en induisant l'apoptose des cellules exprimant le récepteur FAS, parmi lesquelles les cellules T. La signalisation de TGF $\beta$  réduit également l'expression des gènes des complexes majeurs d'histocompatibilité (MHC) de classe I et II, induisant en temps normal l'activation des cellules NK, mais l'inhibition de l'activité des cellules NK par TGF $\beta$  contribue à la progression tumorale. Enfin, TGF $\beta$  influence la signalisation des cellules tumorales, pouvant ainsi inhiber ou promouvoir la progression tumorale et la formation de métastases, selon le contexte de la stimulation. Abréviations : GMCSF, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ; HGF, hepatocyte growth factor ; IL, interleukin ; MCP1, macrophage chemoattractant protein 1 ; MIP, macrophage inflammatory protein ; MST1, macrophage stimulating 1 ; TNF, tumor necrosis factor. (Bierie and Moses, 2006).

Une niche est une unité anatomique structurale entourant des cellules souches, mais peut être aussi définie comme une unité fonctionnelle permettant des interactions complexes et dynamiques avec des cellules souches (Scadden, 2006). Les niches sont des déterminants majeurs du microenvironnement et peuvent être ciblées pour éliminer les CSCs, principalement localisées dans ces microenvironnements (Binello and Germano, 2011).

### 4.3.1. Niche périvasculaire

La coimplantation intracrânienne de gCSCs avec des cellules endothéliales accélère de façon significative la croissance de la tumeur alors que le traitement de xénogreffes de glioblastomes avec un agent anti angiogénique (Bevacizumab, anti-VEGF) réduit considérablement la taille de la tumeur (Calabrese et al., 2007). Cette influence des cellules endothéliales sur la croissance tumorale suggère que la signalisation entre ces deux types de cellules dans la niche périvasculaire joue un rôle important dans la progression tumorale. Cette observation fait écho aux niches vasculaires du tissu sain où les cellules endothéliales régulent la fonction des NSCs (Shen et al., 2004) ainsi qu'à la forte angiogenèse observée dans les glioblastomes (Folkerth, 2004; Plate et al., 1992).

Les gCSCs interagissent avec les **cellules endothéliales** des vaisseaux sanguins, permettant le maintien de leur « état souche » et la propagation de la tumeur, notamment via la sécrétion paracrine de **facteurs de croissance endothéliaux** (Calabrese et al., 2007). D'autre part, les cellules gCSCs elles-mêmes entretiennent cette niche périvasculaire par la sécrétion de **facteurs angiogéniques**, tels que VEGF (vascular endothelial growth factor) ou

CXCL12/SDF-1 (stromal derived factor-1) stimulant la croissance des cellules endothéliales (Bao et al., 2006b; Folkins et al., 2009).

Les **péricytes** sont recrutés par les cellules endothéliales ; ils stabilisent la membrane basale des vaisseaux sanguins et sont impliqués dans la prolifération de structures microvasculaires, favorisant ainsi l'angiogenèse (Wesseling et al., 1995). D'autre part, la dissociation de ces péricytes des cellules endothéliales perméabilise la vascularisation aux cellules tumorales et facilite ainsi la formation de métastases (Hashizume et al., 2000).

### 4.3.2. Niche hypoxique

La diminution de la pression partielle en oxygène ( $P_{O_2}$ ) induit l'expression du facteur de transcription **HIF-1 $\alpha$**  (hypoxic inducible factor -1 alpha) ; la translocation de ce facteur dans le noyau et son association avec le facteur HIF-1 $\beta$ , exprimé de façon ubiquitaire, induit l'expression de nombreux gènes impliqués entre autres dans la prolifération et le degré de différenciation (Li et al., 2009c; Seidel et al., 2010). On observe ainsi l'augmentation de l'expression des marqueurs de cellules souches (CD133, Oct4, Sox2) et la diminution des marqueurs de différenciation (GFAP) ; les taux de prolifération et le potentiel d'auto-renouvellement des gCSCs sont également plus importants (Heddleston et al., 2009; McCord et al., 2009; Soeda et al., 2009), l'angiogenèse est stimulée via l'expression du facteur VEGF (Li et al., 2009c) ainsi que la voie de signalisation de Notch (Keith and Simon, 2007). L'importance de la niche hypoxique dans le caractère souche des cellules est également mis en évidence par l'acquisition de telles propriétés par des cellules différenciées mises en conditions hypoxiques (Heddleston et al., 2009) ainsi qu'avec le maintien et la régulation des NSCs dans ces mêmes conditions (De Filippis and Delia, 2011).

Le degré d'hypoxie des cellules influence l'expression de facteurs HIFs, de façon tout à fait réversible (ce qui fait par ailleurs de ce facteur un très bon indicateur de la  $P_{O_2}$ ). Selon la sévérité de l'hypoxie, l'expression des facteurs HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$  varie. L'augmentation de la quantité HIF-1 $\alpha$  lorsque la  $P_{O_2}$  diminue est observée à la fois dans les gCSCs et les NSCs ; par contre HIF-2 $\alpha$  est exprimé uniquement dans les gCSCs et est corrélé avec la survie des patients (Li et al., 2009c).

La présence de CSCs à la fois dans les zones périvasculaires et hypoxiques met en évidence la présence d'au moins deux niches distinctes contenant les gCSCs bien que le facteur VEGF soit sécrété par les cellules présentes dans ces deux zones.

Outre l'induction des propriétés souches et tumorigéniques des gCSCs, l'expression des facteurs HIF entraîne un changement métabolique de la cellule qui utilise alors la glycolyse aérobie : il s'agit de l'**effet Warburg** (Figure 28). Initialement identifié dans les tissus néoplasiques (Warburg, 1956; Warburg et al., 1927), l'effet Warburg est également présent dans les tissus sains contenant des cellules se divisant rapidement, telles que les cellules ES et les lymphocytes : les besoins énergétiques des cellules en expansion rapide sont préférentiellement satisfaits par la production d'ATP via la voie métabolique de la glycolyse aérobie. Le détournement de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie, initié par l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase par HIF1, au profit de la glycolyse génère la formation de lactate, toxique pour la cellule. L'excrétion de l'acide lactique par le transporteur MCT4 (mono carboxylic transporteur 4), s'accompagne d'une acidification du milieu extracellulaire et d'une alcalinisation du milieu intracellulaire (Chiche et al., 2009).

Le **lactate** produit par les CSCs et excrété dans le milieu extracellulaire régule l'activité des cellules endothéliales : le lactate est importé dans la cellule endothéliale via le transporteur MCT1, activant la transcription du gène de l'interleukine 8 par NF- $\kappa$ B et stimulant ainsi la migration et la prolifération des cellules endothéliales dans un processus angiogénique (Vegran et al., 2011).

L'**acidification du milieu extracellulaire**, ou stress acide, joue aussi un rôle dans l'induction et le maintien des propriétés souches des cellules (expression de marqueurs, auto-renouvellement et prolifération cellulaire) ainsi que dans la sécrétion de facteurs antigéniques tels que VEGF (Hjelmeland et al., 2011; Xu et al., 2002). Ceci passe notamment par l'augmentation de l'expression de HIF2 $\alpha$  (Heddleston et al., 2009) et par l'expression de certains de ses gènes cibles dont Oct4, Glut1 et SerpinB9 impliqués dans le phénotype des cellules souches et la croissance des cellules tumorales (Covello et al., 2006). Le rôle du stress acide dans la croissance tumorale a également été mis en évidence dans un modèle de cancer du sein où l'élévation du pH, sans modifier l'hypoxie, a permis de réduire l'invasion de la tumeur (Robey et al., 2009).



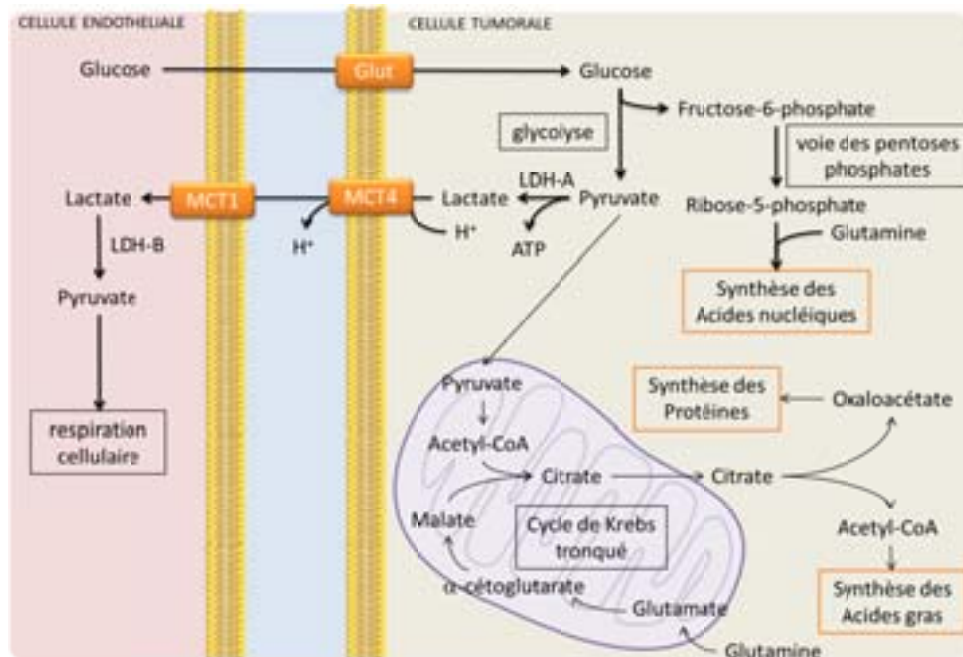


Figure 28 : Effet Warburg.

Le détournement du pyruvate de la mitochondrie pour produire de l'ATP permet i) de détourner le cycle de Kerbs pour produire rapidement des acides aminés et acides gras, ii) de produire du lactate utilisé par les cellules endothéliales et iii) d'acidifier le microenvironnement, processus impliqué dans l'invasivité tumorale.

#### 4.3.3. Niche d'invasivité

La désorganisation et l'invasion de la matrice extracellulaire sont des prérequis cruciaux pour la formation de métastases et de zones d'invasion des cellules tumorales ; ceci dépend notamment de l'expression de molécules d'adhésion et d'enzymes de dégradation de la matrice. Les propriétés mécaniques de la matrice peuvent être remodelées directement par les cellules tumorales, permettant sa déstructuration et sa colonisation par les cellules. On note ainsi le rôle des **intégrines** qui assurent la liaison entre la cellule et la matrice extracellulaire, ou d'autres ligands, et mettent ainsi en place la base des tensions mises en jeu lors des mouvements cellulaires ; les intégrines sont d'ailleurs étudiées comme cibles thérapeutiques dans plusieurs types de cancers (Tucker, 2006).

Les cellules tumorales agissent également de façon indirecte sur la matrice extracellulaire en recrutant des cellules saines (macrophages, fibroblastes, astrocytes) et en stimulant leur sécrétion paracrine de **métalloprotéinases** (MMPs), notamment les gélatinases MMP-2 et MMP-9 capables de dégrader le collagène de type IV. La plupart des cellules associées à la tumeur sécrètent à la fois le précurseur des MMP (proMMP) ainsi que l'activateur membranaire de ces facteurs, MT-MMP (membrane-type MMP) (Okada et al., 1995) . La coculture de cellules de glioblastome et de fibroblastes a montré que l'expression de ces deux



éléments est stimulée par l'EMMPRIN (extracellular matrix MMP inducer), présent à la surface de cellules tumorales et dont l'expression est corrélée avec la progression et l'invasion tumorales (Nakada et al., 1999; Sameshima et al., 2000). De façon indépendante, il a également été montré, dans des cocultures de cellules de glioblastome et d'astrocytes, que l'activation de proMMP2 en MMP2 est stimulée par la sérine protéinase Plasmine. Dans ce cas, la conversion du facteur proMMP2 en MMP2 passe par l'activation du facteur uPA (urokinase-type plasminogen activator, sécrété à la fois par les cellules de glioblastome et les astrocytes) via sa liaison à son récepteur uPAR (exprimé par les astrocytes), permettant la conversion du plasminogène (sécrété par les cellules tumorales) en Plasmine (Le et al., 2003). Ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs : l'activité enzymatique de la Plasmine pourrait nécessiter la présence de MT-MMP afin d'activer le facteur MMP.

D'autre part, les astrocytes sécrètent des **facteurs neurotrophiques** dont TGF $\alpha$  (transforming growth factor alpha), CXCL12 (CXC motif ligand 12), S1P (sphingosine-1-phosphate), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) augmentant les capacités d'invasivité des cellules de glioblastome via la déstructuration de la matrice extracellulaire (Hoelzinger et al., 2007).

#### 4.3.4. Niche immunitaire

Au sein des gliomes, les macrophages, ou **cellules microgliales**, comptent pour 5 à 20 % des cellules de la masse tumorale (Watters et al., 2005). Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la présence de macrophages au niveau de la tumeur ne constitue pas une réaction de défense de l'organisme visant à éliminer les cellules néoplasiques mais plutôt un mécanisme mis en place pour promouvoir la croissance de la tumeur ; une forte densité de macrophages au sein du tissu tumoral est associée à un pronostic plus défavorable pour les patients (Leek et al., 1996). Les cellules microgliales favorisent la croissance tumorale dans plusieurs contextes :

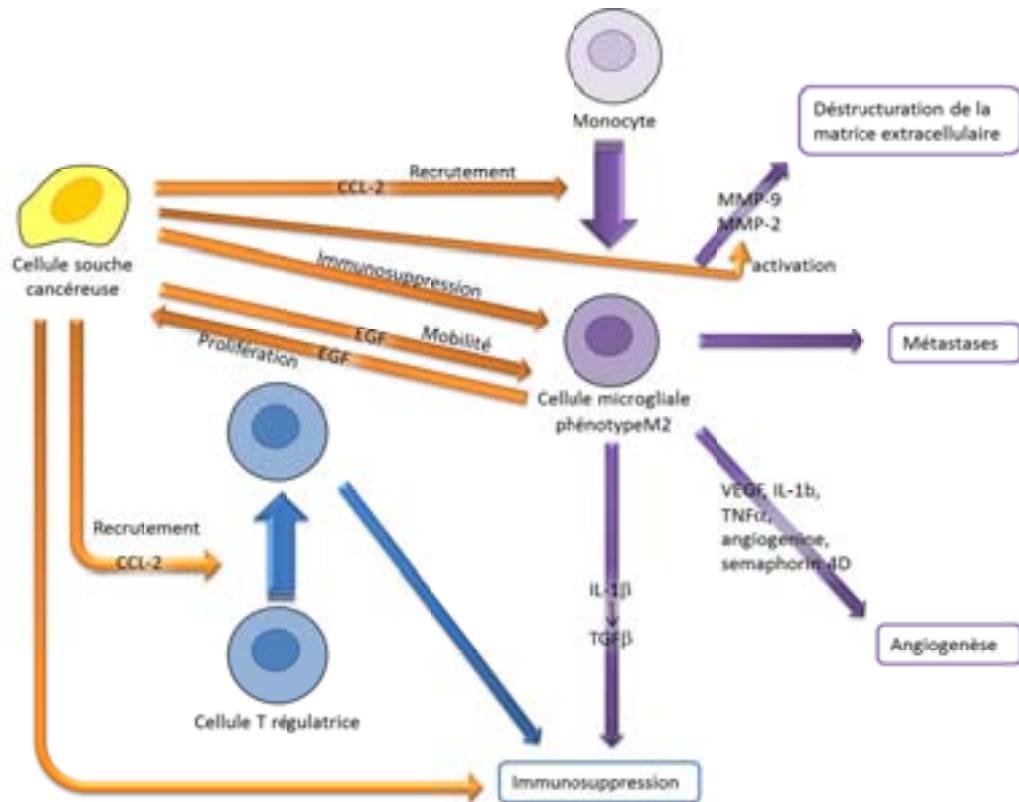
- Dans la niche périvasculaire, ce sont des médiateurs de la formation de métastases (Pollard, 2004)

- Autour des zones de nécrose, ils activent l'angiogenèse via la sécrétion de facteurs proangiogéniques (VEGF, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , angiogenine, semaphorin 4D, MMP-9) (Coffelt et al., 2009; Du et al., 2008b)
- Aux extrémités de la tumeur, les macrophages sont impliqués dans l'invasion des cellules tumorales (Condeelis and Pollard, 2006)

Ceci est permis d'une part par la suppression de la fonction d'effecteurs du système immunitaire et d'autre part par la sécrétion de cytokines et facteurs de croissance permettant aux cellules néoplasiques d'échapper au système immunitaire, de proliférer et de migrer (Watters et al., 2005) (Figure 29). En effet, selon les stimuli extracellulaires, les monocytes peuvent se différencier en macrophages pro-inflammatoires (phénotype M1) ou anti-inflammatoires (phénotype M2). Au sein de la tumeur, le phénotype observé est très proche du **phénotype M2** : les macrophages favorisent la progression tumorale par leur incapacité à activer les cellules T du système immunitaire mais aussi par la sécrétion de facteurs pro-tumorigéniques tels que TGF $\beta$ , IL-10 ou les métalloprotéases (Chong et al., 1999; Pollard, 2004).

Le microenvironnement immunitairement favorable aux gCSCs serait mis en place par les gCSCs elles-mêmes (Figure 29) via

- la sécrétion de facteurs chimio-attractants (MCP-3 monocyte chemoattraction protein 3, CCL2 macrophage chemoattractant protein 1) permettant de recruter des macrophages anti-inflammatoires (Okada et al., 2009; Zhang et al., 2012)
- la suppression des fonctions inflammatoires de ces macrophages par la sécrétion de cytokines immunosuppressives (IL-10, IL-4, IL-6, TGF $\beta$ , EG2) (Albesiano et al., 2010)
- le recrutement de cellules T régulatrices (Treg) à la périphérie de la tumeur (Grauer et al., 2007)



**Figure 29 : Interactions de la cellule souche cancéreuse avec les cellules de la niche immunitaire.**

Le microenvironnement immunitaire favorable aux gCSCs serait mis en place par les gCSCs elles-mêmes par i) le recrutement de macrophages antiinflammatoires via la sécrétion de facteurs chimioattractants CCL-2, ii) la sécrétion de cytokines immunosuppressives et iii) le recrutement de cellules T reg via la sécrétion de CCL-2. Ces cellules recrutées par les gCSCs sont également impliquées dans la stimulation de l'angiogenèse, dans la déstructuration de la matrice extracellulaire et la formation de métastases.

Les mécanismes de résistances des gliomes peuvent être divisés en 3 processus : un processus d'activation anormale des cellules immunitaires, un processus de dérégulation de l'immunité cellulaire et un processus de sécrétion de facteurs immunosuppresseifs (Albesiano et al., 2010); dans chacun de ces processus, les gCSCs ont acquis des propriétés immunomodulatrices, leur permettant d'évoluer dans un environnement immunoprivilégié.

*i. Processus d'activation cellulaire anormale*

Les gCSCs expriment à leur surface des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I ainsi que la molécule costimulatrice inhibitrice B7-H1 mais pas les molécules du MHC de classe II CD40 ou CD80. Cette combinaison de molécules induit

l'apoptose des cellules T, permettant aux gCSCs d'échapper au système immunitaire (Dong et al., 2002; Wei et al., 2010a).

### *ii. Processus de dérégulation de l'immunité cellulaire*

Les gCSCs sont également capables d'étendre le pool de cellules T régulatrices (Treg), de supprimer la prolifération et d'induire l'apoptose des cellules T (Wei et al., 2010a). L'imagerie *in vivo* de cellules Treg dans un modèle de cellules souches hématopoïétiques a pu mettre en évidence le rôle essentiel de ces cellules en tant que médiatrices des avantages immunitaires des cellules souches, leur conférant un environnement immunosuppresseur et corroborant le concept de niche immunitaire entourant les cellules souches normales (Fujisaki et al., 2011). L'effet immunosuppresseur des cellules Treg passe en partie par l'expression de l'enzyme hème oxygénase-1 dont l'activité génère du monoxyde de carbone, responsable de l'inhibition de la sécrétion d'interleukine 2 et donc de la prolifération des cellules T (El Andaloussi and Lesniak, 2007; Pae et al., 2004).

### *iii. Processus de sécrétion de facteurs immunosuppresseurs*

Les gCSCs sécrètent plusieurs cytokines dont TGF- $\beta$  (tumor growth factor beta), PGE<sub>2</sub> (prostaglandine E<sub>2</sub>), CCL2 (chimiokine ligand 2) et Galectine 3 (Wei et al., 2010a). TGF- $\beta$  pourrait être impliqué dans la prolifération des cellules Treg (Wei et al., 2010a), PGE<sub>2</sub> diminue l'expression du MHC de classe II et active la prolifération des cellules Treg (Albesiano et al., 2010), CCL2 est un chimioattractant pour les cellules Treg possédant le récepteur CCR2 (Jordan et al., 2008), Galectine 3 appartient à une famille de molécules d'adhésion ayant une affinité pour les  $\beta$ -galactosides, exprimés dans les gliomes et est impliquée dans l'induction de l'apoptose des cellules T (Peng et al., 2008).

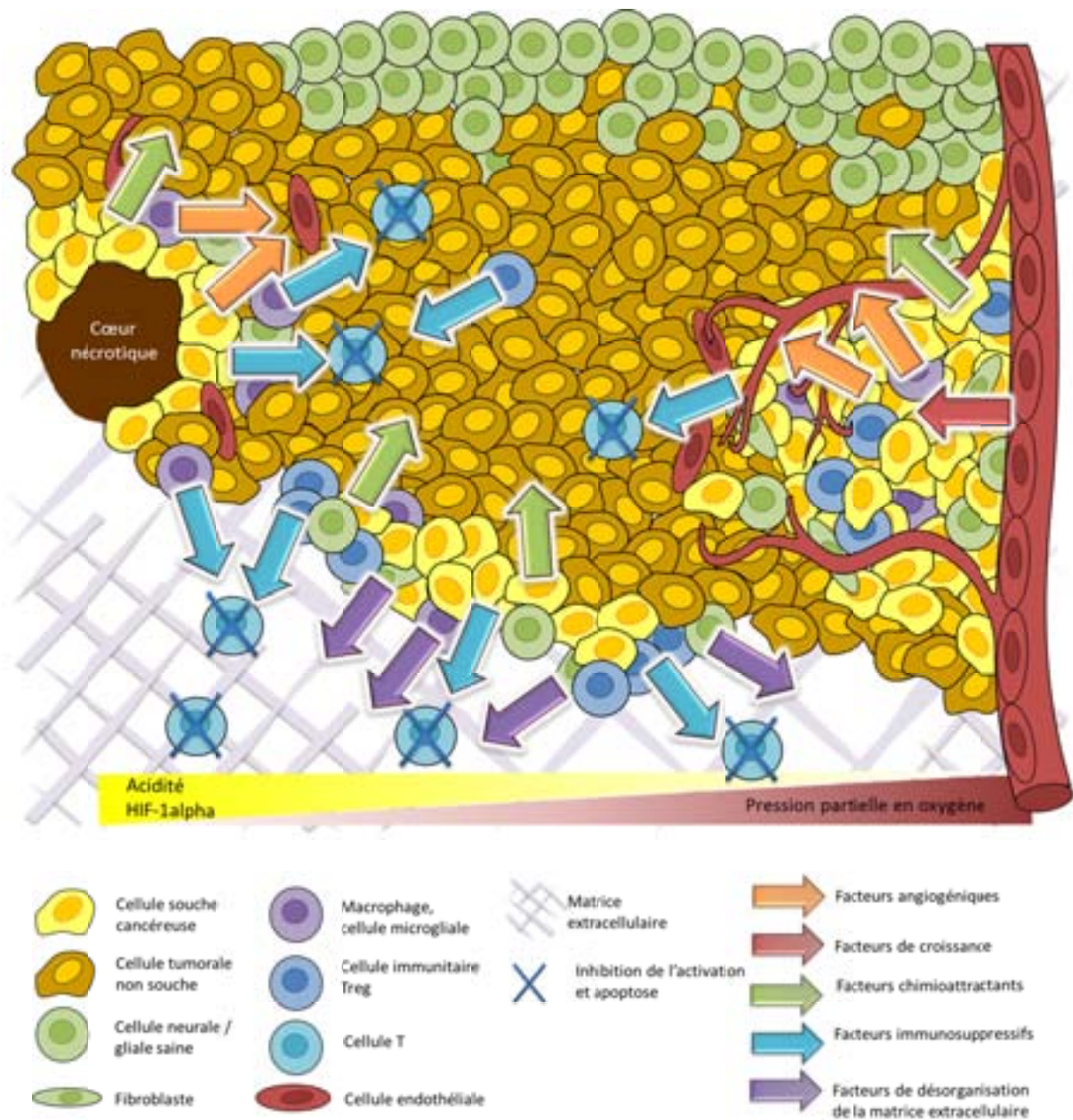


Figure 30 : Microenvironnement tumoral et interactions entre les différentes cellules.

Ces niches procurent également aux cellules tumorales une protection vis-à-vis des agressions de l'environnement, dont la chimio- et la radiothérapie (Dick and Lapidot, 2005; Garcia-Barros et al., 2003).





### 5.1. Radiorésistance

Suite à une irradiation, les gCSCs ont des mécanismes de réparation de l'ADN plus efficaces que les cellules différenciées de la masse tumorale : l'activation préférentielle des points de contrôle des lésions de l'ADN et l'augmentation de la capacité de réparation de l'ADN. Le groupe de Rich a en effet mis en évidence que la fraction des gCSCs est enrichie après irradiation et que celles-ci conservent leurs capacités de différenciation *in vitro* et de tumorigénicité *in vivo* (Bao et al., 2006a).

Suite à une radiation ionisante, les gCSCs montrent une activation des points de contrôles de réparation de l'ADN via la phosphorylation activatrice de protéines telles que **ATM** (ataxia telengectasia mutation), **Rad17** (protéine régulatrice cruciale du point de contrôle des lésions de l'ADN), **Chk1** et **Chk2** (checkpoint kinases 1 et 2) de façon préférentielle dans ces cellules ; l'activation de ces protéines induit l'arrêt du cycle cellulaire (activation de p53 et inactivation de kinases cyclines dépendantes), permettant la réparation des cassures double brin de l'ADN et ainsi l'échappement aux mécanismes apoptotiques (Bao et al., 2006a). D'autres voies de signalisation essentielles des cellules souches sont activées par les radiations ionisantes des gCSCs, parmi lesquelles **Wnt/ $\beta$ -caténine** (Kim et al., 2012), **Notch** (Wang et al., 2010a), **Sonic Hedgehog/Gli** (Clement et al., 2007), **Akt** (Li et al., 2009a), **Bmi-1** (Facchino et al., 2010) ou encore la perte du suppresseur de tumeur **PTEN** (Jiang et al., 2007). L'activation de ces voies de signalisation non seulement promeut le caractère souche des cellules mais permet également de tolérer les altérations de l'ADN si celles-ci ne sont pas réparées (Rich, 2007).

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules tumorales et les gCSCs sont intégrées dans un microenvironnement leur conférant des propriétés de résistance particulières. La présence de gCSCs dans des **niches hypoxiques** leur apporte une protection supplémentaire face aux radiations ionisantes. En effet, dans la cellule, l'oxygène réagit avec les radicaux libres pour former les **ROS** (Reactive Oxygen Species :  $\text{OH}^\circ$ ,  $\text{HO}_2^\circ$ ,  $\text{ROO}^\circ$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ...) responsables du stress oxydant ; lors d'une radiothérapie, ces ROS sont les médiateurs de l'effet des radiations ionisantes sur les dommages causés à l'ADN.

## 5.2. Chimiorésistance

La surexpression de la **MGMT**, impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN, peut être observée dans les cellules différenciées de la masse tumorale (voir point I-2.1.3 page 20) et l'analyse des transcrits de gCSCs montre une forte augmentation de l'expression de cette enzyme, indiquant l'importance de ce mécanisme de résistance dans les gCSCs (Liu et al., 2006). Des substrats synthétiques de MGMT ( $O^6$ -methylguanine,  $O^6$ -benzylguanine) ont été testés afin de diminuer le contenu cellulaire de MGMT active avant la chimiothérapie mais cette stratégie a révélé une myélotoxicité (Quinn et al., 2005; Quinn et al., 2002).

L'un des principaux mécanismes de résistance intrinsèque des gCSCs aux agents chimiothérapeutiques est la surexpression de transporteurs d'efflux conférant un phénotype de « **multidrug resistance** » (MDR) aux cellules. Les molécules chimiques sont alors transportées, activement et de façon non spécifique, à travers la membrane plasmique via les **transporteurs ABC** (ATP binding cassette). Ces protéines ABC ont un rôle important en tant que transporteurs de composés hydrophiles et hydrophobes à travers le placenta et l'intestin (rétention de drogues dans le lumen) et au niveau de la barrière hématoencéphalique afin de protéger les cellules d'effets cytotoxiques. Les gCSCs montrent une surexpression des transporteurs ABCB1 (glycoprotéine P, MDR-1), ABCC1 (MRP1) et ABCG2 (BCRP1) (Dean et al., 2005). Le transporteur ABCB1 est impliqué dans l'efflux de la Doxorubicine, l'Ectoposide (VP16), la Carboplastine, l'Erlotinib (inhibiteur de l'EGFR), la Vincristine et le BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) et le transporteur ABCG2 dans la résistance au Témzolomide, à la Carboplatine, au Paclitaxel (Taxol) et à l'Ectoposide (VP16) (Ejendal and Hrycyna, 2002). Jusqu'à ce jour, les tentatives d'utilisation d'inhibiteurs (parmi lesquels Reserpine, Verapamil, Cyclosporine) des transporteurs ABC en tant que sensibilisateurs des cellules inductrices de tumeur ont échoué, car soit sont inefficaces à des doses non toxiques, soit montrent une activité pharmacocinétique non spécifique (interaction entre l'agent chimiothérapeutique et l'inhibiteur du transporteur ABC), soit affectent l'élimination des agents chimiothérapeutiques du plasma, soit induisent des dommages aux cellules souches normales (Schmalz et al., 2011). Un autre mécanisme d'élimination des agents chimiothérapeutiques par la cellule est leur accumulation dans des **microvésicules** (point II-4.2.4.2.2) permettant leur élimination de la cellule (Shedden et al., 2003), leur séquestration dans des vésicules intracellulaires, la modification de la cible cellulaire ou encore



l'inactivation de la molécule par un accroissement de sa métabolisation (Gottesman et al., 2006).

D'autre part, de la même façon que pour les cellules souches normales, les CSCs sont en général en état de **quiescence**, i.e. elles n'entrent pas dans le cycle cellulaire et restent en phase stationnaire G0 (Figure 32). Les chimiothérapies et radiothérapies conventionnelles ciblent les cellules en prolifération et nécessitent l'activation du cycle cellulaire pour déclencher l'apoptose ; la quiescence des CSCs est donc un mécanisme de résistance aux thérapies ciblant l'ADN.

### **5.3. Résistance à l'apoptose**

Les mécanismes de résistance aux agents chimiothérapeutiques des gCSCs sont renforcés par une **moindre sensibilité aux stress apoptotiques** dus aux faibles niveaux d'expression de Caspases (notamment **Caspase 8**) médiant l'apoptose (Capper et al., 2009) et à la surexpression d'un inhibiteur de la voie NF- $\kappa$ B (tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced protein 3 TNFAIP3, aussi appelé **A20**) (Hjelmeland et al., 2010).

D'autre part, les gCSCs **répondent faiblement à l'apoptose extrinsèque** (Capper et al., 2009). Dans un environnement normal, l'apoptose extrinsèque est activée par le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) via la liaison de ligands proapoptotiques, FasL et TRAIL, sur leurs récepteurs à la surface de la cellule, respectivement Fas et DR4/DR5 (Huang et al., 1999; MacFarlane et al., 1997). Ces voies de signalisation induisent le recrutement de FADD (Fas associated death domain) et de la procaspase 8 dans le complexe DISC (death inducing signaling complex) et permettent ainsi la conversion de la procaspase 8 en caspase 8 (Muzio et al., 1998) ; dans le cytoplasme, la caspase 8 active les caspases effectrices 3, 6 et/ou 7 impliquées dans l'apoptose.

Ces effets sont amplifiés par la surexpression dans les gCSCs de **molécules anti-apoptotiques** (Bcl-2, FLIP, BCL-XL) et d'**inhibiteurs de protéines pro apoptotiques** (XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, Survivine) (Liu et al., 2006) qui agissent via l'inhibition des Caspases 3, 7 et 9 (Schimmer, 2004).

### III. Vers de nouvelles voies thérapeutiques

Depuis la mise en évidence des CSCs, leurs propriétés d'invasivité et de résistance aux thérapies classiques ainsi que leur capacité à régénérer la tumeur font de ces cellules un sujet d'étude de choix et les cibles du développement de nouvelles thérapies dans de nombreux cancers. La complexité et la richesse des interactions intercellulaires ainsi que du microenvironnement entourant les cellules tumorales permettent à ces cellules de pouvoir s'adapter rapidement à des changements de leur biologie induits par divers agents chimiques bloquant l'une ou l'autre voie de signalisation. Ainsi, la culture des gCSCs dans des conditions induisant la différenciation fait apparaître des marqueurs de cellules différenciées à la surface des cellules pendant quelques jours (4 jours) puis l'expression de certains d'entre eux (NF,  $\beta$ -tubulin III, GFAP) diminue ; ceci a été interprété comme une capacité de ces cellules à résister à la différenciation (Gunther et al., 2008; Zhang et al., 2006a). Afin de pouvoir empêcher la cellule de trouver des voies d'échappement aux thérapies appliquées, une stratégie à adopter pourrait être l'inhibition de plusieurs voies de signalisation en même temps.

Une étude récente portant sur l'expression différentielle du protéome membranaire de cellules d'astrocytomes de grades III et IV, comparé à du tissu cérébral obtenu lors de chirurgies de patients épileptiques, a mis en évidence la modification des niveaux d'expression de protéines impliquées dans la signalisation calcique (Polisetty et al., 2012b) ; cette dérégulation de l'expression des protéines de liaison du calcium a également été identifiée au niveau du transcriptome (Dong et al., 2010). Ceci est corrélé avec l'implication de la signalisation calcique dans les divers aspects de la tumorigenèse : mobilité des cellules, angiogenèse, génotoxicité, transcription, différenciation, régulation du cycle cellulaire, apoptose (Monteith et al., 2007). L'omniprésence du calcium dans la vie de la cellule et des cellules tumorales, ainsi que dans le microenvironnement tumoral, témoigne de l'importance des conséquences que peuvent avoir des altérations de l'expression de protéines participant à la signalisation calcique. D'autre part, il a été montré que la sensibilité au calcium des cellules ayant un phénotype MDR est différente de celle des cellules sensibles aux molécules chimiques (Sulova et al., 2005).

L'échec des chimiothérapies actuelles, principalement dû au phénotype MDR des CSCs, a poussé différentes équipes à explorer la dérégulation du système calcique en synergie avec des agents chimiques classiques. L'utilisation d'inhibiteurs des canaux calciques ou de la Calmoduline (CaM), principal régulateur de l'activité des protéines de la signalisation calcique selon la concentration en calcium de la cellule (voir Chapitre 2, point I-3.3.3), permet ainsi de contrer la surexpression des transporteurs ABC et d'augmenter l'accumulation des molécules chimiques cytotoxiques dans la cellule (Tsuruo et al., 1982; Tsuruo et al., 1983).



**Figure 32 : Cycle cellulaire et transitions de phases.**

Le cycle cellulaire est découpé en 4 phases (G1, S, G2, M) et 1 phase de quiescence des cellules (G0). Les transitions de phase sont régulées par l'accumulation de cyclines et de kinases dépendantes de ces cyclines (Cdk). Le complexe Ca<sup>2+</sup>/CaM intervient à l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire depuis la phase G0, au cours de la phase G1 et au niveau de la transition G1/S ainsi qu'au niveau de la transition G2/M, de la progression et de la sortie de la mitose. Schéma réalisé d'après (Kahl and Means, 2003).

Le système calcium / CaM a été reconnu comme cible thérapeutique potentielle il y a plus de 25 ans (Hait and Lazo, 1986) mais est pourtant aujourd'hui sous exploité, probablement du fait de la multiplicité des cibles de CaM dans la cellule (Yap et al., 2000). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de CaM a été testée avec succès par quelques équipes sur des cellules tumorales, au niveau de l'inhibition de la croissance tumorale par interférence avec le cycle cellulaire (Schuller et al., 1991), de l'induction de l'apoptose ou encore de la réversion du phénotype MDR et de la sensibilisation des cellules aux agents chimiothérapeutiques. Le

Tamoxifène est un antagoniste des récepteurs à l'estrogène (RE) utilisé dans le cancer du sein mais a également un effet cytotoxique, indépendamment des RE, en se liant à CaM ; le groupe de Luis Villa a montré que l'utilisation d'antagonistes de CaM (composés W7 et TFP) permet de sensibiliser *in vitro* les cellules au Tamoxifène et d'induire l'apoptose de façon synergique dans des cellules tumorales épithéliales (Frankfurt et al., 1995). Un autre antagoniste de CaM, dérivé alcaloïde bisbenzylisoquinoline (EBB), a été utilisé comme inhibiteur du phénotype MDR et potentialisateur de la doxorubicine dans des cellules de cancer du sein ; l'addition de cet antagoniste permet en effet non seulement d'inhiber la protéine P-gp mais également d'interférer avec la prolifération du cycle cellulaire, arrêté en phase G2/M (Figure 32), et d'augmenter l'effet apoptotique de la Doxorubicine (Liu et al., 2010a). Le blocage chimique G2/M est irréversible et induit des cassures double brin de l'ADN ainsi que des désordres chromosomiques importants (Sorenson and Eastman, 1988). L'utilisation d'inhibiteurs de CaM permet donc de **potentialiser l'effet d'agents chimiothérapeutiques** ciblés et d'obtenir un bénéfice thérapeutique en limitant la toxicité de ces agents sur les tissus sains.

L'inhibition de CaM a également été considérée comme une thérapie à part entière, permettant de cibler les protéines directement impliquées dans la tumorigenèse, dont K-ras (Villalonga et al., 2001), l'EGFR (Li et al., 2004a) ou le récepteur aux androgènes Erb2 (Li et al., 2004b). L'activation ainsi prolongée des voies de signalisation de K-ras et ERK1/2 induit l'accumulation de p21<sup>WAF</sup>, inhibiteur du cycle cellulaire, produisant un arrêt de la prolifération cellulaire dans le cas du cancer colorectal (Shim et al., 2007b). L'utilisation en solo d'un inhibiteur de CaM (Clozapine) a aussi été testée dans le cas de cellules de glioblastome n'exprimant pas PTEN pour inhiber la phosphorylation d'Akt. Cette inhibition empêche d'une part l'expression de la cycline D1, essentielle dans la progression du cycle cellulaire, et induit d'autre part l'augmentation de l'activité de GSK3, responsable de la dégradation de la cycline D1 (Figure 6) ; les cellules s'accumulent alors en phase G1 (Shin et al., 2006).

La plupart des études cherchant à identifier des composés thérapeutiques, inhibiteurs de CaM ou non, se base sur la réponse cellulaire induite par des cellules différenciées de la masse tumorale ou encore sur des lignées de cellules tumorales. Une étude récente a identifié la Thioridazine comme ciblant sélectivement les CSCs dans les leucémies tout en n'ayant aucun effet sur les cellules souches normales. Cet antagoniste de CaM induit la différenciation des CSCs et permet de diminuer la prolifération et la clonogénicité des CSCs de leucémie sévère

(AML) sans induire de cytotoxicité ; les auteurs de cette étude proposent l'utilisation de la Thioridazine en synergie avec un agent antiprolifératif (cytarabine) classiquement utilisé dans le traitement des leucémies. Cependant, cette molécule semble inhiber un récepteur dopaminergique et ne peut donc être utilisée pour cibler les gCSCs (Sachlos et al., 2012).

L'ensemble de ces études met en évidence la non-équivalence des inhibiteurs de CaM dans leur mode d'action (induction de la différenciation, de l'arrêt du cycle cellulaire, d'une cytotoxicité) et dans les cellules ciblées (CSCs, cellules tumorales non souches). D'autre part, la toxicité de ces molécules sur les tissus sains n'est pas toujours abordée et aucun modèle *in vivo* n'a permis à ce jour de valider ces composés.

### OBJECTIFS

Les CSCs identifiées au sein de différentes tumeurs sont devenues des cibles privilégiées dans l'établissement de traitements thérapeutiques. Leurs propriétés d'auto-renouvellement, de différenciation et de résistance aux différents traitements thérapeutiques classiquement utilisés leur permettent de régénérer la tumeur de façon très agressive ; la compréhension de la physiopathologie de ces cellules et l'identification de traitements capables de les éradiquer ou d'atténuer leur virulence (notamment en induisant leur différenciation) est au cœur de la recherche contre le cancer.

Dans ce cadre, mon projet s'est attaché à identifier des biomarqueurs de gCSCs afin d'une part de caractériser et comprendre leur état physiologique particulier et d'autre part de pouvoir les cibler efficacement dans des thérapies biologiques en exploitant le rôle de la Calmoduline dans la physiologie des CSCs et les promesses de l'immunothérapie dans le traitement des glioblastomes.

*“Biomarkers, or biological markers, are indicators of a biological state; they are "characteristics that are objectively measured and evaluated as indicators of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacologic responses to therapeutic intervention” (NIH, 1998)*

Ces biomarqueurs peuvent éventuellement être utilisés comme outils de recherche, comme cibles thérapeutiques ou encore comme adjuvants thérapeutiques selon leur nature.

Mon travail a porté sur des gCSCs isolées de tumeurs glioneurales malignes, correspondant aux gliomes de grades III et IV de la classification de l’OMS, par l’équipe du Dr Hervé Chneiweiss (INSERM U752, Hôpital Sainte Anne, Paris). Les biopsies tumorales de patients de la Pitié Salpêtrière ont été disséquées, et les cellules ont été mises en culture durant plusieurs mois de façon à ne sélectionner que celles capables de s’auto-renouveler (Figure 17) ; ces cellules ont ensuite été caractérisées pour leur clonogénicité, leur capacité de différenciation et leur capacité à générer une tumeur orthotopique dans des souris immunodéficientes (Patru et al., 2010) ; quatre de ces types cellulaires ont été utilisés au cours de mes recherches (TG01, TG10, TG16 et OB1).

Les objectifs du travail présenté ont été les suivants :

1. Caractériser de nouveaux inhibiteurs de la Calmoduline utilisables en thérapie et identifier des marqueurs de la physiopathologie des gCSCs à travers l’utilisation de ces inhibiteurs
2. Caractériser le protéome membranaire des gCSCs dans le but d’identifier des protéines spécifiques de ce type de cellules qui pourraient être utilisées comme biomarqueurs ou comme cibles thérapeutiques

Au cours de ce travail, les gCSCs ont été comparées à plusieurs types cellulaires :

- Les cellules U-87 MG : lignée cellulaire établie à partir d'un glioblastome. L'utilisation de ces cellules permettra de différencier des propriétés propres aux gCSCs de celles des cellules de la masse tumorale
- Les cellules NSC : cellules souches neurales. Ces cellules primaires seront utilisées pour différencier les gCSCs de cellules saines ayant des propriétés similaires
- Les cellules HEK : lignée cellulaire épithéliale dérivée de cellules embryonnaires de rein humain. Ces cellules seront utilisées en tant que « contrôle » global

## **Chapitre 2**

**Recherche de marqueurs de l'état physiologique des cellules propagatrices de Glioblastome à travers la signalisation calcique et l'étude de la Calmoduline**



## I. Signalisation calcique

Les mécanismes de signalisation cellulaire permettent de transmettre une information depuis la surface de la cellule jusqu'à une ou plusieurs cibles intracellulaires générant un événement cellulaire en réponse au stimulus reçu. Cette information est codée, transmise et décodée au moyen d'un nombre restreint de messagers intracellulaires, parmi lesquels le calcium (Haiech et al., 2011).

Le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) joue un rôle central dans le contrôle de nombreux procédés cellulaires, incluant la contraction musculaire ou le relâchement de neurotransmetteurs pour les plus connus, mais également la fertilisation, la migration cellulaire, la prolifération, la transcription de gènes, l'apoptose, le métabolisme mitochondrial, l'exocytose et bien d'autres (Berridge et al., 1998; Berridge et al., 2000b).

Comme tout signal, le signal calcium peut être divisé en 4 unités fonctionnelles (Haiech et al., 2011) :

- le stimulus, ou premier messenger, module l'entrée et/ou la sortie de calcium (**encodage de l'information**). Cette modulation s'effectue par des mécanismes générateurs (ON) et supprimeurs (OFF) de  $\text{Ca}^{2+}$
- les processus sensitifs du signal calcium permettent le **décodage de l'information**
- les mécanismes de traduction de l'information, permettent d'associer le décodage de l'information à un mécanisme moléculaire agissant dans une cellule donnée dans un état physiologique spécifique
- les **événements cellulaires** activés suite à la traduction de l'information, dont la mobilité, modification du métabolisme, modulation de la prolifération, de la différenciation...

## 1. Le calcium : de la toxicité au messenger incontournable

Le calcium est le 4<sup>e</sup> élément le plus abondant dans l'océan après le sodium, le chlore et le magnésium. Cependant, à de fortes concentrations, le  $\text{Ca}^{2+}$  s'avère toxique pour la cellule : agrégation de protéines et d'acides nucléiques, modification de l'intégrité des lipides membranaires, précipitation des phosphates, ... les premières formes de vie ont donc développé un système leur permettant de maintenir de faibles concentrations cytoplasmiques en  $\text{Ca}^{2+}$ , aux alentours de 100 nM, soit 10 000 à 20 000 fois plus faibles que dans le milieu extracellulaire. Les **pompes calciques** présentes au niveau du plasmalemma des bactéries primitives sont très similaires aux pompes calciques ATPases de la membrane plasmique (PMCA) des eucaryotes et utilisent probablement le gradient de protons ou l'hydrolyse des phosphates comme source d'énergie (Berkelman et al., 1994; Kanamaru et al., 1993).

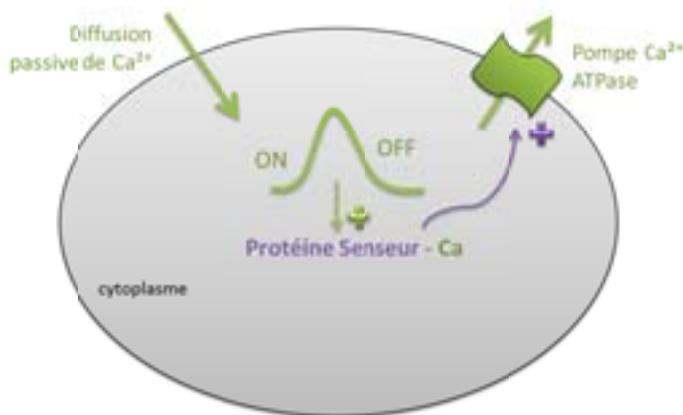
Parmi les ions présents dans le cytoplasme en plus du  $\text{Ca}^{2+}$ , on trouve  $\text{Na}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{K}^+$ . Le potassium et le magnésium sont pompés à l'intérieur de la cellule et par conséquent présents en grande quantité dans le cytoplasme (respectivement  $10^{-1}$  et  $10^{-3}$  M) alors que le calcium et le sodium sont expulsés du cytoplasme pour atteindre des concentrations de  $10^{-7}$  et  $10^{-2}$  M respectivement. À l'intérieur du cytoplasme, une multitude de protéines s'associent aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  pour former des complexes avec des constantes d'associations de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  M ; en conditions physiologiques ces protéines sont donc liées au  $\text{Mg}^{2+}$  mais pas au  $\text{Ca}^{2+}$ . De nombreuses cellules ont de plus des protéines ayant des constantes d'associations de  $10^{-6}$  M pour  $\text{Ca}^{2+}$  ; un simple changement de l'activité de la pompe calcique de la membrane plasmique (procédé peu coûteux en énergie) peut rapidement élever le calcium cytosolique à des concentrations de  $10^{-5}$  M et ainsi permettre sa liaison à des protéines spécifiques. La concentration en  $\text{Mg}^{2+}$  étant déjà élevée, une augmentation rapide et importante du  $\text{Mg}^{2+}$  telle que celle de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  demanderait beaucoup d'énergie, empêchant ainsi l'utilisation du  $\text{Mg}^{2+}$  dans le cas d'activations rapides. La cellule a en effet tiré parti de la rapidité de l'encodage d'information en  $[\text{Ca}^{2+}]$  pour l'utiliser dans de nombreuses voies de signalisation. D'autre part, en tant que cation divalent, le  $\text{Ca}^{2+}$  peut former des complexes plus stables et plus spécifiques que les cations monovalents avec les substances organiques, dont les protéines, sans toutefois former de liaisons covalentes (Schaub and Heizmann, 2008; Williams, 1998). Ces propriétés uniques font du  $\text{Ca}^{2+}$  l'un des seconds messagers les plus utilisés par la cellule, d'autant plus qu'il n'est ni synthétisé ni dégradé.

## 2. Éléments de la signalisation calcique

### 2.1. Premiers systèmes utilisant la signalisation calcique

#### 2.1.1. De la régulation de l'homéostasie à la mise en place des quatre unités fonctionnelles du signal calcium

Selon les conditions environnementales, l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule suivant son gradient électrochimique peut être plus ou moins importante : l'activité de la pompe doit répondre à ces changements afin de maintenir une concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire constante, non toxique. Le contrôle de l'activité de la pompe nécessite un élément « senseur » du  $\text{Ca}^{2+}$ , capable de moduler la vitesse de sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  en fonction de la concentration intracellulaire ; cet élément peut soit être intégré à la pompe calcique soit être indépendant, porté par une **protéine senseur** de  $\text{Ca}^{2+}$ . La combinaison de ces 2 éléments permet à la cellule d'ajuster la concentration en calcium intracellulaire quelques soient les conditions extracellulaires et de réguler l'**homéostasie calcique** (Figure 33).

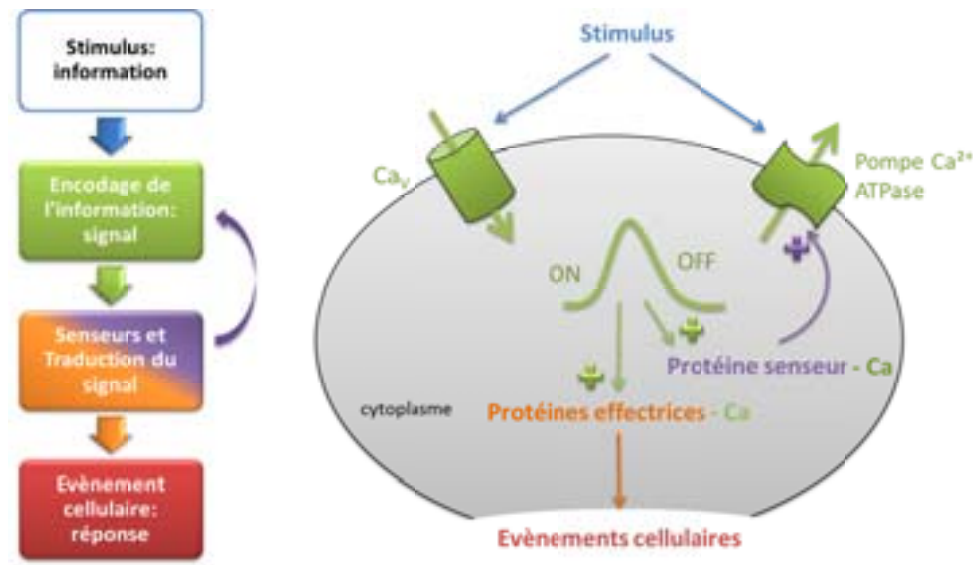


**Figure 33: Régulation de l'homéostasie calcique de la cellule.**  
La modification de l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  active une protéine senseur du  $\text{Ca}^{2+}$  qui en retour module l'activité de la pompe calcique membranaire.

La capacité de la cellule à réguler rapidement l'homéostasie calcique ainsi que les propriétés de l'ion  $\text{Ca}^{2+}$  à lier différentes protéines de façon réversible, ont fait du  $\text{Ca}^{2+}$  un messager cellulaire très tôt dans l'évolution. L'utilisation d'un élément en tant que messager nécessite la mise en place d'un mécanisme actif permettant de modifier l'homéostasie de cet élément en réponse à un stimulus. Dans ce cadre, la pompe calcique ne peut être suffisante car il s'agit d'un mécanisme de terminaison du signal : la pompe n'a aucun contrôle sur l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme.

D'après une étude phylogénétique, le premier canal ionique du plasmalemme était perméable au  $\text{Ca}^{2+}$  et est retrouvé chez de nombreux procaryotes, contrairement à d'autres canaux (Shemarova and Nesterov, 2005). Ce canal présente des propriétés communes aux canaux que l'on retrouve aujourd'hui : il s'agit d'un canal voltage dépendant, sélectif de cations divalents. Aujourd'hui, les **canaux calciques voltage dépendants** des procaryotes sont construits sur le modèle de ce canal primitif, ceux des eucaryotes sont formés d'un assemblage de 4 domaines.

Comme représenté dans la Figure 34, la modulation de l'entrée et sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  de la cellule suite à un stimulus, permet de générer un signal calcium. La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à des **protéines effectrices** module leur activité (en général activation) ; l'implication de ces protéines dans des chaînes métaboliques ou de signalisation génère un changement d'activité de différentes voies de signalisation, permettant de traduire le signal calcium en évènements biochimiques et de générer un **évènement cellulaire** en réponse au stimulus initialement appliqué.



**Figure 34: Schématisation des premiers systèmes utilisant le  $\text{Ca}^{2+}$  comme messenger cellulaire.**

Dans les premières cellules, la signalisation calcique est très simple : un stimulus ouvre les canaux perméables aux ions divalents de la membrane plasmique pendant un court laps de temps, l'influx de calcium dans la cellule permet aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  de se lier à des protéines effectrices et de les activer. La modulation de l'activité de ces protéines permet l'initiation d'évènements cellulaires pendant que l'excédent du  $\text{Ca}^{2+}$  est éliminé du cytoplasme par la pompe calcique.

L'apparition de nouvelles protéines effectrices mais incapables de lier  $\text{Ca}^{2+}$ , a poussé la cellule à favoriser la mise en place d'un système intermédiaire entre le signal et ces nouvelles protéines, à l'image de la protéine senseur régulant l'activité de la pompe calcique. L'apparition d'un motif particulier, le **motif EF-hand**, fut une énorme opportunité (Encart 4).

#### Encart 4 : Motif EF-hand

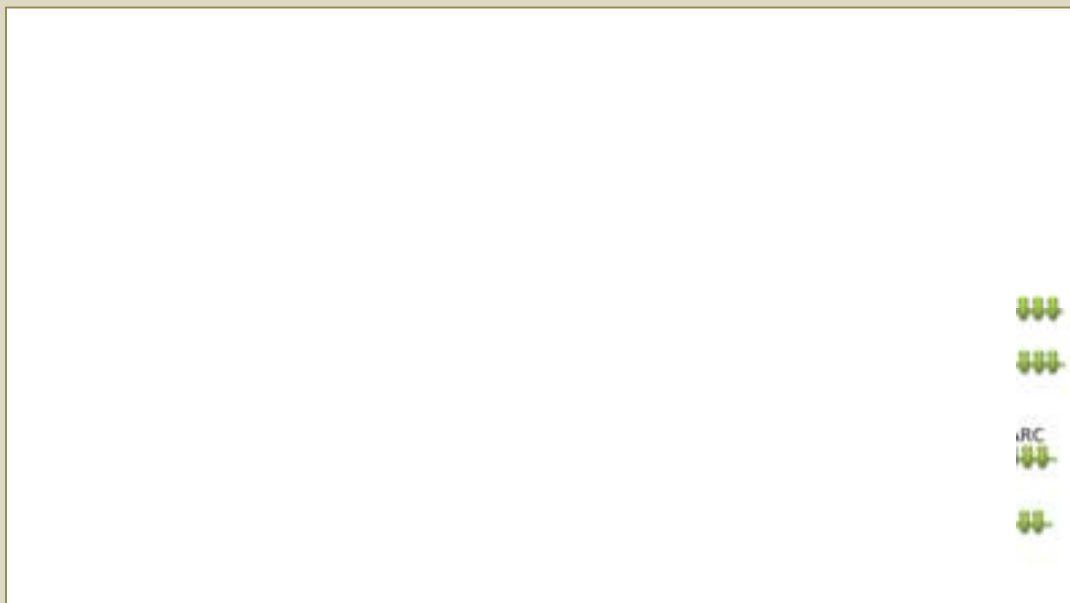
Le motif EF-hand est constitué d'une hélice N terminale (hélice E) suivie d'une boucle centrale de coordination du calcium et d'une hélice C terminale (hélice F) ; l'arrangement tridimensionnel de ces domaines peut être représenté par les doigts d'une main où le pouce et l'index représentent les hélices alpha (Kretsinger and Nockolds, 1973) (Figure 35B).

Ca<sup>2+</sup> lie chaque EF-hand dans un arrangement pentagonal bipyramidal à travers des liaisons ioniques de faible énergie ; l'annotation des résidus de la boucle est basée sur la séquence linéaire des acides aminés constituant cette boucle. Dans la boucle canonique du motif EF-hand le Ca<sup>2+</sup> est coordonné par les atomes d'oxygène des chaînes latérales des résidus 1, 3 et 5 de la boucle (en général résidus Asp, les résidus 3 et 5 peuvent être Asn). Les autres liaisons se font avec l'atome d'oxygène du squelette du 7<sup>e</sup> résidu, une molécule d'H<sub>2</sub>O coordonnée par la chaîne latérale du 9<sup>e</sup> résidu (D, E, S, T ou N) et la chaîne latérale d'un résidu acide (en général Glu) en position 12 (Figure 35C). Le motif EF-hand possède d'autres éléments conservés ne liant pas Ca<sup>2+</sup> : Gly en position 6, un résidu hydrophobe (Ile, Leu, Val) en position 8 (Gifford et al., 2007). D'après ces observations, le motif EF-hand peut être représenté par le patron **Dx[DN]xDGx[ILV][DSTN]x** (Rigden et al., 2011).

Ce motif contient le patron **Dx[DN]xDG** retrouvé dans des boucles appartenant à des structures très diverses mais dont les ligands liant Ca<sup>2+</sup> se superposent très bien (Rigden and Galperin, 2004). La présence de ce patron dans des contextes totalement différents implique soit l'existence d'un épissage alternatif des boucles d'une protéine à l'autre soit une évolution convergente de différents motifs, hypothèse privilégiée aujourd'hui. La base de données ELM (eukaryotic linear motif, (<http://elm.eu.org/infos/news.html>)) regroupe les motifs linéaires impliqués dans des sites fonctionnels de protéines chez les eucaryotes. La comparaison des fréquences d'apparition de plusieurs motifs dans des protéines n'appartenant pas à la même famille met en évidence l'importante représentation du patron Dx[DN]xDG : la moyenne d'apparition de 17 motifs différents de cette base de données est de 9,2 et cette valeur tombe à 7,8 pour les motifs contenant 4 positions définies alors que dans le cas du motif Dx[DN]xDG on obtient au moins 16 instances. Deux particularités de ce motif peuvent expliquer sa formation dans différents contextes : sa séquence riche en résidus aspartiques et sa régularité. De par la définition du patron Dx[DN]xDG, ce motif contient au moins 2 à 3 résidus Asp, sans compter les résidus intervenant dans la coordination de l'ion et situés à 2 résidus de ce motif : l'acide aspartique est répété en tandems. De plus, ce motif est très régulier et pourrait être symbolisé par (Dx)<sub>3</sub> où la position x est souvent occupée par un résidu glycine : le motif Dx[DN]xDG peut très bien avoir évolué à partir d'une répétition de la séquence DG. À ceci s'ajoute la proximité des codons utilisés le plus souvent par la cellule eucaryote pour Asp (GAT ou GAC) et Gly (GGN) permettant d'expliquer l'apparition de Gly dans une séquence riche en Asp. Aujourd'hui, ces différentes particularités du patron Dx[DN]xDG semblent expliquer la fréquence anormale d'apparition de ce motif dans des protéines et structures très différentes. La capacité de ce motif à lier un ion est apportée par i) un espacement suffisant entre les résidus du début et la fin du motif, indépendamment de la variation de la structure secondaire et ii) la présence de résidus acide ou amide, naturellement importants à la surface de la protéine (Rigden et al., 2011).

Aujourd'hui, le génome humain est composé d'environ 300 gènes codant pour des protéines ayant au moins 1 motif EF-hand et regroupées sous le terme « **EF-handome** » (Haiech et al., 2004) (Annexe VIII). La plupart de ces protéines possèdent de 2 à 6 motifs EF-hands agissant en synergie (Figure 35D) ; les protéines ne possédant qu'un motif agissent probablement sous forme d'homo- ou hétéropolymères. Dans la majorité des protéines, ce motif est présenté sous forme de dimère où les 2 motifs EF-hands sont séparés par un court feuillet beta et où l'ensemble de la structure est stabilisée par des interactions hydrophobes entre les hélices (Grabarek, 2006). Cet appariement permet i) de favoriser la structuration des motifs EF-hands et donc d'augmenter leur affinité pour  $\text{Ca}^{2+}$  (Grabarek, 2006) et ii) d'induire une coopérativité entre les 2 motifs, assemblés de façon asymétrique (Maler et al., 2000).

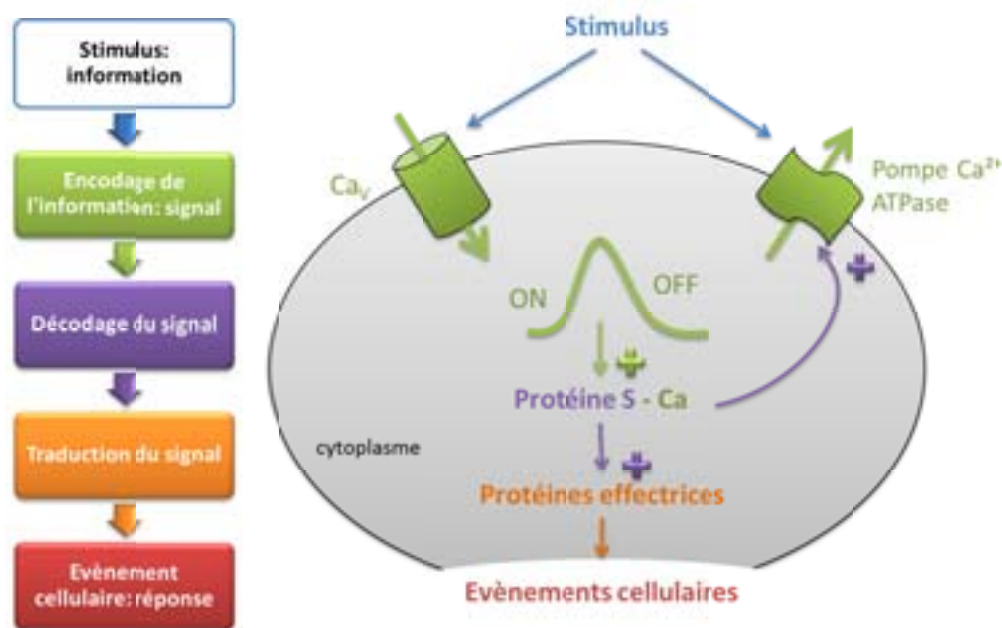
L'une des propriétés clés des protéines régulatrices à motif EF-hand est leur capacité à passer d'une conformation fermée à une conformation ouverte suite à la liaison de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce changement conformationnel s'accompagne de l'exposition d'une surface hydrophobe permettant à la protéine d'acquérir de nouvelles propriétés d'interactions et de réguler l'activité de ses cibles (Herzberg et al., 1986). Ce modèle, connu sous le nom de **modèle « Herzberg-Moult-James »** (HMJ) s'applique à de nombreuses protéines, dont la Calmoduline, et met en évidence l'importance de la flexibilité interhélice des paires de motifs EF-hands (Finn et al., 1995; Grabarek, 2006; Zhang et al., 1995).



e liée au  
boucle de  
ine) à la  
 $^{2+}$  par un  
 $\text{Ca}^{2+}$  ; le  
s avec le

La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  au motif EF-hand modifie la conformation de la protéine (Figure 35A) modulant ainsi la fonction de la protéine en réponse à la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$ . Les changements conformationnels plus ou moins importants suivant la liaison d'une simple molécule de  $\text{Ca}^{2+}$  à une protéine ont fait de ce motif une caractéristique conservée au cours de l'évolution des protéines liant  $\text{Ca}^{2+}$  : ce motif apparaît chez les bactéries, est abondant chez les levures et ubiquitaire dans les organismes multicellulaires. Les bactéries ont ainsi développé une protéine **senseur du  $\text{Ca}^{2+}$**  contenant 4 motifs EF-hands, la **Protéine S** (Swan et al., 1987).

Ce nombre limité d'éléments a permis aux procaryotes d'exploiter le calcium à travers un **système de signalisation calcique** : les fluctuations de  $[\text{Ca}^{2+}]$  sont impliquées dans la régulation des mouvements de bactéries, des réactions de survie ou encore dans la sporulation (Kippert, 1987) (Figure 36).



**Figure 36: Schématisation des 4 unités fonctionnelles du signal  $\text{Ca}^{2+}$  des premiers systèmes de signalisation calcique, I.** Suite à un stimulus, les activités du canal  $\text{Ca}_V$  et de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase sont modifiées, induisant une modification de l'homéostasie calcique de la cellule. La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  aux motifs EF-hand de la Protéine S induit un changement de conformation de cette protéine, lui permettant de décoder le signal calcium et d'interagir avec d'autres protéines du cytoplasme pour traduire le signal calcium en modulant l'activité de protéines effectrices. La modification de ces protéines se traduit ensuite en évènement cellulaire en réponse au stimulus de départ.



### 2.1.2. Contrôles de la signalisation calcique

Le développement des organismes, la nécessité de s'adapter à plusieurs stimuli et donc d'obtenir une réponse différentielle selon le stimulus appliqué à la cellule ont favorisé l'apparition de nouveaux éléments dans chacune des unités fonctionnelles du signal calcium permettant de moduler chaque étape. Ainsi, outre sa fonction d'élément intermédiaire de la signalisation calcique, le senseur du  $\text{Ca}^{2+}$  joue également un rôle dans l'établissement du signal  $\text{Ca}^{2+}$  lui-même. En effet, ce senseur interagit d'une part avec les protéines effectrices mais également avec les protéines d'encodage du signal, modulant leur activité et modifiant ainsi le signal calcique.

Le second type de canal développé par les procaryotes fut le canal potassique  $\text{Ca}^{2+}$  dépendant (**K<sub>Ca</sub>**), sensible à la fois au  $\text{Ca}^{2+}$  et au potentiel de membrane (Franciolini and Petris, 1989). Ce canal permet de compenser la dépolarisation membranaire suivant l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule et ainsi d'inactiver les canaux calciques voltage dépendants et de stopper le flux d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. Il s'agit des premiers **rétrocontrôles**, en plus de la modulation de l'activité de la pompe calcique, établit par la cellule sur la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$ , permettant à la cellule de faire varier  $[\text{Ca}^{2+}]$  tout en restant dans des conditions physiologiques favorables (Figure 37). On voit également apparaître l'échangeur **NCX** permettant d'expulser le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme en utilisant le gradient  $\text{Na}^+$  de façon très efficace. Cet échangeur peut être couplé à une ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dépendante (**NCKX**) (Blaustein and Lederer, 1999; Cervetto et al., 1989; Lytton, 2007).



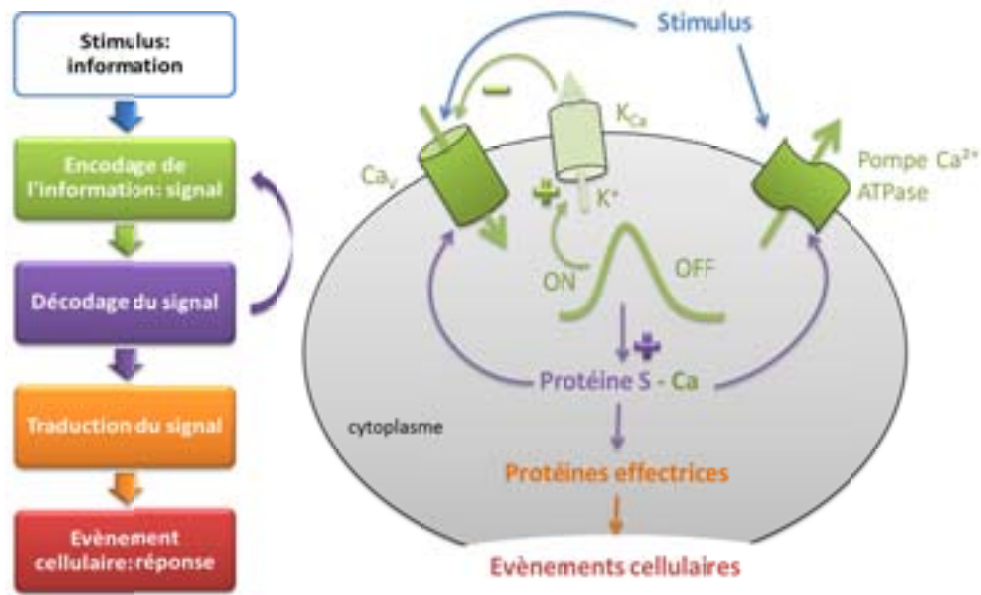


Figure 37: Schématisation des 4 unités fonctionnelles du signal  $\text{Ca}^{2+}$  des premiers systèmes de signalisation calcique, II.

Suite à un stimulus, les activités du canal  $\text{Ca}_V$  et de la pompe  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase sont modifiées, induisant une modification de l'homéostasie calcique de la cellule. L'augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme active le canal  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , inhibant l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule. La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  aux motifs EF-hand de la Protéine S induit un changement de conformation de cette protéine, lui permettant de décoder le signal calcium et d'interagir avec d'autres protéines du cytoplasme pour i) agir en tant que rétrocontrôle sur les mécanismes ON et OFF du signal calcium pour terminer le signal et ii) traduire le signal calcium en modulant l'activité de protéines effectrices. La modification de ces protéines se traduit ensuite en évènement cellulaire en réponse au stimulus de départ.

## 2.2. Complexification du système chez les organismes eucaryotes

### 2.2.1. Compartimentation intracellulaire

L'apparition des eucaryotes, accéléra l'évolution des systèmes de la signalisation calcique. L'acquisition par ces cellules d'un noyau (les théories les plus probables mentionnent une fusion entre une archaebactérie et une eubactérie ou des invaginations de la membrane plasmique) s'accompagna également de la formation d'organelles intracellulaires, divisant le cytoplasme en compartiments spécialisés, chacun d'entre eux ayant sa propre homéostasie calcique et des mécanismes de gestion du  $\text{Ca}^{2+}$  différents. L'un des premiers compartiments à apparaître fut certainement la **mitochondrie**, décrite comme résultant d'une relation endosymbiotique entre les premiers eucaryotes et une protobactérie alpha (probablement *Rickettsia* ou *Paracoccus denitrificans* ou *Rhodospseudomonas*), et apportant à la cellule un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (**mNCX**) et un **uniporteur du  $\text{Ca}^{2+}$**  intracellulaires. D'autre part, l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  via cet uniporteur, impliqué dans le contrôle de l'activité d'enzymes oxydatives et la

synthèse d'ATP, permet de traduire une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme en **production d'énergie** (Nicholls, 2005).

L'origine du réticulum endoplasmique (**ER**) est moins claire mais une homéostasie calcique différente de celle du cytoplasme s'y est développée : au contraire du cytoplasme où le maintien de faibles concentrations est vital, la concentration en calcium de l'ER est plus proche de celle du milieu extracellulaire (de 200 à 400  $\mu\text{M}$  du  $\text{Ca}^{2+}$  libre mais 10 mM de calcium total). Ce second gradient de  $\text{Ca}^{2+}$  a créé un niveau de complexité supplémentaire : l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme ne se fait plus seulement depuis le milieu extracellulaire mais également depuis les compartiments intracellulaires (Figure 39). Afin de séquestrer l'excès du  $\text{Ca}^{2+}$  du lumen de l'ER, un système de protéines spécifiques a été développé. Ces protéines lient le  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de motifs EF-hands avec un Kd de 0,5 à 1 mM de la même façon que la Protéine S. Cependant, contrairement à la Protéine S qui est une protéine senseur de  $\text{Ca}^{2+}$ , la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  peut éventuellement induire un faible changement conformationnel de ces protéines mais insuffisant pour permettre une modification de leurs activités. Ces protéines agissent donc comme de simples réservoirs du  $\text{Ca}^{2+}$  : ce sont des protéines tampon (Encart 5). D'autre part, l'apparition de l'ER s'est accompagnée du développement de nouvelles pompes et canaux permettant les échanges du  $\text{Ca}^{2+}$  entre le cytosol et l'ER.

### 2.2.2. Apparition de la Calmoduline

Au cours de l'évolution, le senseur calcique des bactéries primitives, la Protéine S, n'est pas conservé mais a été remplacé par d'autres protéines senseurs, parmi lesquelles la **Calmoduline** (CaM). CaM a une séquence très proche de la Protéine S et est présente dans tous les organismes eucaryotes. CaM est une petite protéine (148 acides aminés, ~16,8 kDa) composée de 4 motifs EF-hands ; les deux premiers motifs forment le lobe N terminal séparé par un court espaceur flexible du lobe C terminal composé des EF-hands 3 et 4 (Figure 38).



**Figure 38 : Structures de la Calmoduline.**

Structures cristallographiques de la Calmoduline dans sa forme apo (gauche ; code PDB 1DMO) et dans sa forme liée à 4  $\text{Ca}^{2+}$  (droite ; code PDB 1CLL).

De façon surprenante, alors que l'ensemble des composants de la signalisation calcique s'est diversifié au cours de l'évolution, la Calmoduline est au contraire très conservée, non seulement dans sa fonction mais également dans sa structure et sa séquence.

Apparu il y a près de 500 millions d'années, le gène ancestral de la Calmoduline a donné lieu à 3 gènes pour l'ensemble des vertébrés. Au cours de l'évolution, les mammifères se sont séparés des poissons (il y a 450 millions d'années) puis les oiseaux se sont séparés des mammifères (il y a 150 millions d'années). Aujourd'hui, ces gènes existent toujours chez les mammifères mais codent pour 3 protéines identiques à 100 %, les oiseaux ont perdu 2 de ces gènes. Le poisson zèbre contient aujourd'hui 6 gènes codant pour CaM, dérivés des 3 orthologues précurseurs, tous codant pour une même protéine, 100 % identique à celle des autres vertébrés (Friedberg and Rhoads, 2001; Friedberg and Taliaferro, 2005). Chez les champignons, plantes et invertébrés, on observe quelques substitutions d'acides aminés mais la séquence de CaM de *Caenorhabditis elegans* partage 96 % d'identité avec celle des vertébrés (Copley et al., 1999). Le génome d'*Arabidopsis thaliana* contient 7 gènes codant pour 4 isoformes de CaM partageant 89 % d'identité avec la CaM des vertébrés (McCormack et al., 2005). D'autre part, les gènes codant pour CaM chez les mammifères sont situés sur 3 chromosomes différents (14, 19, 2) et on trouve également 6 gènes codant pour des CaM-like protéines, partageant plus de 80 % d'homologie avec CaM : la fonctionnalité de CaM est préservée au maximum en cas de mutations, désordre chromosomique sur un ou plusieurs chromosomes.

Ce haut degré de conservation témoigne de l'importance de CaM dans la cellule et est également essentiel à la préservation de l'interaction de CaM avec des cibles cellulaires de familles très variées.

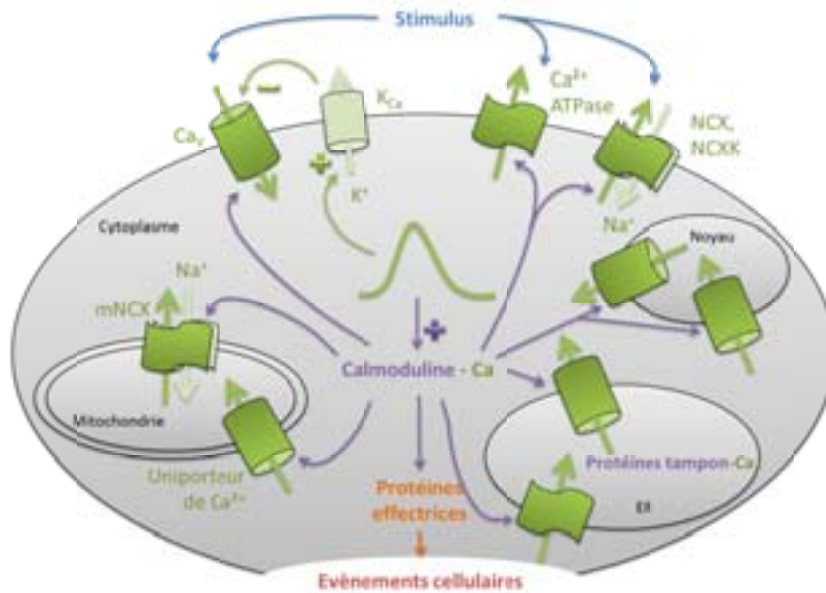


Figure 39: Compartimentation de la cellule eucaryote et complexification de la signalisation calcique.

La compartimentation de la cellule permet à de nouveaux gradients de  $Ca^{2+}$  de se mettre en place, régulés par des pompes et canaux ayant des caractéristiques différentes de celles des éléments présents au niveau de la membrane plasmique.

### 2.3. Polarisation de la cellule et régulation spatio-temporelle du signal

#### 2.3.1. Régulation du signal par des protéines tampon

Relativement tôt dans l'évolution des organismes eucaryotes, la polarité cellulaire est apparue à travers la localisation précise et la propagation effectrice des signaux. Simultanément, certains eucaryotes ont formé des colonies d'agréations de cellules, ancêtres des organismes pluricellulaires. Ces deux développements ont nécessité des systèmes de signalisation plus complexes dans leur codage et ciblage. Ceci passe par une localisation différentielle des protéines dans la cellule, en particulier des protéines effectrices, mais également par une régulation spatio-temporelle du signal calcium. Cette régulation est acquise notamment par la liaison du  $Ca^{2+}$  à des **protéines tampons** (Encart 5). Ces protéines ont des  $K_d$  de l'ordre du micromolaire, leur permettant de lier le  $Ca^{2+}$  lorsque sa concentration locale devient trop importante ; cependant cette faible affinité peut être compensée par un nombre important de protéines tampons, empêchant ainsi la diffusion de  $Ca^{2+}$  dans l'ensemble du

cytoplasme. Ceci permet une **modulation spatiale et cinétique** du signal, contraint à des microdomaines (Berridge, 2006) (Figure 40).

#### Encart 5 : Protéines tampon

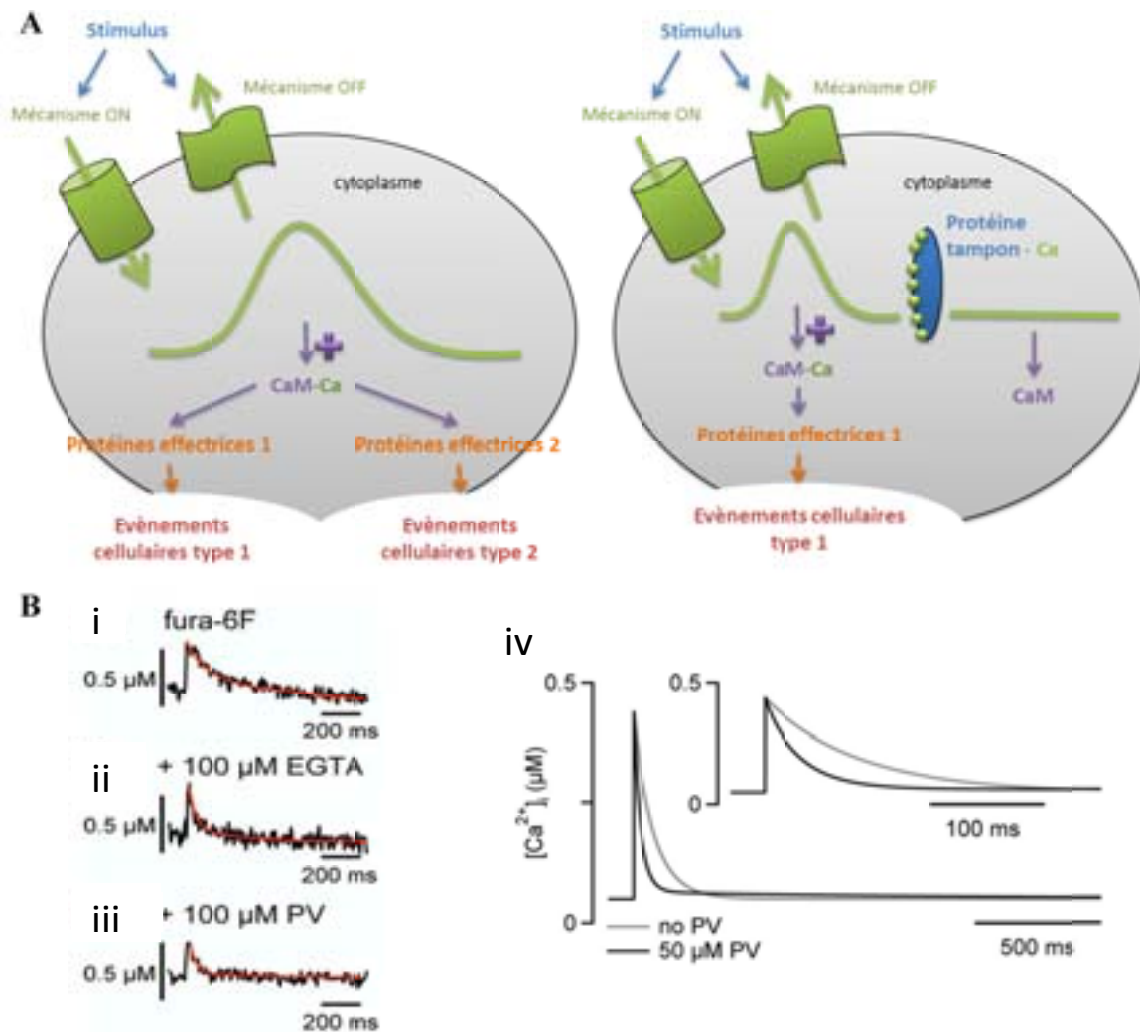
Les molécules chélatrices du  $\text{Ca}^{2+}$  contiennent des groupements chargés négativement et dont la géométrie contient une « cage » pouvant accueillir 1  $\text{Ca}^{2+}$ . On retrouve ainsi certaines familles de protéines conservées au cours de l'évolution dont les annexines, les protéines à domaine C2, les protéines EF-hand (Gifford et al., 2007), les pentraxines, les protéines dépendantes de la vitamine K ainsi que des protéines intraorganelles de faible affinité mais haute capacité de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  (Bindreither and Lackner, 2009; Teo and Wang, 1973). Cependant, le terme de protéine tampon est appliqué à un nombre restreint de protéines cytoplasmiques à motif EF-hand, dont la **Calbindin-D9k**, la **Calbinding-D28k**, la **Calretinine**, les **isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  de la Parvalbumine**. La majorité de ces protéines peut également avoir un rôle effecteur du signal calcium lorsque la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  induit un changement conformationnel de la protéine, lui permettant ainsi d'interagir spécifiquement avec d'autres protéines de façon calcium dépendante. Ce changement de conformation est toutefois beaucoup moins important que dans le cas des protéines senseurs (Encart 4).

Les protéines tampon calciques n'agissent pas de la même façon qu'un tampon chimique telles que les tampons pH qui clampent le pH à une valeur prédéterminée (le pouvoir tampon est alors plus fort lorsque le pH est proche du pKa de la paire acide / base). Dans le cas des tampons calciques, les constantes de dissociation du  $\text{Ca}^{2+}$  vont de 200 nM à 1,5  $\mu\text{M}$  : à l'état de repos ( $[\text{Ca}^{2+}] = 20 - 100$  nM), les tampons calciques ne lient pas  $\text{Ca}^{2+}$ . La modulation d'un signal calcium par une protéine tampon donnée dépend de plusieurs paramètres dont la concentration calcique intracellulaire, l'affinité pour  $\text{Ca}^{2+}$  en compétition avec d'autres ions métalliques dont  $\text{Mg}^{2+}$  (Potter and Gergely, 1975), les cinétiques de liaison et libération de  $\text{Ca}^{2+}$ , la mobilité intracellulaire (Zhou and Neher, 1993). Les tampons calciques immobiles ont en général une faible affinité pour  $\text{Ca}^{2+}$  ; on retrouve dans cette catégorie les résidus intracellulaires de phospholipides membranaires (McLaughlin et al., 1981). L'ensemble des tampons calciques (mobiles et immobiles) est responsable de la **faible diffusion des ions  $\text{Ca}^{2+}$**  dans la cellule et peuvent contribuer à une augmentation locale du  $\text{Ca}^{2+}$  (Fioravante and Regehr, 2011) (Figure 40A).

La majorité des protéines tampons calciques ont des constantes de dissociation ( $K_{D,\text{Ca}}$ ) de l'ordre du micromolaire (Schwaller, 2010) ; ces protéines sont donc en général dans une forme libre de  $\text{Ca}^{2+}$  au repos. Dans la cellule, le  $k_{\text{on}}$  peut varier de plus de  $10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  pour la Calbindin-D9k à  $3.10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  pour la Parvalbumine ; cette faible valeur est notamment due à la compétition de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  avec  $\text{Mg}^{2+}$  (Lee et al., 2000). Une même protéine peut avoir plusieurs sites de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  avec des  $K_{D,\text{Ca}}$  et  $k_{\text{on}}$  différents.

Les protéines tampons peuvent ainsi moduler les caractéristiques spatiales du signal en liant le  $\text{Ca}^{2+}$  et l'empêchant de diffuser dans l'ensemble du cytoplasme. Ces protéines participent également à la régulation temporelle du signal. En effet, le bon encodage de certains signaux nécessite parfois une élimination rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  libre. La présence des protéines tampon dans le cytoplasme, à proximité des augmentations de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , font de ces protéines des effecteurs de choix du mécanisme OFF (Figure 40B) : les protéines tampon liant  $\text{Ca}^{2+}$  diminuent le délai de retour à l'équilibre suivant une augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . D'autre part, l'intervention de ces protéines modifie le signal  $\text{Ca}^{2+}$  de façon plus complexe : un retour à l'équilibre simulé par une courbe monoexponentielle devient une courbe biexponentielle en présence de protéine tampon comme illustré dans la Figure 40B avec la **Parvalbumine** (PV). La présence de la protéine tampon accélère la diminution de  $[\text{Ca}^{2+}]$  pour un effet immédiat mais l'élimination totale des ions  $\text{Ca}^{2+}$  libres prend plus de temps ; ceci correspond au relargage des ions liés à la protéine lors du retour à l'équilibre.





**Figure 40: Modulation du signal calcium par les protéines tampon.**

**A :** Les protéines tampon permettent de diviser le cytoplasme en microdomaines. Le schéma de gauche représente une cellule sans protéine tampon : le signal calcium diffuse dans l'ensemble du cytoplasme, activant ainsi toutes les protéines effectrices et générant plusieurs événements cellulaires. Sur le schéma de droite, les protéines tampon empêchent la propagation du signal calcium dans l'ensemble du cytoplasme, permettant ainsi une activation des protéines effectrices régio-sélective et le déclenchement d'un nombre plus réduit d'événements cellulaires en réponse au stimulus. **B :** Les protéines tampons participent au mécanisme OFF en diminuant le délai de retour à l'équilibre. (i, ii, iii) la présence de tampons calciques chimique (EGTA) ou protéique (PV) accélère le rétablissement de l'équilibre calcique de la cellule par rapport à la condition sans tampon (fura-6F) (iv) Simulations mathématiques effectuées sans protéine tampon avec une fonction simple exponentielle de paramètre  $T = 78$  ms (courbe grise) ; simulation effectuée avec l'ajout de Parvalbumine avec une fonction double exponentielle de paramètres  $T_1 = 31$  ms et  $T_2 = 1310$  ms (courbe noire) (Muller et al., 2007).

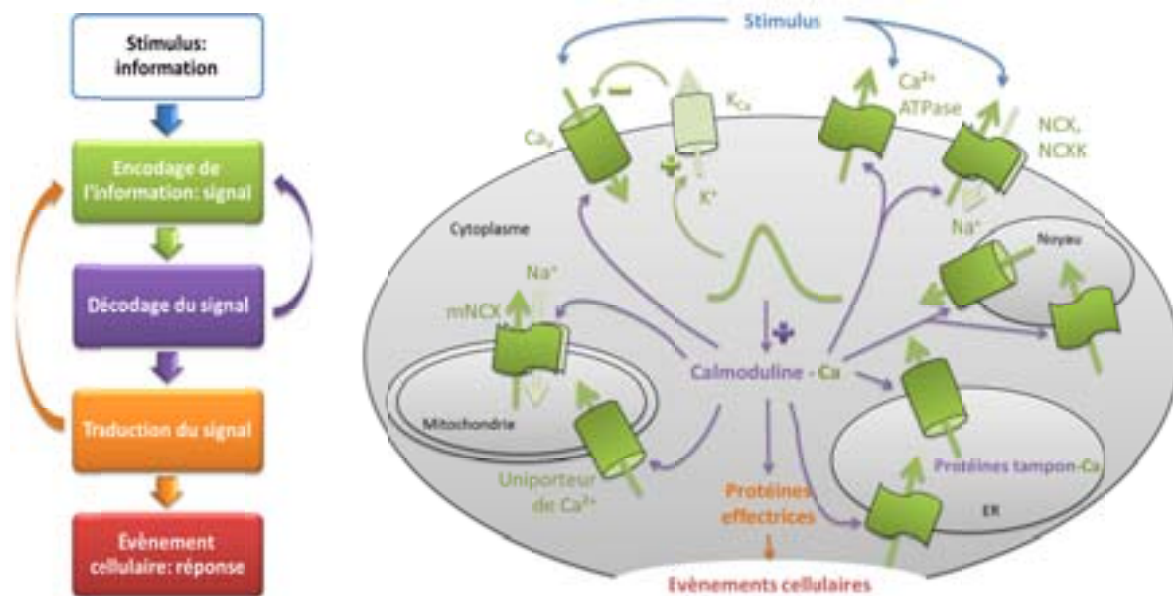
### 2.3.2. Régulation du signal par la mitochondrie

La mitochondrie joue également un rôle dans la terminaison du signal calcium en séquestrant rapidement le  $Ca^{2+}$  pendant la phase de développement du signal et en le relâchant doucement pendant la phase de retour à l'équilibre. Ceci permet de contrôler l'amplitude et l'évolution spatio-temporelle du signal. La mitochondrie peut ainsi former une étroite collaboration avec

le réticulum dans laquelle ce dernier relâche du  $\text{Ca}^{2+}$  immédiatement capté par la mitochondrie à travers un uniporteur de  $\text{Ca}^{2+}$  de faible affinité ( $\text{EC}_{50} \sim 15 \mu\text{M}$ ) mais rapide et de grande capacité, modifiant les mécanismes de rétrocontrôle qui régulent le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'ER (Montero et al., 2000). Une fois le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique revenu à son état d'équilibre, la mitochondrie le relâche à travers l'échangeur mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (mNCX) pour soit renouveler le stock ER soit être éliminé de la cellule (Carafoli et al., 1974; Kretsinger and Nockolds, 1973; Lipp and Niggli, 1994; Quednau et al., 2004).

### 2.3.3. Régulation du signal par les protéines effectrices de la signalisation calcique

Les protéines effectrices de la signalisation calcique peuvent également exercer un rétrocontrôle sur le signal calcium : une fois le signal décodé par une protéine senseur et traduit par l'activation des protéines effectrices, celles-ci peuvent moduler l'activité des canaux et pompes (Figure 41). Cette modification peut soit aboutir à une amplification du signal, pour généraliser un évènement initialement réduit à un microdomaine, soit à une terminaison, afin que celui-ci ne se propage pas dans l'ensemble du cytoplasme.



**Figure 41: Régulation du signal calcium par les protéines activées par la Calmoduline.**

CaM module la fonction de nombreuses protéines, dont des kinases, phosphatases. Ces dernières ont à la fois un rôle dans la réponse cellulaire au stimulus appliqué mais également dans la modulation du signal calcium lui-même : en l'amplifiant pour permettre au signal de diffuser plus largement dans la cellule et ainsi d'activer d'autres protéines effectrices ou en le terminant pour au contraire éviter sa diffusion dans les domaines subcellulaires voisins. Cette modulation passe par l'interaction avec les protéines des mécanismes ON (canaux) et OFF (pompes).



#### *2.4. Les organismes pluricellulaires : coopération et échange d'informations inter- et intracellulaires*

L'apparition de nouveaux gradients de  $\text{Ca}^{2+}$  ainsi que la diversification des stimuli et des événements cellulaires, a favorisé l'émergence de nouveaux éléments des mécanismes ON et OFF, permettant une régulation de plus en plus fine des signaux générés. Ceci passe notamment par l'apparition d'isoformes des éléments déjà existants, par leur inductibilité par différents messagers et par l'interconnexion des voies de signalisation calciques. D'autres messagers de la signalisation calcique viennent s'ajouter au  $\text{Ca}^{2+}$  lui-même :

- L'inostol 1,4,5-triphosphate (**InsP<sub>3</sub>**) est obtenu, conjointement avec le diacylglycérol (**DAG**), suite à l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PtdInsP<sub>2</sub>) par la Phospholipase C (PLC). Il existe plusieurs isoformes de PLC activées par différents mécanismes tels que les récepteurs couplés aux protéines G (**RCPGs**) (PLC $\beta$ ), les récepteurs couplés à la tyrosine kinase (**RTKs**) (PLC $\gamma$ ), une augmentation de [ $\text{Ca}^{2+}$ ] (PLC $\delta$ ) ou l'activation de **Ras** (PLC $\epsilon$ ). En général, l'augmentation de [ $\text{Ca}^{2+}$ ] suivant l'activation de la PLC $\gamma$  est plus lente et plus durable que celle médiée par la PLC $\beta$  (Berridge et al., 2003; Clapham, 1995; Kim et al., 1997).
- L'Adénosine diphosphate (ADP) ribose cyclique (**cADPR**) et l'acide nicotinique adénine dinucléotide phosphate (**NAADP**) sont obtenus par l'activation de l'ADP ribose cyclase CD38 à partir de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) et de son dérivé phosphorylé (NADP) (Aarhus et al., 1995; Clapper et al., 1987; Genazzani and Galione, 1997; Lee, 1997). Ces deux messagers sont synthétisés suite à l'action d'agonistes extracellulaires ou selon le métabolisme de la cellule (importance de l'ATP (Tohgo et al., 1997) et de NADH (Wilson et al., 2001) pour la synthèse de ces dérivés nucléotidiques).
- La sphingosine 1 phosphate (**S1P**) et la céramide 1 phosphate (**C1P**) sont des dérivés lipidiques formés respectivement à partir de la sphingosine par la sphingosine kinase et de la céramide par la céramide kinase (Hinkovska-Galcheva et al., 2008). L'action de ces messagers sur la signalisation calcique (Young et al., 1999) peut passer à travers des RCPGs (Anliker and Chun, 2004) ou par un message intracellulaire

intermédiaire (Hopson et al., 2011; Meyer zu Heringdorf et al., 2003; Spiegel and Milstien, 2003)

#### 2.4.1. Communication intercellulaire et nouveaux stimuli

L'établissement des organismes pluricellulaires n'a pu se faire que par un échange d'informations entre les différentes cellules. Les cellules sont donc capables d'émettre et de recevoir des informations différentes de celles émanant de l'environnement. Différents types de canaux et récepteurs ont été développés au cours de l'évolution à la surface de la membrane plasmique permettant de compléter la sensibilité des cellules aux différentes sources et types d'informations :

- les canaux calciques voltage dépendants (VOCs) activés par une dépolarisation membranaire
- les canaux calciques dépendants de l'activation d'un récepteur (ROCs) par un ligand extracellulaire tel que le glutamate, l'ATP ou l'acétylcholine
- les canaux activés suite à une déformation de la cellule

Les **VOCs** sont exprimés essentiellement dans les cellules excitables, telles que les cellules musculaires ou neuronales, et activés par une dépolarisation de la membrane. Chez les mammifères, les VOCs sont constitués de 5 sous unités ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) : la sous unité  $\alpha_1$  est un canal calcique régulé par les 4 autres sous unités. De nombreuses isoformes de ces canaux ont été identifiées, soulevant la possibilité d'une multitude de combinaisons possibles ainsi que d'une expression tissu-spécifique conférant aux canaux VOCs des propriétés de régulation et pharmacologiques particulières. L'ouverture des canaux VOCs génère un influx rapide du  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule contrôlant des procédés cellulaires rapides, telles que la contraction musculaire ou l'exocytose au niveau des terminaisons synaptiques.

Les **ROCs** forment une famille de canaux structurellement et fonctionnellement variés et sont exprimés principalement dans les cellules sécrétrices et des terminaisons nerveuses. Parmi les récepteurs ROCS les plus connus, on trouve le récepteur nicotinique à acétylcholine et les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (**NMDARs**). Les ROCs sont activés par la liaison d'un agoniste (tels que l'ATP, la sérotonine, le glutamate ou l'acétylcholine) sur le domaine extracellulaire du canal.

Les canaux calciques activés mécaniquement sont présents sur de nombreux types cellulaires et répondent aux déformations de la cellule. On trouve ce type de canaux dans les cellules épithéliales de la trachée où la déformation d'une cellule génère une vague calcique intercellulaire capable de synchroniser les battements de cils des cellules voisines (Boitano et al., 1992).

#### 2.4.2. Les cascades de signalisation

La mobilisation du calcium des réservoirs intracellulaires (essentiellement l'ER) ne peut se faire directement par le stimulus, appliqué au niveau de la membrane plasmique de la cellule. Cette mobilisation passe donc par des messagers secondaires qui relayent l'information portée par le stimulus extracellulaire au niveau des compartiments intracellulaires afin de moduler l'influx du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme. Les mécanismes mis en place par la cellule pour contrôler ce flux sont similaires à ceux situés au niveau de la membrane plasmique et sont médiés par les canaux

- $\text{IP}_3\text{R}$  (récepteurs de l'Inositol 1,4,5-triphosphate) suite à la liaison de l' $\text{InsP}_3$
- RyRs (récepteurs de la ryanodine) activés par la ryanodine
- PTPs (pore de perméabilité de potentiel membranaire) de la membrane mitochondriale

Il existe 3 différentes isoformes d' **$\text{IP}_3\text{R}$** :  $\text{IP}_3\text{R}_1$ ,  $\text{IP}_3\text{R}_2$ ,  $\text{IP}_3\text{R}_3$  ; ces 3 récepteurs sont très similaires (70 % d'identité de séquence en acides aminés) mais diffèrent dans leur affinité pour l' $\text{InsP}_3$  ainsi que dans leur expression tissulaire. Les  $\text{IP}_3\text{R}$  sont de grosses structures composées de 4 sous unités homodimériques ou hétérodimériques, chacune capable de lier une molécule d' $\text{InsP}_3$ , et formant un canal calcique ; les différentes combinaisons d' $\text{IP}_3\text{R}$  permettent de former des canaux fonctionnellement différents d'une cellule à l'autre (Taylor et al., 1999). Suite à l'activation de la phospholipase C par un récepteur membranaire,  $\text{InsP}_3$  diffuse dans la cellule et se lie aux récepteurs  $\text{IP}_3\text{R}$  de l'ER, induisant une transconformation de l' $\text{IP}_3\text{R}$  et l'ouverture du canal calcique associé.

Les récepteurs Ryanodine (**RyRs**) sont structurellement similaires aux  $\text{IP}_3\text{R}$  et essentiellement exprimés dans des cellules excitables (muscles, neurones) (Bootman et al., 2001). La liaison de la ryanodine sur le récepteur (homotétramère) est ambivalente : à faible concentration (de

l'ordre du nanomolaire), c'est un activateur alors qu'à fortes concentrations ( $> 10 \mu\text{M}$ ), la ryanodine inhibe l'ouverture du canal (Meissner, 1986).

Les canaux de relargage de calcium de l'ER (IP<sub>3</sub>R, RyR) peuvent aussi être activés par le Ca<sup>2+</sup> (cytoplasmique ou luminal) au cours du processus **CICR** (relargage du Ca<sup>2+</sup> induit par le Ca<sup>2+</sup> ou entrée capacitive de Ca<sup>2+</sup>). Une augmentation du Ca<sup>2+</sup> dans le lumen augmente la sensibilité de RyR et IP<sub>3</sub>R alors que le Ca<sup>2+</sup> cytosolique a une action plus complexe : il peut être à la fois activateur à faible concentration (0,5 – 1  $\mu\text{M}$  pour l'IP<sub>3</sub>R et 1 – 10  $\mu\text{M}$  pour RyR) et inhibiteur à plus forte concentration ( $> 1 \mu\text{M}$  pour l'IP<sub>3</sub>R et  $> 10 \mu\text{M}$  pour RyR) de ces canaux (Cardy et al., 1997; Iino, 1990; Marchant and Taylor, 1997; Meissner et al., 1986)

Il peut également y avoir une entrée du Ca<sup>2+</sup> dans le cytosol depuis la mitochondrie à travers un pore **PTP** (Hunter et al., 1976) activé par une forte accumulation de [Ca<sup>2+</sup>] dans la matrice mitochondriale (**mCICR**), notamment suite à un captage du Ca<sup>2+</sup> relargé par l'ER (voir mécanismes OFF). Dans un état de faible conductance, le pore peut ainsi contribuer à la génération d'une vague de Ca<sup>2+</sup> (Ichas et al., 1997) ; un état irréversible de forte conductance de ce pore engendre l'effondrement du potentiel de membrane mitochondrial, menant au relâchement du cytochrome c (protéine essentielle à la chaîne respiratoire) et à l'apoptose (Duchen, 1999; Ichas and Mazat, 1998).

### 2.4.3. Communication intracellulaire

Le contrôle des différentes homéostasies calciques de la cellule (permettant d'assurer un bon encodage des informations extracellulaires au niveau de la membrane plasmique ou des membranes intracellulaires) nécessite une communication entre les différents réservoirs de Ca<sup>2+</sup>. Cette communication intracellulaire permet également à la cellule de mettre en place des événements cellulaires en réponse à des informations provenant de la cellule elle-même tels qu'un changement de métabolisme, une entrée dans le cycle cellulaire... La cellule dispose de plusieurs mécanismes :

- les canaux capacitifs (SOCs) activés en réponse au vidage d'un stock intracellulaire au cours du processus SOCE (entrée du Ca<sup>2+</sup> stimulée par les stocks internes) ; ce mécanisme est essentiellement activé pendant que la cellule est au repos, lui permettant de reconstituer ses stocks intracellulaires de Ca<sup>2+</sup>

- les canaux sensibles à des seconds messagers intracellulaires (SMOCs) tels que le diacylglycérol (DAG), l'acide arachidonique ou les acides nucléotidiques
- les canaux sensibles à la concentration intracellulaire en sphingolipides (canaux SCaMPER)
- les canaux sensibles au métabolisme cellulaire activés par des messagers synthétisés en fonction de la concentration d'ATP intracellulaire (canaux TPs)
- les canaux TRPs activés par plusieurs types de stimuli

L'activation des canaux calciques **SOCs** passe par un couplage entre les canaux d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrane plasmique et les canaux de relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum endoplasmique. Le mécanisme **SOCE** (store operated calcium entry) a été proposé en 1986 (Putney, 1986) mais ce n'est qu'au cours des 10 dernières années que les deux éléments majeurs de SOCE ont été identifiés : **STIM1** (stromal interaction molecule), senseur calcique des compartiments intracellulaires (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005; Williams et al., 2001), et **Orai1**, protéine formant le pore des **canaux CRAC** (canaux activés par le relargage de  $\text{Ca}^{2+}$ ) et permettant de générer le courant d'entrée capacitive de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{CRAC}}$ ) (Feske et al., 2006; Prakriya et al., 2006; Vig et al., 2006; Zhang et al., 2006b). STIM2 (Williams et al., 2001), Orai2 et Orai3 (Feske et al., 2006), homologues de STIM1 et Orai1, ont également été identifiés bien que leur participation dans le processus SOCE ne soit pas caractérisée. Suivant le désemplissage en  $\text{Ca}^{2+}$  de l'ER, STIM1 multimérise et s'accumule dans la partie membranaire de l'ER adjacente à la membrane plasmique (site de jonction) et Orai, initialement dispersé dans la membrane plasmique, s'accumule à proximité de STIM1 (Luik et al., 2006; Muik et al., 2008; Wu et al., 2006; Xu et al., 2006). La formation du cluster STIM1-Orai1 (Yeromin et al., 2006) entraîne la multimérisation de deux dimères Orai1 qui formeront le pore du canal actif CRAC, sélectif des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (McNally et al., 2012; Penna et al., 2008; Prakriya et al., 2006; Yeromin et al., 2006; Yuan et al., 2009).

Les canaux régulés par l'acide arachidonique (**ARC**) ne sont pas associés au remplissage des stocks intracellulaires du  $\text{Ca}^{2+}$  (Mignen and Shuttleworth, 2000) mais plutôt au contrôle de la fréquence du signal (Shuttleworth and Thompson, 1996). Bien qu'indépendant du mécanisme SOCE, les canaux ARC sont très similaires aux canaux CRAC : l'activation des canaux ARC requiert STIM1 (localisée à la membrane plasmique) (Mignen et al., 2007) et le pore du canal

ARC est un hétéropentamère formé de 3 sous unités Orai1 et 2 sous unités Orai3 (Mignen et al., 2009).

Les **SMOCS** ou canaux non SOCs : l'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  ne dépend pas d'une entrée capacitive mais de messagers intracellulaires tels que les nucléotides cycliques ou l'acide arachidonique (Mignen and Shuttleworth, 2000). Les canaux activés par les nucléotides cycliques (**canaux CNG**) sont essentiels à la transduction de signaux relatifs à la vision (bâtonnets, cônes) et l'olfaction et sont activés par cAMP ou cGMP. Ces canaux sont des assemblages hétérotétramériques de 2 ou 3 types de sous unités différentes : 6 gènes codent pour ces canaux (4 sous unités A et 2 sous unités B), donnant lieu à 3 canaux différents (Bradley et al., 2001). Les canaux CNG activés génèrent des courants cationiques. Le  $\text{Ca}^{2+}$  contribue largement à ces courants et exerce également un rétrocontrôle négatif sur ces canaux, permettant ainsi une adaptation rapide des cellules sensorielles aux stimuli (Bradley et al., 2005; Kaupp and Seifert, 2002; Trudeau and Zagotta, 2002).

Les canaux **SCaMPER** activés en réponse à une augmentation de concentration en sphingolipides intracellulaires (sphingophosphorylocholine, SIP, C1P) dans de nombreux types cellulaires (Mao et al., 1996; Young et al., 1999).

Le calcium peut également être mobilisé par des messagers tels que cADPR et NAADP. Le nucléotide NAADP relargue le  $\text{Ca}^{2+}$  des stocks intracellulaires acides tels que les lysosomes, endosomes ou vésicules de sécrétion via les **canaux TPs** (canaux à deux pores) (Potter and Gergely, 1975; Schwaller, 2010). Ce signal calcique local peut par la suite activer des canaux de la membrane plasmique ou engendrer une cascade CICR au niveau de l'ER (Lee et al., 2000; Zhou and Neher, 1993). Le cADPR agit plus comme un modulateur de CICR : cADPR induit la dissociation du complexe RyR / FKBP12.6 en se liant à la sous unité FKBP12.6 et augmente ainsi la sensibilité des récepteurs RyR au  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique (Swan et al., 1987; Teggatz et al., 2005). Dans les cellules excitables, les VOCs induisent un pulse de  $\text{Ca}^{2+}$  suite à une dépolarisation de la membrane, ce qui stimule les RyRs à relarguer du  $\text{Ca}^{2+}$  par CICR. Le degré d'amplification du signal initial par CICR (gain d'amplification du système) peut être régulé par cADPR (Dargan et al., 2004). Une autre possibilité est que cADPR active la pompe SERCA (Camacho and Lechleiter, 1995), pompe de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'ER, ce qui augmenterait l'import du  $\text{Ca}^{2+}$  dans l'ER, procédé connu pour augmenter la sensibilité de RyR (Copley et al., 1999).

Les **TRPs** (senseurs des changements transitoires de potentiel membranaire) sont des canaux cationiques peu spécifiques de faible conductance et pouvant par conséquent être ouverts sur des périodes assez importantes sans pour autant saturer le cytoplasme en  $\text{Ca}^{2+}$ . La famille des TRPs compte 28 membres répartis en 6 sous familles : les TRP canoniques (TRPC), vanilloïdes (TRPV), mélastatine (TRPM), polycystine (TRPP), mucolipine (TRPML), ankyrine (TRPA). Les membres de la famille des TRPs sont particulièrement importants dans le contrôle de procédés cellulaires lents, tels que la contraction des muscles lents et la prolifération cellulaire (Friedberg and Taliaferro, 2005; Nelson and Chazin, 1998) mais aussi dans la perception de la chaleur et de la douleur. Les canaux TRPs peuvent être activés par les RCPGs (Obukhov et al., 1996), DAG (Clapham, 1995; Hofmann et al., 1999), l'acide arachidonique (Mignen and Shuttleworth, 2000) ou alors par un mécanisme de type SOCE (Berridge et al., 2000a) ; un même canal TRP peut également être activé par plusieurs stimuli (Kim et al., 1997).

Avant que les protéines STIM1 et Orai1 ne soient identifiées, l'implication des protéines TRPC a été suggérée dans le mécanisme SOCE de différents types cellulaires ; ces protéines sont responsables du courant capacitif non sélectif décrit comme  $I_{\text{SOC}}$ . Aujourd'hui, on considère que les protéines STIM1, Orai1 et TRPC interagissent de façon dynamique pour former un complexe ternaire médiant SOCE (Ong et al., 2007); l'interaction de STIM1 avec Orai1 et/ou TRPC permet d'expliquer les différents courants capacitifs décrits dans différents types cellulaires : d'un côté, les courants  $I_{\text{CRAC}}$  (médiés par les canaux CRAC Orai1) ayant une forte sélectivité pour  $\text{Ca}^{2+}$  dans les lymphocytes T, mastocytes ainsi que dans certains muscles lisses et cellules endothéliales et de l'autre côté les courants  $I_{\text{SOC}}$  (médiés par les canaux CRAC TRPC1, TRPC3, TRPC4) dans les autres types cellulaires, laissant passer différents cations sans sélectivité.

#### 2.4.4. Mécanismes OFF

Une fois le signal calcium établi, il est rapidement éliminé du cytoplasme par des pompes et échangeurs ioniques vers le milieu extracellulaire ou les stocks intracellulaires (majoritairement le réticulum endoplasmique). Deux principaux groupes de transporteurs sont responsables de l'extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme :



- les transporteurs ATP dépendants : PMCA (ATPase calcique de la membrane plasmique), SERCA (ATPase calcique du réticulum sarco-endoplasmique) et SPCA (ATPase calcique des voies de sécrétion) au niveau de l'appareil de Golgi
- les échangeurs  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) au niveau de la membrane plasmique des cellules excitables (cœur, neurones) et mNCX au niveau de la membrane interne de la mitochondrie s'appuyant sur le gradient électrochimique de  $\text{Na}^+$

Au niveau de la membrane plasmique, la **PMCA** transfère 1  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu extracellulaire par molécule d'ATP hydrolysée. Aujourd'hui, il existe 4 gènes codant pour la PMCA (1 – 4), auxquels s'ajoutent 2 sites d'épissage alternatif : le site A à proximité du domaine de liaison de phospholipides et générant les isoformes w, x, y, z et le site C au milieu du domaine de liaison à la Calmoduline et générant les isoformes a, b, f (Brandt et al., 1992; Keeton et al., 1993; Strehler, 1991). Ces isoformes contribuent à la grande diversité des pompes au niveau de leur expression (Filoteo et al., 1997), de leur vitesse (Caride et al., 2001), de leur régulation notamment par la Calmoduline (Penniston and Enyedi, 1998). Outre la Calmoduline, l'ATPase peut être activée par de acides phospholipidiques, des acides gras insaturés, un traitement protéolytique, les protéines kinases A (PKA) et C (PKC), l'induction d'un état oligomérique (Carafoli, 1992).

La pompe **SERCA** transfère 2  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu intra-réticulaire par molécule d'ATP hydrolysée. Cette pompe représente le seul moyen de recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  par l'ER ; le contrôle de SERCA est donc primordial pour la régulation de l'homéostasie de ER/SR. Dans le génome humain, 3 gènes pouvant être épissés alternativement ont été identifiés comme codant pour ces pompes (Martin et al., 2002). Les différentes isoformes de SERCA ont des propriétés de pompage différentes et modulent différemment les concentrations du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme et le réticulum : l'expression différentielle des pompes SERCA permet de moduler le signal  $\text{Ca}^{2+}$  spécifiquement selon le type cellulaire (Camacho and Lechleiter, 1993; Martin et al., 2002; Morgan and Jacob, 1998). SERCA3 a une affinité pour  $\text{Ca}^{2+}$  beaucoup plus faible que SERCA1 et SERCA2 : SERCA3 n'est activée que suite à une stimulation massive ou lors du pic oscillatoire calcique (Arredouani et al., 2002). Dans certaines cellules, l'expression de SERCA3 est induite sélectivement durant la différenciation cellulaire, alors que durant la tumorigenèse SERCA3 est peu exprimée (Arbabian et al., 2011).



**SPCA** est une ATPase  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  du **Golgi** (Van Baelen et al., 2001) qui ressemble beaucoup à la pompe SERCA. En effet, si tous les organismes animaux expriment à la fois des pompes SERCA et SPCA de structures primaires assez similaires, les champignons et levures n'ont qu'une pompe similaire à SPCA et les plantes n'ont que des gènes relatifs à la pompe SERCA (Wuytack et al., 2002). Dans le génome humain, 2 gènes codent pour des pompes SPCA et pouvant être alternativement épissés. La surexpression de l'isoforme SPCA2 est souvent associée à la prolifération cellulaire et la tumorigénisation (Feng et al., 2010).

**NCX** permet d'expulser le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme en utilisant le gradient  $\text{Na}^{+}$ . Cet échangeur peut être couplé à une ATPase  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  dépendante (**NCKX**) (Blaustein and Lederer, 1999; Cervetto et al., 1989). (Lytton, 2007). L'activité de cet échangeur n'est pas négligeable : suivant la contraction du muscle cardiaque, la relaxation de la cellule musculaire requiert une extrusion du  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme ; la mesure des niveaux d'activité de PMCA et NCX indique clairement que dans ce cas l'échangeur est le mode d'efflux prédominant au niveau de la membrane plasmique (Blaustein and Lederer, 1999).

Comme décrit au point I-2.3.2, la mitochondrie joue également un rôle dans la terminaison du signal calcium en séquestrant rapidement le  $\text{Ca}^{2+}$  à travers un **uniporteur du  $\text{Ca}^{2+}$**  pendant la phase de développement du signal et en le relâchant doucement à travers l'échangeur mitochondrial  $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$  (**mNCX**) pendant la phase de retour à l'équilibre.

La Figure 42 représente les principaux effecteurs des mécanismes ON et OFF (canaux, pompes, second messagers) abordés dans cette partie et mis en place au cours de l'évolution ; ces éléments sont repris en Annexe VII.

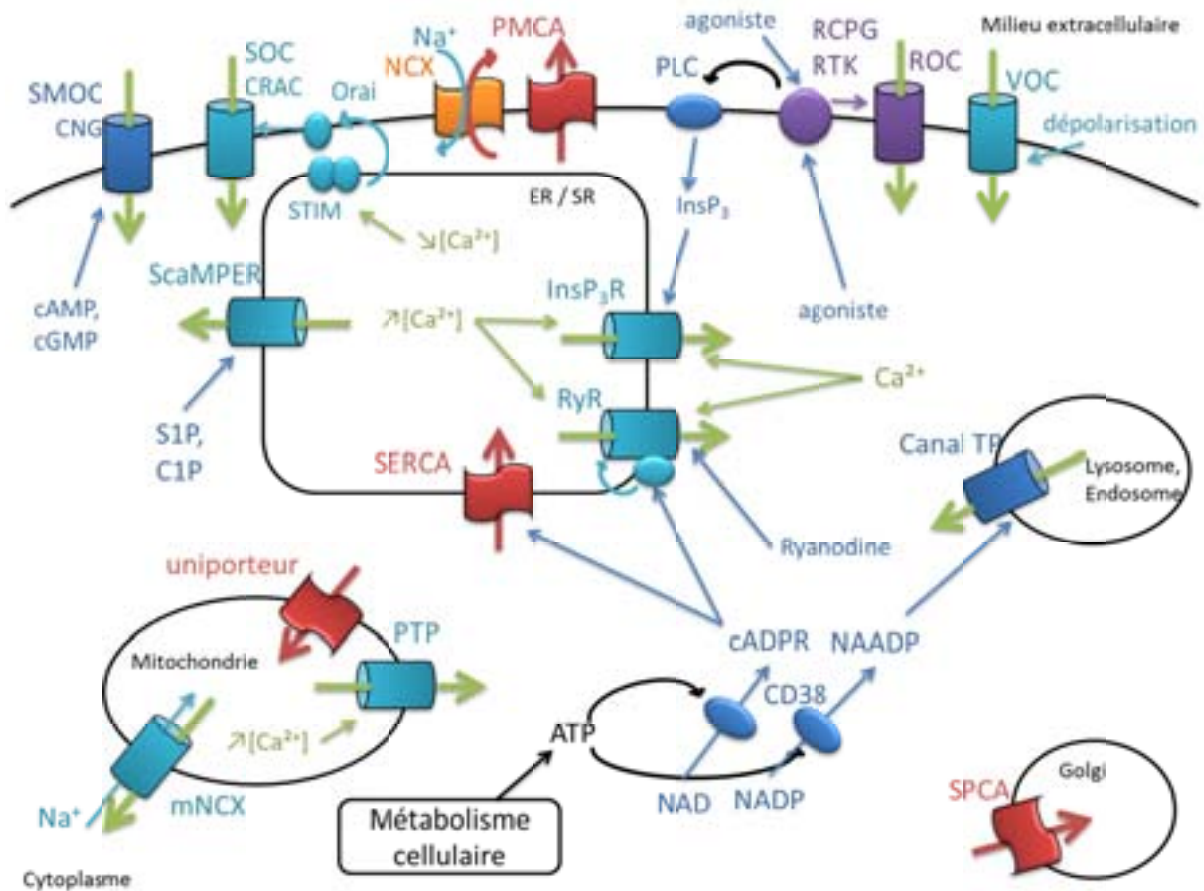


Figure 42: Représentation des principaux effecteurs des mécanismes ON et OFF dans la cellule. Les influx du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme sont modélisés par des flèches vertes, les efflux par des flèches rouges.

#### 2.4.5. Senseurs de $\text{Ca}^{2+}$

Les protéines senseurs du  $\text{Ca}^{2+}$  se sont diversifiées, tout en conservant le motif EF-hand (Figure 35D). Cette multiplication des senseurs calciques a permis de répondre plus précisément aux différents signaux. En effet, tous n'ont pas la même sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  : leur capacité de liaison dépend de leur affinité pour  $\text{Ca}^{2+}$ , de la compétition avec d'autres ions métalliques (notamment  $\text{Mg}^{2+}$ ), de leur localisation subcellulaire ou de leur mobilité. À ces propriétés s'ajoutent celles de la capacité de reconnaissance, de liaison et de régulation de leurs protéines cibles ; on retiendra notamment la nécessité pour ces protéines senseurs d'une capacité importante de **malléabilité structurale** afin de pouvoir s'adapter à différentes cibles.

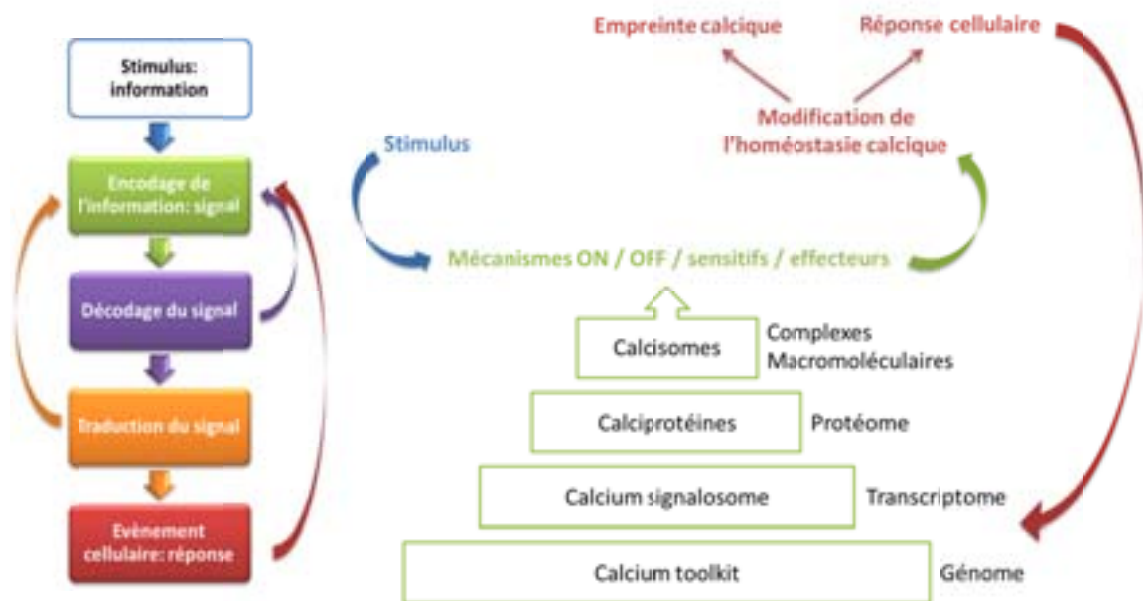
En plus de la Calmoduline, plusieurs centaines de protéines de cette classe sont aujourd'hui connues. Parmi les protéines les plus connues, on trouve la **Troponine C**, la **Synaptogamine**,

les **protéines S100**, certaines **Annexines**. Le procédé de décodage est amorcé par un changement conformationnel de la protéine effectrice suite à la liaison de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ceci induit notamment l'exposition de larges surfaces hydrophobes pouvant interagir avec d'autres protéines et ainsi moduler leur activité (Ikura, 1996). Au cours des 20 dernières années, le nombre de résolution de structures 3D des protéines senseurs du  $\text{Ca}^{2+}$  complexées à leurs protéines cibles a considérablement augmenté et a ainsi permis de faire des progrès considérables dans la compréhension de ces interactions (Bhattacharya et al., 2004; Grabarek, 2006; Yap et al., 2000).

### *2.5. Spécialisation cellulaire et régulation génique*

Le **calcium toolkit** à la base des 4 unités fonctionnelles du signal calcium est codé par plus de 300 gènes. Chaque cellule exprime seulement une partie de ce calcium toolkit, le **signalosome calcique**, traduit en protéines (**calciprotéines**) s'assemblant en complexes macromoléculaires autour de protéines « hub » (Barabasi and Oltvai, 2004; Batada et al., 2006; Kar et al., 2009; Manna et al., 2009) et formant les **calcisomes** (Haiech and Demaille, 1981) précisément localisés dans la cellule. L'ensemble du signalosome calcique et des combinaisons de calcisomes est spécifique d'une cellule donnée dans un état physiologique donné et lui permet d'élaborer, de réguler, de décoder un signal calcique et de générer une réponse cellulaire biochimique spécifique en réponse à un stimulus donné.

Par conséquent, un même stimulus pourra induire différents signaux calciques, caractérisés par leur forme et intensité, dans différents types cellulaires ; la réponse calcique cellulaire générée par un stimulus particulier dans une cellule donnée constitue **l'empreinte calcique** de la cellule (Dagher et al., 2009) (Figure 43).

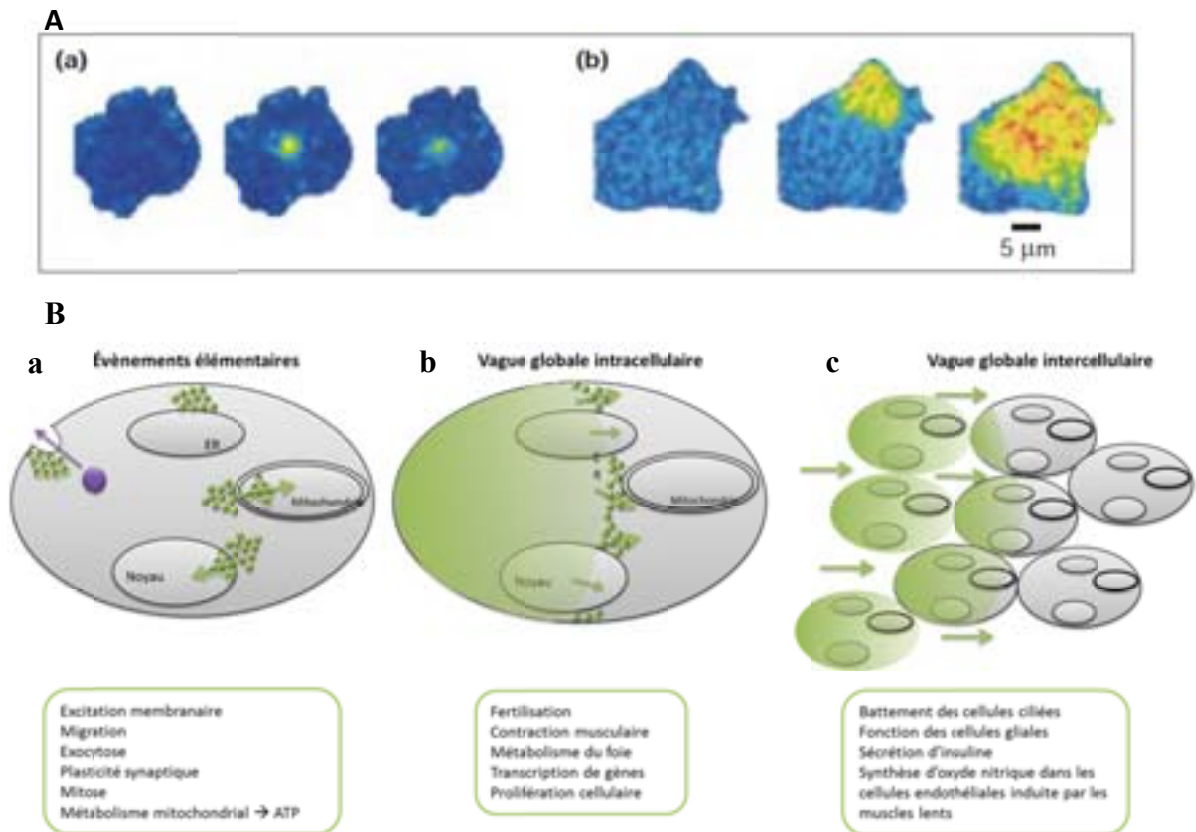


**Figure 43 : Du « calcium toolkit » à l'empreinte calcique d'une cellule.**

L'expression spécifique d'éléments du calcium toolkit par une cellule donnée à un instant donné et l'assemblage des calciprotéines résultantes en calcisomes génère une réponse cellulaire spécifique suite à un stimulus donné. Cette réponse est caractéristique de l'état physiologique de la cellule et constitue une empreinte calcique.

Ce répertoire extensif de composants moléculaires formant le « calcium toolkit », leur assemblage en différentes combinaisons et leur expression cellule-spécifique font du signal calcium un second messager à la fois universel et extrêmement versatile, lui permettant de réguler des processus très divers.

L'ouverture des canaux d'entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme génère de brefs pulses locaux de  $\text{Ca}^{2+}$  (signaux élémentaires) dont la localisation, fréquence, l'amplitude et la durée sont proportionnelles au stimulus (Bootman and Berridge, 1995). La combinaison et la propagation des signaux locaux dans le cytoplasme (vague calcique) génèrent un signal global qui peut être transmis aux cellules voisines (Berridge et al., 2000b) (Figure 44).



**Figure 44: Aspects spatio-temporels d'un signal calcique.**

**A :** Visualisation d'un signal calcique local (a) et global (b). Les zones colorées en bleues indiquent de faibles  $[Ca^{2+}]$ , les zones jaunes et orange indiquent de fortes  $[Ca^{2+}]$ . **B :** a : les événements élémentaires résultent de l'entrée du  $Ca^{2+}$  depuis le milieu extracellulaire ou des stocks internes de  $Ca^{2+}$ , générant des concentrations locales de  $Ca^{2+}$  pouvant activer de nombreuses voies de signalisation. Ces voies de signalisation sont activées par de très fortes  $[Ca^{2+}]$  atteintes uniquement localement au niveau des événements élémentaires. b : les signaux calciques globaux émergent de la coordination d'événements élémentaires produisant une vague calcique qui se propage dans la cellule. c : l'activité de cellules voisines d'un même tissu peut être coordonnée par des vagues intercellulaires qui se propagent d'une cellule à l'autre. Schéma réalisé d'après (Berridge et al., 1999; Berridge et al., 1998; Lipp et al., 1997).

Les signaux calciques rapides et transitoires sont généralement générés par des canaux calciques de la membrane plasmique et des organelles intracellulaires alors que les signaux lents et durables sont générés par les échangeurs de  $Ca^{2+}$  et par une activité diminuée des pompes calciques (Wang et al., 2011). Différents canaux ou transporteurs calciques génèrent des signaux de différente amplitude, durée, localisation, cinétique.

### 3. La Calmoduline : chef d'orchestre de la signalisation calcique

*Calmodulin is the best studied and prototypical example of the E-F-hand family of Ca<sup>2+</sup>-sensing proteins. Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration regulate calmodulin in three distinct ways. First, at the cellular level, by directing its subcellular distribution. Second, at the molecular level, by promoting different modes of association with many target proteins. Third, by directing a variety of conformational states in calmodulin that result in target-specific activation. The calmodulin-dependent regulation of protein kinases illustrates the potential mechanisms by which Ca<sup>2+</sup>-sensing proteins can recognize and generate affinity and specificity for effectors in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner.*

(Chin and Means, 2000)

La Calmoduline (CaM) fut découverte en 1970 (Cheung, 1970; Kakiuchi and Yamazaki, 1970). Elle a été caractérisée comme activant la phosphodiesterase nucléotide cyclique du cerveau et son habilité à lier le Ca<sup>2+</sup> fut démontrée trois ans plus tard ( $K_D \sim 1-10 \mu\text{M}$ ) (Teo and Wang, 1973). Basé sur la découverte progressive de ses propriétés physico-chimiques et fonctionnelles, CaM connut plusieurs appellations jusqu'en 1980 (Watterson et al., 1980).

Sa conservation au cours de l'évolution, son expression ubiquitaire et son rôle central font de cette protéine un acteur très particulier de la signalisation calcique et de sa régulation.

#### **3.1. Importance de CaM dans la signalisation calcique**

CaM est exprimée dans toutes les cellules eucaryotes, au moins à hauteur de 0,1 % des protéines totales ( $10^{-6} - 10^{-5} \text{ M}$ ), dans le cytoplasme et le noyau. CaM est notamment fortement exprimée pendant la différenciation et la division cellulaire où elle se concentre autour de l'appareil mitotique et peut transloquer dans le noyau suite à une stimulation calcique (Li et al., 1999; Luby-Phelps et al., 1995).

CaM interagit avec plus de 100 protéines, que ce soient des enzymes, des récepteurs ou des protéines structurales (Yap et al., 2000) ([http://structbio.vanderbilt.edu/cabp\\_database/](http://structbio.vanderbilt.edu/cabp_database/)) et régule ainsi des processus nombreux, variés et fondamentaux tels que le métabolisme du glycogène, la mobilité intracellulaire, le transport de  $\text{Ca}^{2+}$ , le métabolisme des nucléotides cycliques, les phosphorylations et déphosphorylations de protéines, la progression du cycle cellulaire, la régulation de l'expression des gènes, l'inflammation, la mémoire à long et court terme, ... (Ohya and Botstein, 1994). On notera notamment l'interaction et la régulation de plusieurs protéines du « calcium toolkit » responsables de l'entrée / sortie du  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme avec la Calmoduline : PMCA (Carafoli, 1997), CNG (Trudeau and Zagotta, 2002), VOCs (Zuhlke et al., 1999),  $\text{IP}_3\text{R}$  (Michikawa et al., 1999), RyR (Tang et al., 2002).

### *3.2. Liaison de 4 calciums de façon séquentielle*

Afin de décrire les processus d'activation des cibles de CaM, différents concepts de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à CaM ont été avancés :

- Dans le 1<sup>er</sup> cas, CaM présente 4 sites équivalents et indépendants de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  ; les changements de conformation induits par  $\text{Ca}^{2+}$  sont liés au nombre de sites occupés sans aucune préférence
- Dans le 2<sup>nd</sup> cas, CaM présente 2 sites de forte affinité pour  $\text{Ca}^{2+}$  et 2 sites de plus faible affinité. La liaison coopérative du  $\text{Ca}^{2+}$  aux 2 premiers sites induit un changement conformationnel de CaM, lui permettant d'interagir avec ses cibles ; la fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  dans les 2 derniers sites permettrait alors l'activation des protéines cibles de CaM
- Dans le 3<sup>e</sup> cas, CaM lie  $\text{Ca}^{2+}$  de manière séquentielle, ordonnée et coopérative. En absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , CaM ne présente qu'un seul site de liaison avec une affinité significative pour  $\text{Ca}^{2+}$  ; la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à ce site induit un changement conformationnel du 2<sup>e</sup> site qui passe d'une configuration fermée à une configuration ouverte et dont l'affinité pour  $\text{Ca}^{2+}$  augmente, et ainsi de suite (Figure 45) (Zhang et al., 1995). Ce modèle est asymétrique et est appelé modèle séquentiel (Haiech et al., 1981).



Les motifs EF-hands sont organisés en paires formant un ensemble stable de 2 paires d'hélices; cet appariement favorise une liaison coopérative du  $\text{Ca}^{2+}$  sur la protéine (Bhattacharya et al., 2004). Cette **liaison coopérative du  $\text{Ca}^{2+}$**  à CaM a été proposée dans les années 1980 (Crouch and Klee, 1980; Haiech et al., 1981; Kilhoffer et al., 1988) et l'ordre de remplissage des sites a été identifié 10 ans plus tard (Kilhoffer et al., 1992) : la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  s'effectue de façon séquentielle suivant l'ordre **site III → site IV → site I → site II** (Figure 45). La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  s'effectue avec des affinités de  $10^{-6}$  M environ au niveau du lobe C et de  $10^{-5}$  M environ au niveau du lobe N (Gilli et al., 1998; Kilhoffer et al., 1988; Linse et al., 1991) : CaM est un senseur du  $\text{Ca}^{2+}$  sur une large plage de concentrations. À faible  $[\text{Ca}^{2+}]$ , CaM est dans sa forme apo (libre de  $\text{Ca}^{2+}$ ) : l'hélice alpha joignant les 2 lobes de CaM est dans une conformation étendue. Lorsque  $\text{Ca}^{2+}$  se lie à CaM, cette hélice alpha s'enroule et CaM adopte une conformation plus globulaire, prête à s'enrouler autour de sa cible. Dans le même temps, les 2 domaines, N et C, subissent des changements conformationnels, exposant des zones hydrophobes favorisant leur interaction avec les protéines cibles (Grabarek, 2006).



**Figure 45 : Modèle séquentiel de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à CaM.**  
K1, K2, K3, K4 sont les constantes macroscopiques de liaison du calcium sur les 4 sites de CaM non liée à ses cibles.

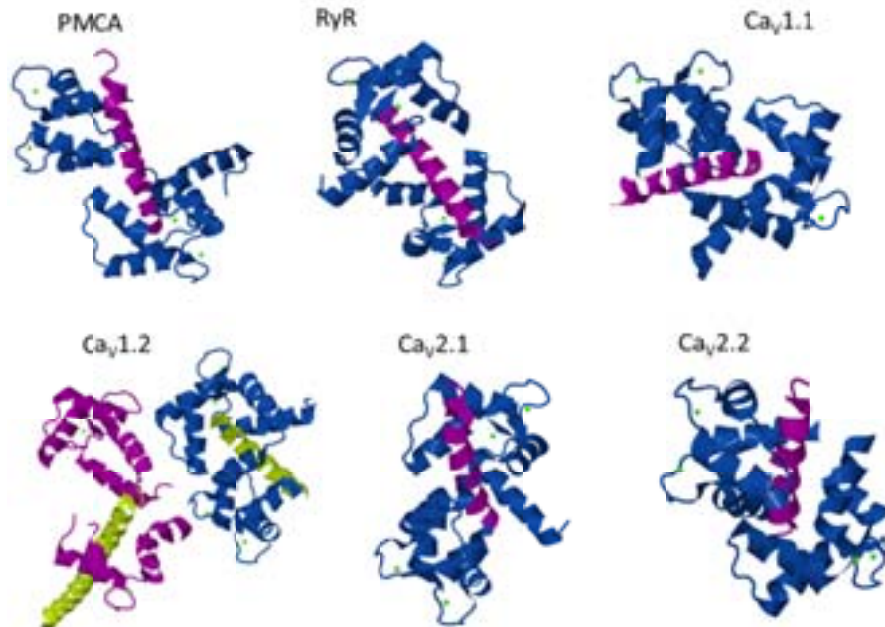
Les constantes macroscopiques de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  à CaM K1, K2, K3, K4 ont été déterminées pour la CaM humaine (hCaM) et SynCaM, protéine hybride entre la CaM des mammifères et des plantes (séquence et alignement de SynCaM en Figure 75 page 198) (Dagher et al., 2010):

	$K_1$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$K_2$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$K_3$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	$K_4$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )
SynCaM	$0.68 \pm 0.03$	$0.022 \pm 0.004$	$0.028 \pm 0.011$	$0.028 \pm 0.014$
hCaM	0.62	0.031	0.039	0.02



### 3.3. Caractérisation de l'interaction de CaM avec ses cibles

L'interaction de CaM avec ses cibles peut se réaliser de façon  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante ou indépendante. Depuis la résolution de la structure de CaM en complexe avec la chaîne légère de la myosine (MLCK) (Ikura et al., 1992; Meador et al., 1992), les études RMN et cristallographiques réalisées sur plusieurs complexes « CaM – cible » soulignent la remarquable plasticité conformationnelle de CaM (Hoeflich and Ikura, 2002). Ces changements conformationnels sont notamment dus à la grande plasticité de l'hélice centrale, permettant aux 2 domaines de s'orienter en solution (Barbato et al., 1992). D'autre part, les 2 domaines de CaM possèdent des surfaces « patch » hautement hydrophobes, riches en résidus méthionine permettant à la protéine d'interagir par des liaisons Van Der Waals avec les résidus hydrophobes de sa protéine cible (Gellman, 1991). Enfin, ajouté à la plasticité conformationnelle de la protéine, la flexibilité des chaînes latérales des résidus de la poche hydrophobe confère à CaM une remarquable plasticité lui permettant de s'adapter au mieux à sa cible (Ikura and Ames, 2006). Aujourd'hui plus de 20 structures de CaM liée à différentes cibles ont été résolues ([www.rcs.org/pdb/](http://www.rcs.org/pdb/)) (Boschek et al., 2008) (Figure 46).



**Figure 46 : Structures de la Calmoduline liée à différentes cibles.**

La Calmoduline a été co cristallisée avec différents peptides cibles. Ces structures ont été obtenues à partir de la PDB sous les codes 2KNE pour la pompe ATPase de la membrane plasmique (PMCA), 2BCX pour le récepteur ryanodine (RyR), 2VAY pour le canal voltage dépendent 1.1 (Ca<sub>v</sub>1.1), 3OXQ pour le canal voltage dépendent 1.2 (Ca<sub>v</sub>1.2), 3VDM pour le canal voltage dépendent 2.1 (Ca<sub>v</sub>2.1) et 3DVJ pour le canal voltage dépendent 2.2 (Ca<sub>v</sub>2.2). La Calmoduline est représentée en bleu, les peptides liés en violet et les ions calcium en vert.

Depuis les années 1980, plusieurs modèles ont été proposés afin de décrire l'interaction de CaM avec ses cibles ; ces modèles font écho aux modèles proposés pour la fixation de  $\text{Ca}^{2+}$  sur CaM.

En absence de  $\text{Ca}^{2+}$ , le domaine N terminal de CaM adopte une conformation fermée dans laquelle les hélices E et F du motif EF-hand sont très proches ; le domaine C terminal adopte une conformation semi ouverte dans laquelle une zone hydrophobe est partiellement accessible au solvant. Cette conformation permet au lobe C d'interagir avec des protéines cibles même à des concentrations calciques intracellulaires de repos (Swindells and Ikura, 1996). La fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur chacun des 4 motifs EF-hands est coordonnée par 7 résidus (Figure 35). La liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  induit des changements dans l'inter-arrangement des hélices E et F menant à une conformation plus ouverte des domaines N et C de CaM (Figure 38).

L'interaction de CaM avec ses cibles augmente l'affinité de CaM pour  $\text{Ca}^{2+}$  d'un facteur 10 environ (Peersen et al., 1997) ; ceci sensibilise le complexe CaM – effecteur aux changements de  $[\text{Ca}^{2+}]$ .

### 3.3.1. Modèle non spécifique

Dans ce 1<sup>er</sup> modèle, la fixation de 2  $\text{Ca}^{2+}$  induit l'exposition de domaines hydrophobes reconnus par les protéines cibles qui interagissent avec CaM. La liaison des 2 derniers  $\text{Ca}^{2+}$  à CaM donne au complexe sa structure finale et régule l'activité de la protéine cible. Ce modèle implique que la première étape de reconnaissance de CaM soit la même pour toutes les protéines. Ce modèle a été abandonné par la construction de mutants de CaM qui interagissent et modulent différemment l'activité de différentes protéines cibles, mettant en évidence des interactions spécifiques de CaM avec ses cibles (Craig et al., 1987; Putkey et al., 1986).

### 3.3.2. Modèle de la clé et la serrure

Le domaine de liaison à CaM (CaMBD) est généralement un peptide de 15 à 30 acides aminés interagissant avec CaM avec une grande affinité, même lorsqu'isolé des autres domaines de la protéine cible. Les CaMBDs ont été identifiés par comparaison des séquences de plus de 180 protéines ; ils ne sont pas caractérisés par une séquence consensus mais par une nature

hydrophobe ou basique et classés en différentes classes (Hoeflich and Ikura, 2002), (<http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb>) :

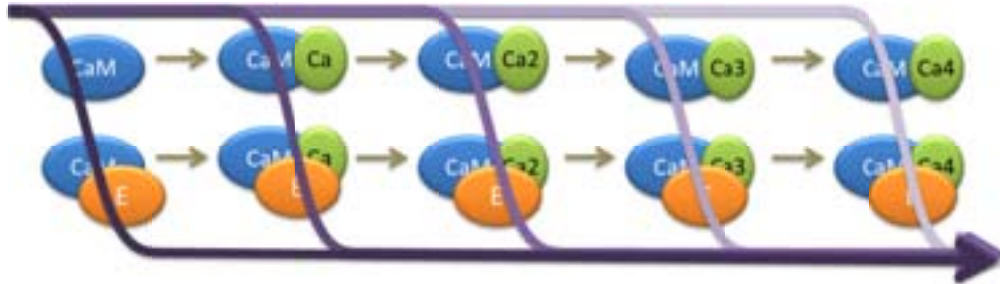
- CaMBDs liant CaM dans un ratio 1:1 ou classe de l'hélice alpha canonique. Dans ces structures, CaM s'enroule autour du peptide ; cette classe est divisée en 4 sous-classes selon la position des résidus de CaMBD interagissant avec CaM (1-10, 1-14, IQ et autres motifs)
- CaMBDs liant CaM dans un ratio CaM:CaMBD 1:2. La liaison de CaM à des protéines ayant un CaMBD de ce type induit l'homodimérisation et l'activation de la protéine ou le recrutement d'une autre protéine (hétérodimère)
- CaMBDs liant CaM dans un ratio 2:2. La liaison de CaM à des protéines ayant un CaMBD de ce type induit l'homodimérisation et l'activation de la protéine ou le recrutement d'une troisième protéine

Dans ce modèle, une mutation donnée de CaM permet bien de diminuer son interaction avec certains domaines spécifiques mais la dépendance au  $\text{Ca}^{2+}$  de ces interactions provient uniquement d'une régulation spatiale de l'interaction de CaM avec ses cibles : l'activation CaM-dépendante de protéines du signalosome calcique dépend de la colocalisation de ces protéines avec CaM à proximité de l'endroit où se trouve le signal  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce modèle ne permet pas la discrimination entre protéines cibles colocalisant et ayant des propriétés opposées, telles que les canaux et pompes.

### 3.3.3. Modèle dépendant du nombre de $\text{Ca}^{2+}$ liés à CaM ou de l'adaptation des conformations des partenaires

Dans ce dernier modèle, l'interaction de CaM avec ses protéines cibles dépend non seulement des spécificités structurales des 2 entités mais également de la conformation calcium dépendante adoptée par CaM (Dagher et al., 2010) : CaM adopte différentes conformations selon que 0, 1, 2, 3 ou 4  $\text{Ca}^{2+}$  soient liés. La spécificité de l'interaction CaM – protéine cible vient alors de la protéine cible qui reconnaît soit la forme apoCaM, soit l'une des formes  $\text{Ca}_n\text{CaM}$  ( $n = 1 - 4$ ) (Figure 47). Ce modèle permet une régulation cinétique, une régulation

temporelle s'ajoutant à la régulation spatiale, et donc une spécificité des protéines régulées par CaM pour un signal calcium donné.



**Figure 47 : Interaction de la Calmoduline avec ses cibles en fonction du nombre d'ions calcium liés à la Calmoduline.** Le nombre de  $\text{Ca}^{2+}$  liés à la Calmoduline, à un moment donné, dépend des caractéristiques du signal calcium et génère des conformations spécifiques des protéines permettant des interactions protéine – protéine spécifiques.

### **3.4. Activation des protéines effectrices du signal calcium par la Calmoduline**

Suite à l'interaction CaM – CaMBD, la modulation de l'activité de la protéine cible de CaM (en général activation) peut s'effectuer de plusieurs façons (Figure 48):

- Levée de l'auto-inhibition : ce modèle est commun aux protéines liant CaM dans un ratio 1:1 avec un CaMBD ayant un motif différent d'IQ. Dans ce modèle, modèle du pseudo-substrat, le CaMBD obstrue le site catalytique de la protéine, empêchant le substrat de s'y lier. L'enroulement de CaM autour de ce CaMBD permet de lever cette inhibition. Dans cette catégorie, on retrouve des kinases (CaM kinases I, II, IV, la chaîne légère de la myosine, CaM kinase kinase) (Kobe et al., 1997), des phosphatases (calcineurine) ainsi que la PMCA (Falchetto et al., 1991) ou l'adénylate cyclase de l'anthrax Edema Factor (Drum et al., 2002).
- Remodelage du site d'activation pour certains CaMBDs caractérisés par un motif IQ (IQxxxRGxxxR). Dans cette catégorie, on retrouve des canaux calciques et des myosines. Ce motif favorise dans certains cas l'association de CaM avec sa protéine cible indépendamment de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , par exemple pour les canaux capacitifs TRP4 (Jurado et al., 1999; Trost et al., 2001). Dans le cas des canaux calciques voltage dépendants ( $\text{Ca}_v$ ), la liaison de CaM au domaine IQ peut avoir une régulation positive ou négative du canal, selon le nombre de  $\text{Ca}^{2+}$  liés à CaM (Lee et al., 1999; Zuhlke et al., 1999).

- Dimérisation et activation pour les protéines interagissant avec CaM selon une stœchiométrie 1:2 ou 2:2, tels que le canal potassium  $\text{Ca}^{2+}$  dépendent (Schumacher et al., 2001) ou la glutamate décarboxylase des plantes (Yuan and Vogel, 1998).

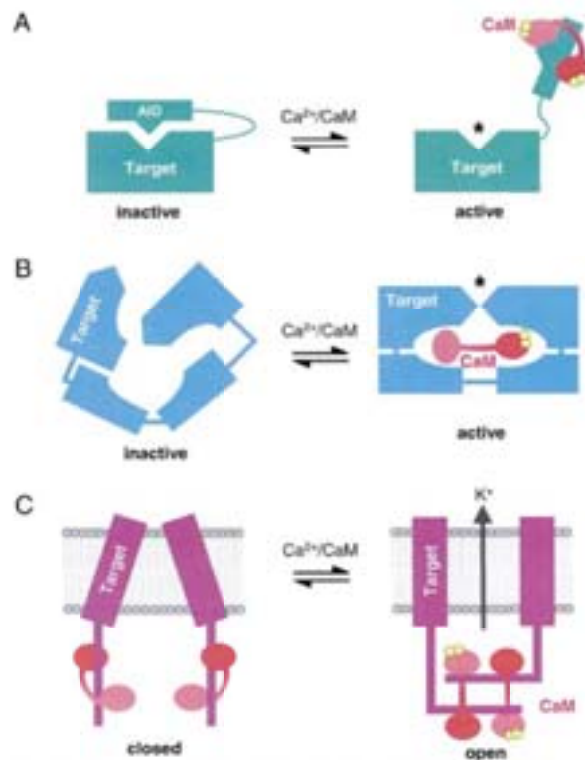


Figure 48 : Mécanismes d'activation de protéines par la Calmoduline.

**A** : Élimination de l'autoinhibition. **B** : Remodelage du site d'activation. **C** : Dimérisation. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  sont représentés en jaune et les sites actifs par des astérisques. AID : domaine d'auto inhibition (Hoeflich and Ikura, 2002).

#### 4. Utilisation d'inhibiteurs de CaM

La voie de signalisation  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  est impliquée dans plusieurs processus cellulaires, via l'activation de ses protéines cibles, et un certain nombre de maladies inflammatoires, de cancers, de dysfonctionnements cardiaques sont associés à une dérégulation de CaM (Anderson, 2002; Colomer et al., 2007; Mayur et al., 2006a; Shim et al., 2007a; Vadakkan et al., 2006). Pour analyser son rôle, plusieurs approches ont été utilisées, parmi lesquelles l'étude de sa localisation cellulaire (Hahn et al., 1992; Li et al., 1999; Luby-Phelps et al., 1995), la résolution de structures RMN (Boschek et al., 2008; Ikura et al., 1992), l'élaboration de mutants (Chin et al., 1997; Craig et al., 1987; Ohya and Botstein, 1994; VanScyoc et al., 2006) ou encore l'utilisation d'inhibiteurs. Parmi les inhibiteurs utilisés le plus couramment, on retrouve le trifluoperazine (**TFP**) (Levin and Weiss, 1977), des composés ayant un noyau

naphtalen **W7** (Hidaka et al., 1978), **W13** (Tanaka et al., 1982) ainsi que leurs homologues chlorés moins actifs **W5** (Hidaka et al., 1981) et **W12** (Tanaka et al., 1982), le **calmidazolium** ou **R24571** (Gietzen et al., 1981), le **bifonazole** (Hegemann et al., 1993), le **composé 48/80** (Gietzen et al., 1983).

L'utilisation de ces différents inhibiteurs suggère que CaM présente plusieurs sites de liaison pour différentes molécules chimiques, inhibant ainsi sélectivement la liaison de CaM avec certaines de ses cibles.

Les molécules capables d'interagir avec différentes conformations de CaM et ainsi de perturber de manière différentielle les diverses fonctions de cette protéine sont des outils nécessaires pour disséquer les mécanismes moléculaires et le rôle de CaM dans une cellule eucaryote dans un état physiologique donné.

Les molécules utilisées aujourd'hui comme antagonistes de CaM ne permettent pas d'explorer toutes les fonctionnalités de cette protéine. En effet, la plupart de ces molécules manquent de **spécificité vis-à-vis de CaM** (Blackmore et al., 1981; Norman et al., 1979), générant des effets secondaires plus ou moins importants lors de l'usage médicamenteux de ces composés (Whitaker, 2004), et leur diversité chimique rend les analyses de relation structure-activité difficiles (Hidaka et al., 1978). Pour pallier à cet obstacle, des couples de molécules structurellement très proches ont été dessinés : une molécule ayant une forte affinité pour CaM et son quasi homologue ayant une faible affinité. Ces couples, W5 / W7 et W12 / W13, ont ainsi été utilisés pour différencier les effets dépendants des effets indépendants de CaM de ces composés (Hidaka et al., 1981) et avoir une meilleure compréhension des **relations structure - activité** (Tanaka et al., 1982).

Cependant, si l'utilisation de couples de molécules permet d'observer les effets de l'inhibition de CaM de façon plus restreinte, elle ne permet ni d'assurer la spécificité d'interaction de ces molécules avec CaM dans la cellule ni d'explorer les **différentes fonctionnalités de CaM** ; ceci ne peut être approché qu'en utilisant i) plusieurs inhibiteurs de CaM d'une même famille chimique pour s'assurer de leur spécificité d'interaction et ii) plusieurs familles chimiques de molécules pour déchiffrer les différentes conformations de CaM impliquées dans les événements cellulaires observés.

## Objectif et Stratégie

Comme nous l'avons souligné dans cette partie, la signalisation calcique d'une cellule d'une part et l'interaction de CaM avec les différents éléments de ce système d'autre part sont très complexes à la fois par la quantité, l'omniprésence, les interconnexions et les régulations spatio-temporelles de la signalisation calcique.

L'objectif de ce chapitre est d'utiliser des petites molécules chimiques afin de caractériser l'écosystème calcique d'une cellule donnée dans le but d'identifier des biomarqueurs d'un état physiologique donné ou en vue d'une utilisation thérapeutique ultérieure.

Pour cela, nous avons mis en place une stratégie, schématisée dans la Figure 49 nous permettant de caractériser au mieux ces biomarqueurs.

Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier des molécules chimiques capables d'interagir avec CaM ; ceci a été réalisé à travers un criblage de chimiothèques par anisotropie de fluorescence, en compétition avec une sonde liant CaM. Les molécules sélectionnées ont ensuite été caractérisées par des études préliminaires chimiques, de thermodynamique de liaison à CaM, de disponibilité biologique et de pertinence d'utilisation biologique.

Les molécules ainsi identifiées et caractérisées ont ensuite été utilisées dans 2 optiques différentes : en tant qu'outils de recherche d'une part et outils thérapeutiques d'autre part.

L'utilisation de ces molécules peut en effet permettre de mieux comprendre l'interaction de CaM avec ses cibles. Selon la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ , CaM adopte différentes conformations et peut par conséquent interagir avec des cibles différentes. Nous postulons que la liaison d'antagonistes à CaM inhibe certaines conformations de CaM et donc la liaison de CaM à certaines de ces cibles. Nous avons donc dans un premier temps cherché à caractériser l'interaction de CaM avec ses cibles selon  $[\text{Ca}^{2+}]$  puis dans un second temps à perturber les complexes CaM – protéines cibles par les antagonistes de CaM précédemment caractérisés. Au cours de cette étape, nous assumerons que la liaison de CaM à ses cibles peut être résumée à un CaMBD linéaire d'une vingtaine d'acides aminés comme présenté dans cette partie (page 112). La comparaison des complexes CaM-peptides inhibés par les antagonistes selon la



conformation de CaM (dépendante de  $[Ca^{2+}]$ ) optimale requise pour l'interaction avec ses cibles devrait nous permettre i) de confirmer la diversité des interactions des antagonistes avec CaM et ii) d'obtenir des antagonistes inhibant CaM de façon conformation dépendante, i.e. des antagonistes inhibant une ou plusieurs conformations de CaM.

Nous avons également postulé que l'utilisation de ces molécules pouvait avoir un effet thérapeutique. Comme cité plus haut, l'utilisation d'antagonistes de CaM a été approuvée pour le traitement de certaines pathologies, principalement psychiatriques. Aujourd'hui, de rares équipes de recherche montrent les bénéfices de l'utilisation d'antagonistes de CaM dans le traitement de certaines tumeurs. Nous cherchons donc à identifier des antagonistes de CaM qui pourraient être utilisés dans le cadre d'un traitement des glioblastomes, permettant de sensibiliser les gCSCs à des traitements aujourd'hui peut actifs. Nous avons pour cela caractérisé la perturbation de l'homéostasie calcique induite suite à l'ajout des antagonistes sur plusieurs types cellulaires que nous avons comparés à des cellules primaires propagatrices de glioblastome. Dans cette étape, nous espérons pouvoir identifier une ou plusieurs molécules mettant en évidence un déséquilibre spécifique de l'homéostasie calcique, i.e. une empreinte calcique spécifique de ces cellules.

Enfin, la comparaison des cibles de CaM dont la liaison est inhibée par ces antagonistes avec la modulation différentielle de l'homéostasie calcique de différents types cellulaires nous paraît un bon moyen d'identifier et de caractériser le rôle de CaM dans l'homéostasie calcique des cellules propagatrices de glioblastome.



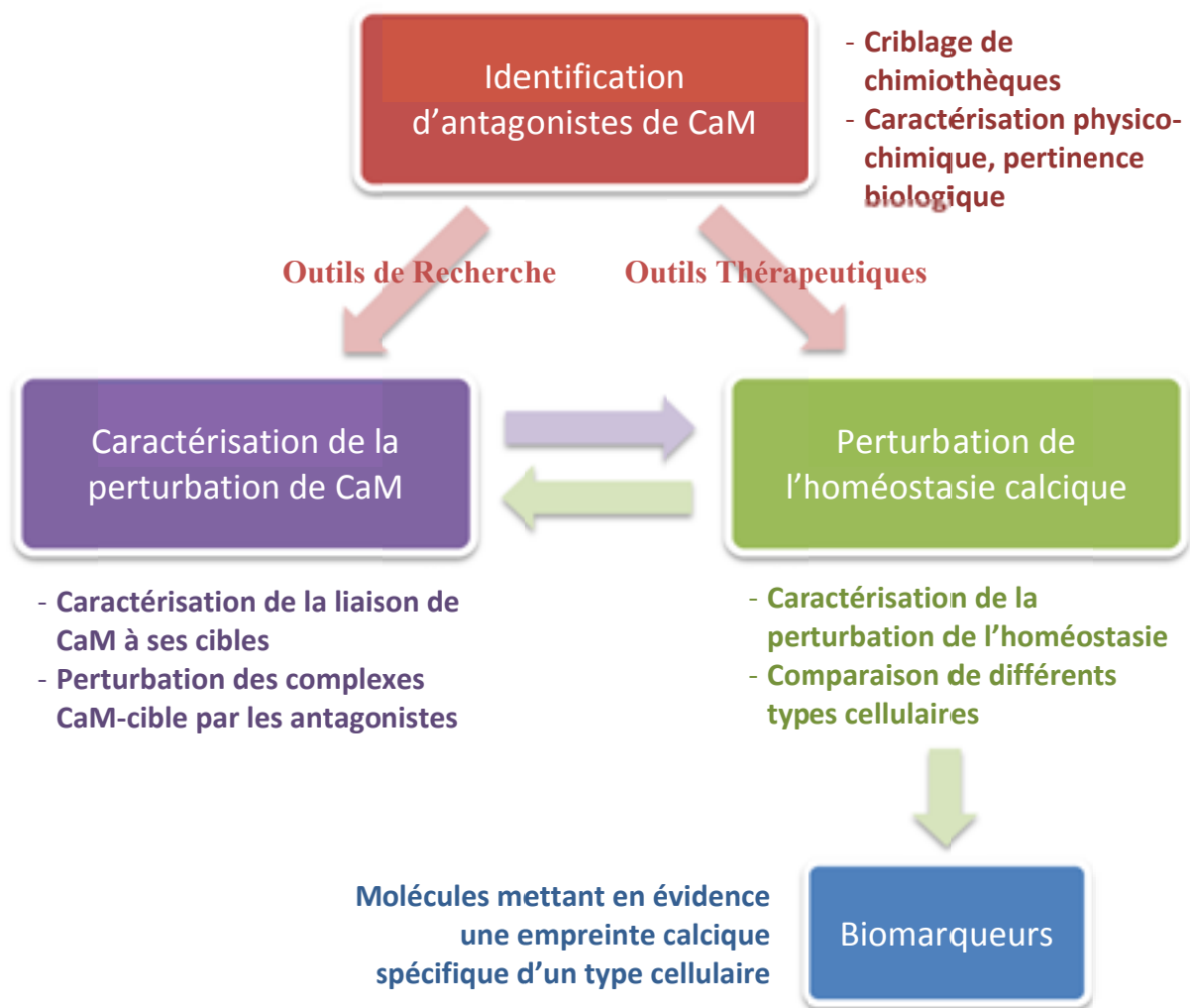
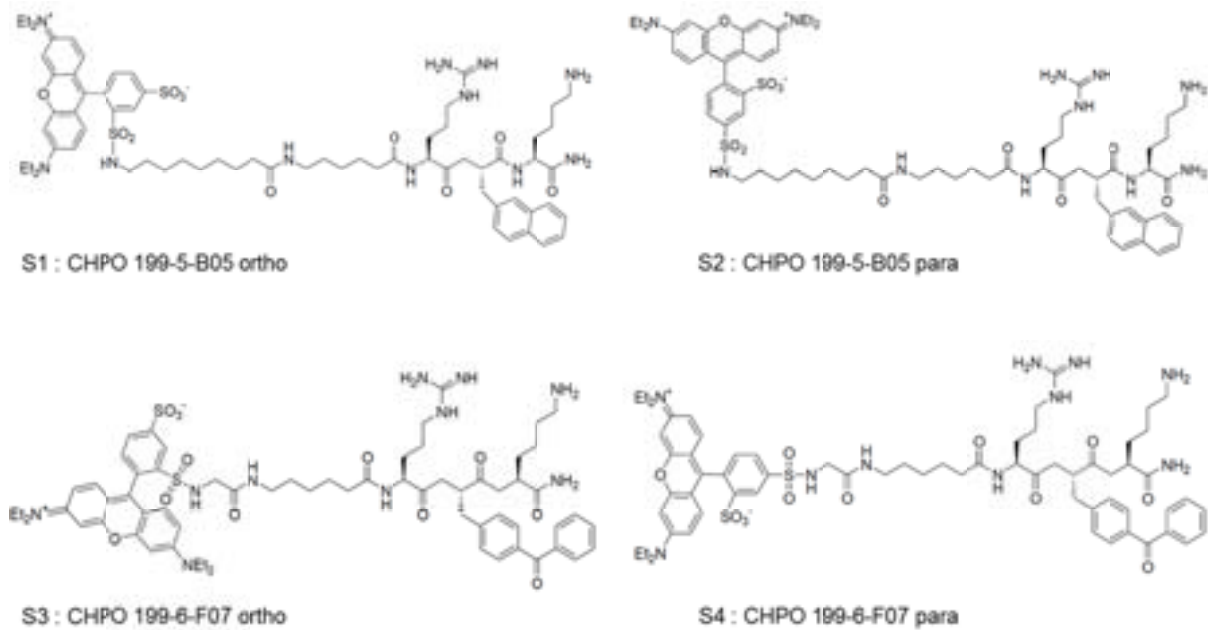


Figure 49: Stratégie appliquée pour identifier de potentiels marqueurs de l'écosystème calcique d'une cellule.

## II. Identification et caractérisation de petites molécules chimiques interagissant avec la Calmoduline

### 1. Caractérisation de la liaison des sondes de CaM à SynCaM<sup>1</sup>

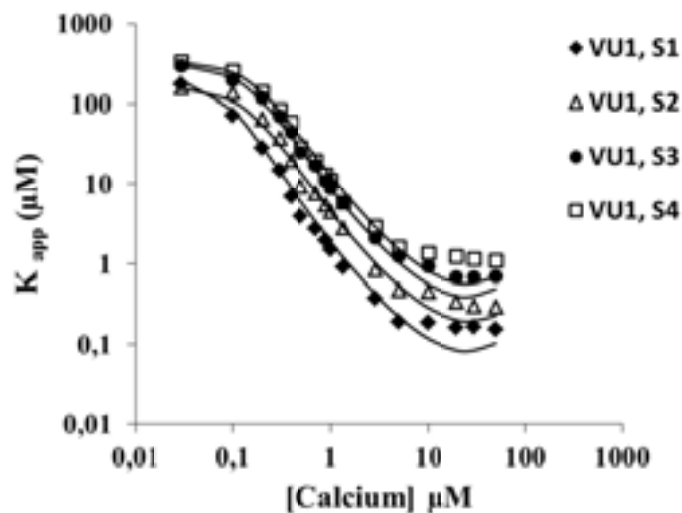
Les composés fluorescents **CHPO 199-5-B05** et **CHPO 199-6-F07** ont été sélectionnés à partir d'un précédent criblage visant à identifier des molécules fluorescentes liant CaM (Dagher et al., 2006). Ces sondes appartiennent respectivement aux familles naphthalènes et benzophénones. La resynthèse de ces composés a donné un mélange d'isomères ortho et para dans les deux cas ; ces isomères ont été isolés et caractérisés (Dagher et al., 2006; Maximciuc et al., 2006). Les isomères CHPO 199-5-B05 ortho et para sont appelés respectivement **sondes S1 et S2**, les isomères CHPO 199-6-F07 ortho et para sont appelés respectivement **sondes S3 et S4** ; leurs structures sont données dans la Figure 50.



**Figure 50 : Structure des sondes fluorescentes de CaM sélectionnées lors d'un criblage de molécules fluorescentes.** Les sondes ont été sélectionnées au cours d'un criblage précédant (Dagher et al., 2006) et sont composées de i) un pharmacophore, ii) un fluorophore et iii) un espaceur entre le corps de la molécule et le dye fluorescent. Les isomères ortho / para de CHPO 199-5-B05 et CHPO 199-6-F07 correspondent respectivement aux sondes fluorescentes de CaM S1, S2, S3 et S4.

<sup>1</sup> Les données de cette partie ont été générées par Dr Rania Dagher, UMR 7200.

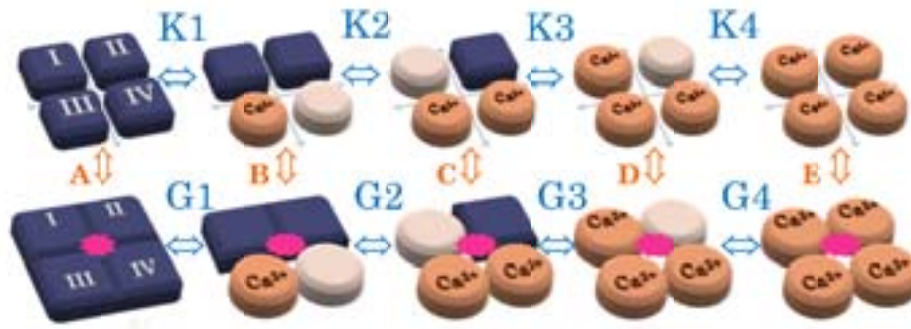
Les sondes S1, S2, S3 et S4 interagissent avec SynCaM (Figure 75) de façon  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante (Dagher et al., 2006) ; cette dépendance au calcium a été étudiée plus précisément à l'aide d'une matrice de titration. Pour chaque  $[\text{Ca}^{2+}]$ , la courbe de liaison de la matrice de titration (concentration en sonde fixe, concentration de SynCaM variable) a été alignée par une équation supposant un unique site de liaison en utilisant une régression non linéaire (Dagher et al., 2006). Pour chaque courbe, une valeur apparente de dissociation ( $K_{app}$ ) de la sonde à SynCaM a été déterminée à une  $[\text{Ca}^{2+}]$  donnée. L'ensemble des valeurs  $K_{app}$  ainsi obtenues ont ensuite été représentées en fonction de  $[\text{Ca}^{2+}]$ , Figure 51.



**Figure 51 : Constantes apparentes de dissociation  $K_{app}$  des sondes S1, S2, S3 et S4 titrées sur SynCaM en fonction de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$ .**

La matrice de titration a été réalisée avec 20 tampons calciques calibrés différents de 0 à 1 mM dans un tampon 30 mM MOPS, 100 mM KCl, pH 7.2. Les sondes de CaM (S1, S2, S3, S4) ont été préparées à une concentration finale de 0.1  $\mu\text{M}$  et ont été titrées dans chaque tampon calcique avec une concentration de SynCaM variable de 0,08 à 10  $\mu\text{M}$ . Les constantes de dissociation obtenues à l'équilibre ( $K_{app}$ ) des sondes pour SynCaM dans chaque tampon calcique ont été déterminées par une régression non linéaire. Les valeurs de  $K_{app}$  sont représentées en fonction de la concentration libre de  $\text{Ca}^{2+}$ .

La dépendance au calcium du comportement des sondes de CaM a été modélisée selon un modèle macroscopique (présenté en Figure 52) en assumant qu'il n'y ait qu'un seul site de liaison de chaque sonde à CaM (démonstré par titration à saturation de la sonde). En supposant un modèle séquentiel de liaison, ce modèle permet de déterminer les valeurs des constantes d'association A, B, C, D et E de la liaison des sondes à SynCaM liée respectivement à 0, 1, 2, 3 ou 4  $\text{Ca}^{2+}$  sur un site particulier de CaM (Dagher et al., 2010).



**Figure 52 : Modèle séquentiel de la liaison des sondes ou de peptides fluorescents à la Calmoduline.**

L'étoile rose représente la sonde ou le peptide fluorescents. K1, K2, K3, K4 sont les constantes macroscopiques d'association du calcium à chaque site de CaM en absence de peptide ou de sonde. G1, G2, G3, G4 sont les constantes macroscopiques d'association du calcium à chaque site de CaM en présence de peptide ou de sonde. A, B, C, D, E représentent les constantes d'association du peptide ou de la sonde aux différents complexes  $Ca_nCaM$  ( $n = 0 - 4$ ).

Les valeurs de K1, K2, K3 et K4 ont été déterminées par titration calorimétrique isothermique (Dagher et al., 2010) ;  $K_{app}$  est corrélé à  $[Ca^{2+}]$ , selon le schéma d'Adair-Klotz, à partir de cette équation :

$$K_{app} = \frac{1 + K_1x + K_1K_2x^2 + K_1K_2K_3x^3 + K_1K_2K_3K_4x^4}{A(1 + G_1x + G_1G_2x^2 + G_1G_2G_3x^3 + G_1G_2G_3G_4x^4)}$$

Où  $x$  est la concentration du  $Ca^{2+}$  libre, K1 à K4 et G1 à G4 les constantes d'association du  $Ca^{2+}$  à CaM, et A la constante d'association des sondes à CaM en absence de  $Ca^{2+}$ . Les constantes d'association B, C, D et E sont calculées d'après ces relations :

$$B = \left(\frac{G_1}{K_1}\right)A \quad C = \left(\frac{G_1G_2}{K_1K_2}\right)A \quad D = \left(\frac{G_1G_2G_3}{K_1K_2K_3}\right)A \quad E = \left(\frac{G_1G_2G_3G_4}{K_1K_2K_3K_4}\right)A$$

Les constantes d'affinité des complexes  $CaM-Ca_n$  ( $n = 0 - 4$ ) pour les sondes S1, S2, S3 et S4 sont données dans le Tableau 4.

	A ( $\mu M^{-1}$ )	B ( $\mu M^{-1}$ )	C ( $\mu M^{-1}$ )	D ( $\mu M^{-1}$ )	E ( $\mu M^{-1}$ )
SynCaM / S1	0.0047	0.0047	48	2.5	6
SynCaM / S2	0,0050	0.0050	15	1.0	3
SynCaM / S3	0,0027	0,0027	8	0.4	1,1
SynCaM / S4	0.0028	0.0028	7	0.3	0,9

**Tableau 4 : Constantes d'association de l'interaction de SynCaM avec les sondes à différents degrés de saturation calcique.**

A, B, C, D, E sont les constantes d'association de la sonde à VU1 complexée à 0, 1, 2, 3, ou 4  $Ca^{2+}$ . Les valeurs ont été obtenues à partir des courbes de liaison des sondes à VU1 en fonction de  $[Ca^{2+}]$  dans une matrice de titration. Les données expérimentales ont été exploitées selon un modèle de liaison séquentiel.

Les résultats peuvent être résumés comme suit

- Il n'y a pas de liaison significative des sondes à apoSynCaM ou SynCaM-Ca<sub>1</sub>
- La liaison des sondes S1, S2, S3 et S4 à SynCaM requiert au moins 2 Ca<sup>2+</sup>
- L'affinité de liaison des sondes à SynCaM est modulée par la liaison des 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> Ca<sup>2+</sup>

Les 4 sondes présentent un comportement similaire de liaison aux différents complexes CaM-Ca<sub>n</sub> (n = 0 - 4), suggérant qu'elles partagent le même site de liaison à SynCaM. La comparaison des constantes d'association de la liaison des isomères S1 et S2 à VU1, montre une différence d'un facteur 3 alors que les constantes d'association des sondes S3 et S4 aux complexes CaM-Ca<sub>n</sub> sont quasiment identiques (Tableau 4). Ceci suggère que la partie lissamine du composé CHPO 199-5-B05 est impliquée dans l'interaction de la sonde avec SynCaM.

Une fois que la liaison des sondes à SynCaM a été caractérisée, nous avons effectué un criblage compétitif par anisotropie de fluorescence en utilisant les isomères ortho (sondes S1 et S3), sondes ayant la plus forte affinité pour SynCaM en conditions saturantes de Ca<sup>2+</sup>.

## 2. Identification et caractérisation de petites molécules interagissant avec CaM

### 2.1. Criblage par compétition avec les sondes fluorescentes pour la liaison à CaM<sup>2</sup>

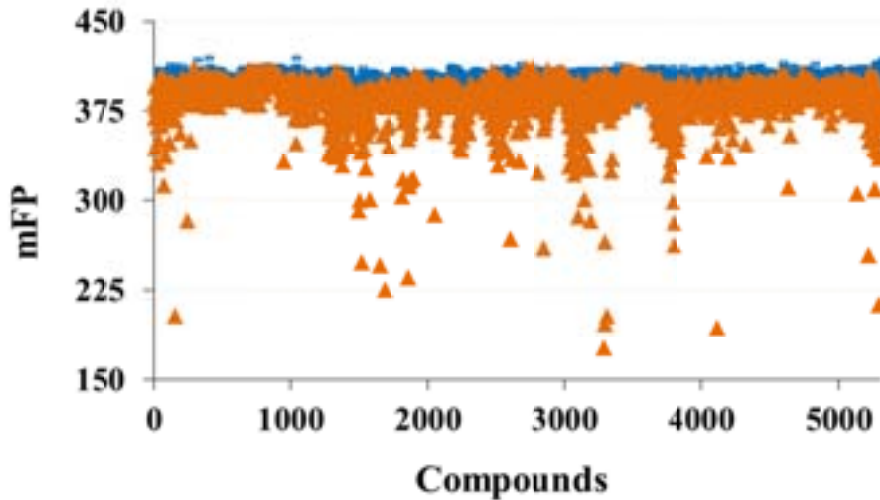
Les chimiothèques Patrimoine de Strasbourg et Prestwick Chemical, contenant 6000 molécules, ont été criblées sur SynCaM à 10 µM par anisotropie de fluorescence en compétition avec les sondes S1 et S3.

Les mesures des valeurs de FP sont basées sur un changement de la polarisation de fluorescence lorsqu'un composé se lie à la protéine (Annexe I): en absence de molécules compétitrices, les sondes sont liées à CaM et la valeur de polarisation de fluorescence est

---

<sup>2</sup> Les données de cette partie ont été générées par Dr Rania Dagher, UMR 7200.

élevée (environ 410 et 375 mFP pour S1 et S3 respectivement) ; lorsqu'une molécule se lie à la protéine, la sonde peut être déplacée et la valeur de polarisation de fluorescence diminue (entre 375 et 180 mFP pour S1 et entre 340 et 180 pour S3). La diminution globale des valeurs FP (390 et 330 mFP pour S1 et S3 respectivement) suivant l'ajout des composés est due à l'effet de dilution (Figure 53).



**Figure 53 : Criblage compétitif par anisotropie de fluorescence sur le complexe SynCaM – S1.**

L'essai compétitif a été réalisé avec 0.1  $\mu$ M de sonde S1 mélangée à 2  $\mu$ M de SynCaM dans un tampon 50 mM Hepes, 150 mM KCl, 10  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,5. Les chimiothèques Patrimoine et Prestwick ont été criblées à une concentration finale de 10  $\mu$ M. L'effet de chaque composé (axe des abscisses) sur le déplacement de S1 du complexe SynCaM – S1 est évalué par polarisation de fluorescence (axe des ordonnées). Légende : ■ valeurs mFP du complexe SynCaM-S1, ▲ valeurs mFP mesurées après l'ajout des composés.

La qualité de l'essai est évaluée par l'analyse du paramètre statistique  $Z'$  (Zhang et al., 1999). Le facteur  $Z'$  évalue la différence des signaux mesurés en conditions polarisée (sonde liée à la protéine) et dépolarisée (sonde libre) en prenant en compte la variabilité de l'essai. La valeur obtenue pour nos données est  $Z'=0,85$ . Typiquement, une valeur de  $Z'$  comprise entre 0,5 et 1 est excellente du fait de l'importance de la gamme dynamique.

Les valeurs mFP obtenues pour le criblage compétitif varient entre 170 et 375 pour la sonde S1 et entre 170 et 340 pour la sonde S2. Le ratio de déplacement des sondes (Probe FP-ratio) S1 et S3 est calculé pour chaque composé selon l'équation suivante :

$$Probe\ FP - ratio = \frac{mFP_{max} - mFP_{experimental}}{mFP_{max} - mFP_{min}}$$

Avec les valeurs de  $mFP_{max}$  et  $mFP_{min}$  fixées à respectivement 430 et 170 pour les 2 sondes. Les valeurs calculées de déplacement des sondes varient entre 0 et 1.

De ce criblage, nous avons pu sélectionner 10 molécules de la chimiothèque de Strasbourg et 37 molécules de la chimiothèque de Prestwick présentées en Annexe II. Le critère de sélection de ces composés est un ratio déplacement de la sonde S1 d'une valeur supérieure à 0,36 calculée à partir de l'équation précédente.

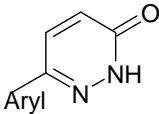
En plus des molécules appartenant aux chimiothèques Prestwick et Patrimoine, des molécules commerciales antagonistes de CaM sont sorties de ce criblage, servant de « contrôle positif » pour cet essai compétitif. Il s'agit des antagonistes W7, W13, Bifonazole, Calmidazolium, TFP, Fluphenazine et Clorpromazine.

### 2.2. Classification des hits en familles chimiques<sup>3</sup>

L'analyse structurale des composés sélectionnés nous a permis de les classer en différentes familles chimiques par analogie de structure :

Famille I: éthylène diamines N,N disubstitués	
Famille II: pyridazines aminoalkyles et triazines	
Famille III: analogues du trifluoperazine ou biphényles	
Famille IV: alkylène bis-amidiniums	$R1 - N^+ - (C)n - N^+ - R2$
Famille V: ammonium quaternaires et dérivés nipecotates	

<sup>3</sup> La classification des molécules a été effectuée par Bruno Didier, responsable chimiothèques UMR 7200 et UMS 3286

Famille VI: 6-aryl-pyridazin-4-one	
Famille VII: chalcones et analogues cycliques	
Famille VIII: acides carboxyliques	
Famille IX: non classifiés	

**Tableau 5 : Familles chimiques des antagonistes de la Calmoduline.**

Les molécules sélectionnées au cours du criblage ont été classées en différentes familles chimiques caractérisées par un pharmacophore.

Les structures chimiques des molécules sélectionnées sont données en Annexe II.

### 2.3. Valeurs de $K_i$ et caractérisation de la liaison à $CaM^4$

La caractérisation des mécanismes de liaison des molécules sélectionnées à SynCaM a été effectuée dans un premier temps à travers l'analyse de leur comportement compétitif pour les sondes S1 et S3. Les sondes S1 et S3 se lient à leur site de haute affinité avec des valeurs respectives de  $K_d$  de 0,18 et 0,9  $\mu M$  (Dagher et al., 2009). En conditions saturantes en  $Ca^{2+}$ , l'augmentation de la concentration des composés induit la diminution de la quantité de sonde liée à SynCaM et l'augmentation du degré de polarisation selon une courbe sigmoïde.

Afin d'évaluer les constantes de dissociation  $K_i$  des molécules interagissant avec CaM, les complexes SynCaM – sonde fluorescente ont été titrés avec chaque molécule sélectionnée en conditions saturantes en  $Ca^{2+}$ . Les données expérimentales ont permis de calculer une courbe théorique de liaison des composés à SynCaM selon un modèle compétitif décrit par (Roehrl et al., 2004) en considérant 1 site de liaison pour la sonde et une compétition directe entre la sonde et la molécule sélectionnée (CaM – interactor). Quelques-uns de ces essais sont présentés dans la Figure 54, les valeurs de  $K_i$  obtenues pour chaque molécule sont rapportées en Annexe II.

<sup>4</sup> Les données expérimentales de cette partie ont été générées par Dr Rania Dagher, UMR 7200.



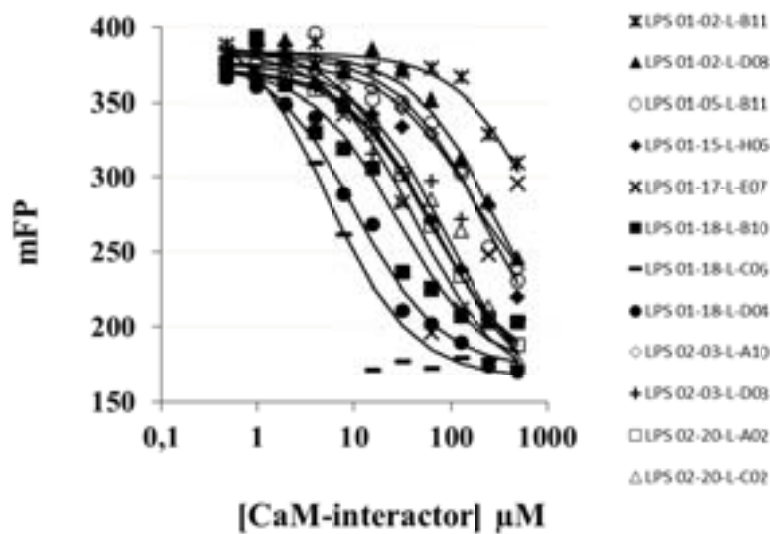


Figure 54 : Courbes de titration des molécules interagissant avec CaM des familles amino-alkyl pyridazine et triazine par compétition avec la sonde S1.

Les changements de polarisation de fluorescence sont mesurés en fonction de la concentration des molécules interagissant avec CaM (de 0,5 à 500  $\mu\text{M}$ ) dans un tampon 50 mM Hepes, 150 mM KCl, 100  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  pH 7.2. La concentration de SynCaM est de 0,1  $\mu\text{M}$  et mélangée préalablement à 0,1  $\mu\text{M}$  de sonde S1. Les données ont été analysées par le modèle compétitif décrit par (Roehrl et al., 2004).

D'après les valeurs de  $K_i$  obtenues, nous pouvons en déduire que pour chaque famille chimique l'affinité de liaison des molécules interagissant avec CaM dépend du groupement de substitution présent sur le pharmacophore représentatif de la famille. Ceci suggère que les molécules explorent différents sites de liaison, permettant ainsi d'analyser les mécanismes moléculaires de l'interaction de CaM avec ses protéines cibles en utilisant différentes molécules.

Les sondes S1 et S3 partageant probablement un même site de liaison pour CaM, les valeurs de  $K_i$  obtenues pour une même molécule en compétition avec S1 et S3 doivent être identiques si la molécule se lie au même site de liaison que les sondes et peut être différente si il s'agit d'un site de liaison allostérique (Figure 55). Par exemple, la molécule LPS 02-10-L-A07 est caractérisée par un ratio entre ses deux constantes de dissociation de 4,5, suggérant un site de liaison allostérique.

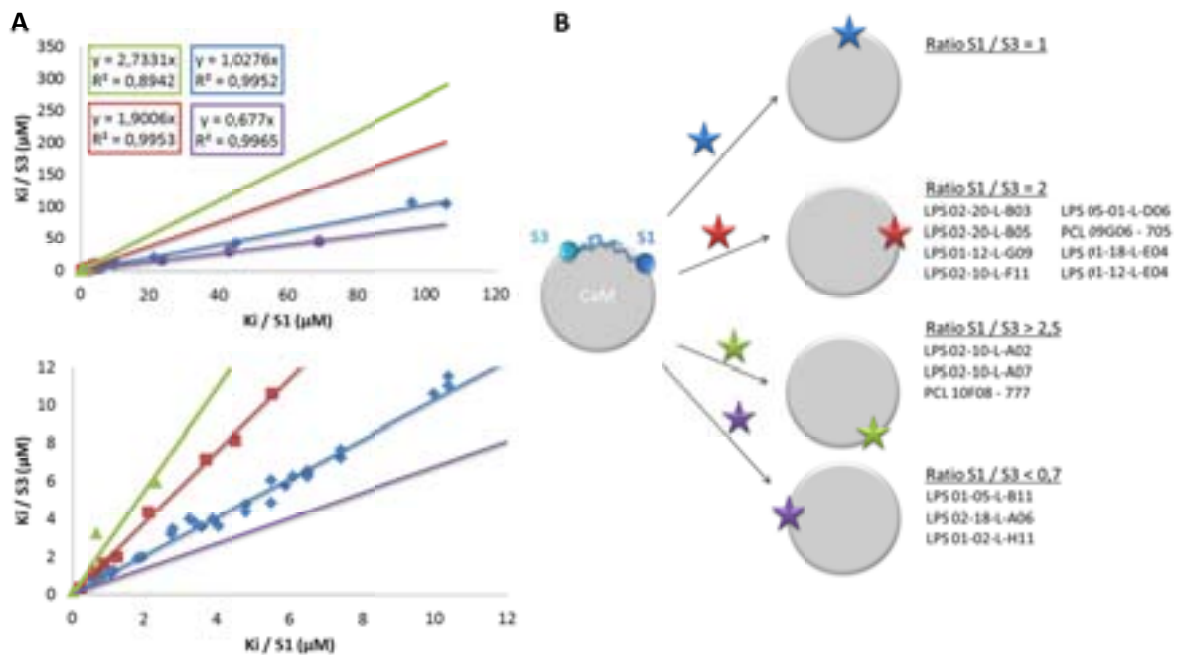


Figure 55 : Sites de liaison des molécules sur la Calmoduline.

À : Relation entre les valeurs de  $K_i$  obtenues pour chaque molécule pour l'inhibition de la liaison de la sonde S1 d'une part et la sonde S3 d'autre part à CaM. 4 ensembles de molécules peuvent être distingués selon le ratio de ces 2 valeurs de  $K_i$  pour chaque molécule. Haut : représentation de l'ensemble des molécules, bas : représentation des molécules ayant des valeurs de  $K_i$  obtenues avec les sondes S1 et S3 inférieures à 12  $\mu\text{M}$ . B : Représentation schématisée de la compétition entre les sondes S1, S3 et des molécules se liant à différents sites de CaM. Les couleurs employées dans le schéma B correspondent aux couleurs des graphes représentés en A.

#### 2.4. Caractérisation du mécanisme de liaison des molécules à CaM<sup>5</sup>

La stœchiométrie et l'affinité de liaison des composés à SynCaM ont été déterminées par titration microcalorimétrique isothermique (ITC) pour certains composés appartenant à différentes familles chimiques.

Considérant la thermodynamique, l'affinité intrinsèque d'un site de liaison pour une molécule peut être déterminée par les équations suivantes :

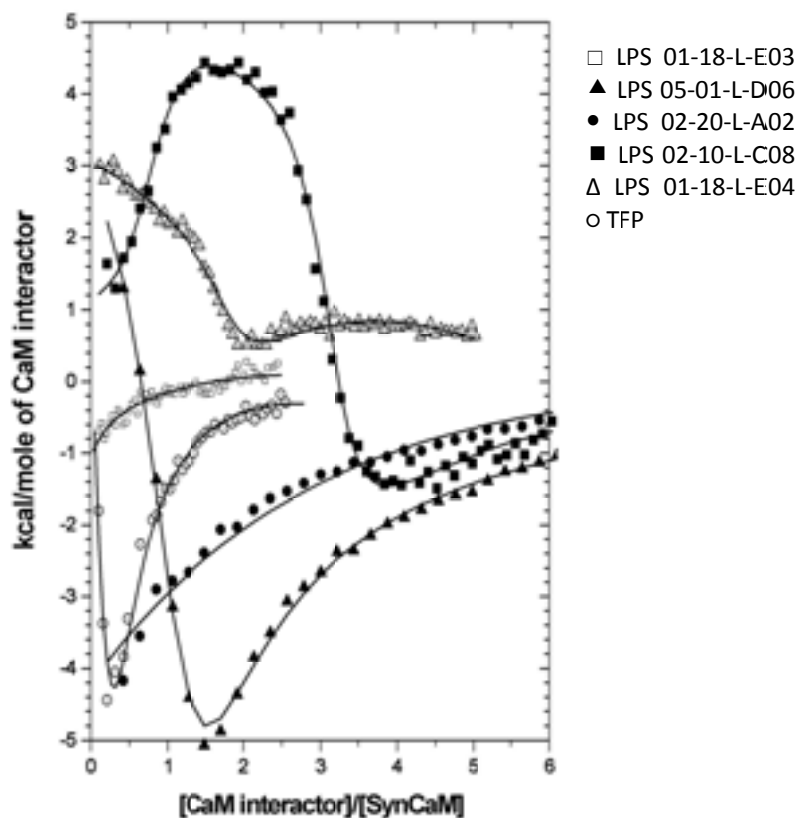
$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad \text{et} \quad \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Avec R la constante des gaz parfaits, T la température en degrés Kelvin,  $\Delta H$  et  $\Delta S$  représentent respectivement les changements d'enthalpie et d'entropie du système. L'affinité intrinsèque de la molécule est déterminée par la différence d'énergie libre de Gibbs  $\Delta G$  entre deux conformations de la protéine (libre et liée à la molécule) : plus  $\Delta G$  est négatif, plus grande est l'affinité. Par conséquent, à température constante, une augmentation  $\Delta S$  et une

<sup>5</sup> Les données de cette partie ont été générées par Dr Rania Dagher, UMR 7200 et Philippe Tsekov

diminution  $\Delta H$  entre les 2 conformations traduisent une augmentation de l'affinité d'une molécule pour CaM. L'entropie (mesure du désordre moléculaire) est augmentée par la libération de molécules d' $H_2O$  figées dans leur liaison à CaM suite à la liaison de la molécule chimique : plus le nombre de molécules d' $H_2O$  relâchées dans le solvant est important, plus le désordre moléculaire augmente. Ce facteur peut être contrebalancé par des changements structuraux de la protéine diminuant l'entropie conformationnelle, tels qu'une perte de flexibilité de la protéine diminuant le désordre moléculaire. L'enthalpie globale de la liaison d'une molécule peut être exothermique ( $\Delta H < 0$ ) si elle met en œuvre un processus enthalpiquement favorable telles que la formation de liaisons électrostatiques ou hydrogène entre le ligand et des résidus du site de liaison de la protéine.

Les courbes ITC de 6 composés ont été analysées par un modèle séquentiel de 2 ou 4 sites de liaison. Les résultats sont présentés dans la Figure 56 et le Tableau 6.



**Figure 56 :** Courbes de titration calorimétrique isothermique de SynCaM avec différentes molécules interagissant avec CaM.

Les changements d'enthalpie  $\Delta H$  sont mesurés en fonction du nombre de molécules chimiques liées par nombre de molécules de SynCaM. Les mesures ITC ont été réalisées dans 50 mM Hepes, 150 mM KCl, 1 mM  $CaCl_2$ , pH 7,2 à 25 °C. La concentration de SynCaM est de 10  $\mu M$  pour LPS 02-10-L-C08, LPS 02-20-L-A02, LPS 05-01-L-D06 et 30  $\mu M$  pour LPS 01-18-L-E03, LPS 01-18-L-E04. Les données ont été analysées avec 2 ou 4 sites de liaison proposés par le logiciel Origin.

## Chapitre 2 : Recherche de marqueurs de l'état physiologique des gCSCs à travers la signalisation calcique

<b>TFP</b>	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	0,02	0,02	0,02	1,75
$\Delta H_i$ (cal/mol)	671	(-) 2,28E5	1,121E6	(-) 9.108E5
$\Delta S_i$ (cal/mol.K)	22	(-) 744	3777	(-) 3023

Modèles à 4 sites de liaison séquentiels

<b>LPS 01-18-L-E04</b>	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	6	1,1	0,07	1,1
$\Delta H_i$ (cal/mol)	3052	1711	(-) 19 600	22 360
$\Delta S_i$ (cal/mol.K)	41	33	(-) 48	102

Modèles à 4 sites de liaison séquentiels

<b>LPS 02-10-L-C08</b>	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	20	1	4,6	0,05
$\Delta H_i$ (cal/mol)	1190	8499	1353	(-) 7917
$\Delta S_i$ (cal/mol.K)	37	56	35	(-) 5

Modèles à 4 sites de liaison séquentiels

<b>LPS 05-01-L-D06</b>	Site 1	Site 2	Site 3	Site 4
$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	1,27	0,04	0,02	0,18
$\Delta H_i$ (cal/mol)	2453	(-) 69 140	160 900	(-) 114 100
$\Delta S_i$ (cal/mol.K)	36	(-) 212	559	(-) 357

Modèles à 4 sites de liaison séquentiels

<b>LPS 01-18-L-E03</b>	Site 1	Site 2
$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	0,030	0,075
$\Delta H_i$ (cal/mol)	(-) 2147	2268
$\Delta S_i$ (cal/mol.K)	13	230

Modèles à 2 sites de liaison séquentiels

<b>LPS 02-20-L-A02</b>	Site 1	Site 2
$K_a$ ( $\mu\text{M}^{-1}$ )	0,03	0,02
$\Delta H_i$ (cal/mol)	(-) 1,76E4	8425
$\Delta S_i$ (cal/mol.K)	(-) 38	48

Modèles à 2 sites de liaison séquentiels

**Tableau 6 : Paramètres thermodynamiques de la liaison à SynCaM des molécules interagissant avec CaM.**

Les données ITC ont été analysées avec un modèle de liaison séquentiel à 4 sites pour les molécules TFP, LPS 01-18-L-E04, 05-01-L-D06 et LPS 02-10-L-C08 et à 2 sites pour les molécules LPS 01-18-L-E03 et LPS 02-20-L-A02. Les constantes d'association ( $k_a$ ) de chaque site de liaison ainsi que les variations d'enthalpie ( $\Delta H$ ) et d'entropie ( $\Delta S$ ) ont été déduites d'après les courbes ITC.

Les composés testés se lient avec une haute affinité à CaM avec des constantes d'association de 1 à 20  $\mu\text{M}^{-1}$ , excepté pour les composés LPS 02-20-L-A02 et LPS 01-18-L-E03. Ces composés se lient également à au moins 1 site de plus faible affinité avec des constantes d'association de 0,05 à 0,3  $\mu\text{M}^{-1}$  de façon enthalpiquement favorable. Les données montrent

que la liaison des composés aux sites de haute affinité est favorisée par l'entropie, excepté pour la liaison du TFP favorisée par l'enthalpie.

Les données expérimentales obtenues avec le composé TFP ont été analysées avec 4 sites de liaison, corroborant ainsi les données de cristallisation de TFP avec CaM mettant en évidence un complexe formé de 4 molécules de TFP pour 1 molécule protéique (Osawa et al., 1998). D'après nos données, l'un de ces sites a une affinité plus importante que les 3 autres.

Ces titrations ont été réalisées une seconde fois, avec un nombre plus important de composés, sur un autre appareil et selon les conditions expérimentales définies au point II-9, Chapitre matériel et méthodes. Les courbes ont été dans ce cas analysées avec 1 ou 2 sites de liaison, les résultats sont présentés en Annexe II.

Ces analyses microcalorimétriques suggèrent que les molécules interagissant avec CaM ne sont pas fonctionnellement équivalentes et confirment la présence de différents sites de liaison des molécules à SynCaM ; les paramètres thermodynamiques de la liaison de ces molécules à SynCaM illustrent la plasticité de CaM par rapport à sa capacité à adopter un large panel de conformations reconnaissant différentes petites molécules, et éventuellement différents CaMBDs. D'après ces résultats, nous nous attendons à ce que l'utilisation de différentes molécules chimiques permette de déstabiliser de façon différentielle la liaison de CaM à ses protéines cibles.

### 3. Intérêt physiologique des touches sélectionnées

#### 3.1. Disponibilité biologique<sup>6</sup>

Afin de valider l'utilisation de ces composés dans un système intégré et comme outils thérapeutiques, nous avons mesuré l'index d'hydrophobicité chromatographique (CHI) de certains de ces composés. Les valeurs de CHI sont obtenues par un gradient rapide de phase réverse HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) entre une phase stationnaire aqueuse et une phase mobile organique. Le temps de rétention d'un composé dans

---

<sup>6</sup> Les données de cette partie ont été générées par Patrick Gizzi, Plateforme TechMed<sup>ILL</sup>.

la colonne reflète le coefficient de partage de ce composé entre les deux phases : les résultats sont exprimés en pourcentage du volume de la phase organique nécessaire à éluer le composé ; ces valeurs sont fortement corrélées aux valeurs de log D. D'un point de vue thérapeutique, une molécule doit être assez hydrophobe pour s'insérer dans la bicouche lipidique ( $CHI > 50$ ) mais doit également pouvoir en ressortir et diffuser dans le cytoplasme ( $CHI < 90$ ).

D'après les données présentées en Annexe II et Figure 57, la quasi-totalité des composés testés peut être présente dans la phase lipophile ; cependant 4 de ces composés sont susceptibles d'être retenus dans cette membrane et par conséquent de diffuser moins facilement dans le cytoplasme.

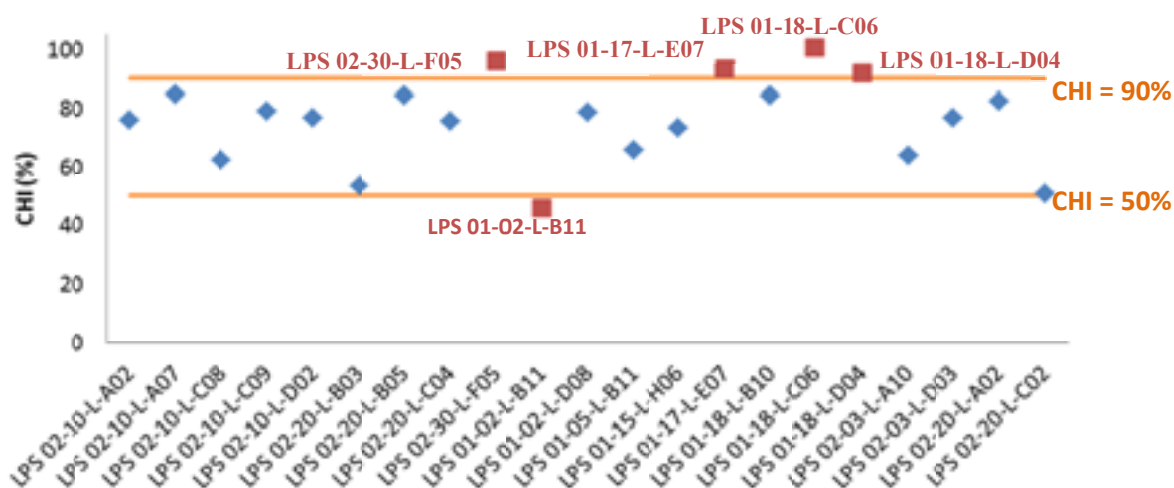


Figure 57 : Disponibilité biologique des molécules – Valeurs CHI

Les valeurs CHI ont été déterminées pour les molécules des familles I (éthylène diamine disubstitués) et II (pyridazines aminoalkyles et triazines). La zone de bonne disponibilité biologique est représentée entre les 2 lignes orange délimitant les molécules pour lesquelles  $50 < CHI < 90$  (molécules bleues) ; les molécules en dehors de cette zone sont représentées en rouge.

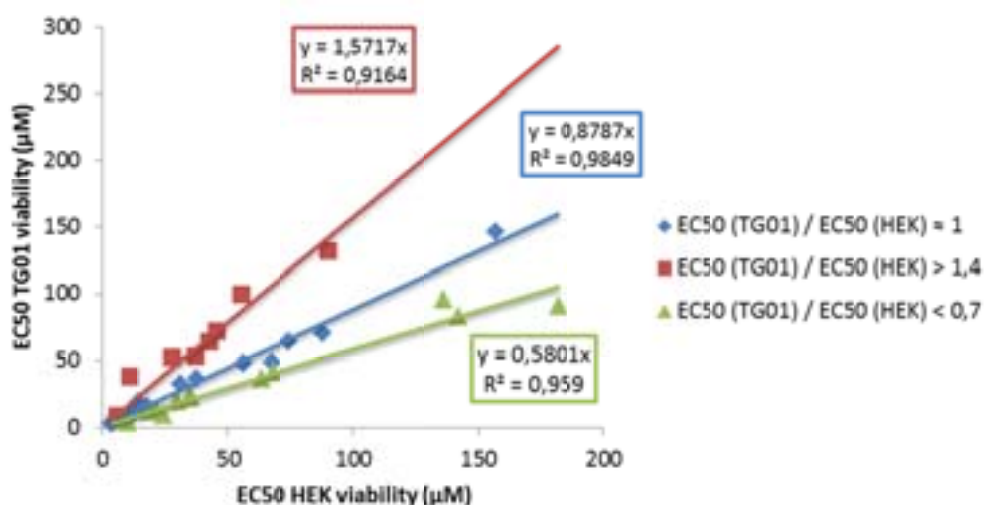
### 3.2. Viabilité cellulaire<sup>7</sup>

Nous avons ensuite voulu tester la capacité de ces molécules à interagir avec des voies de signalisation cellulaires, dont l'induction de la mort cellulaire. Les courbes dose-réponses (mesure de la viabilité des cellules) réalisées ont été analysées avec une équation de Hill, permettant de déterminer une valeur d' $EC_{50}$  et un nombre de Hill (nH) pour chaque molécule sur les 2 types cellulaires ; les résultats sont présentés en Annexe II.

<sup>7</sup> Les données de cette partie ont été générées par Shan Peng, UMR 7200.

Les résultats montrent un effet significatif de l'ensemble de ces molécules sur la viabilité cellulaire, ainsi que la non-linéarité de l'ensemble des  $EC_{50}$  obtenues dans les cellules HEK et TG01 : la moitié des composés (20 / 40) ont un effet similaire sur les 2 types cellulaires alors que les cellules TG01 sont plus résistantes pour 20 % des molécules et les cellules HEK pour 30 % des molécules (Figure 58). Cette non-linéarité n'est ni corrélée aux valeurs de  $K_i$  obtenues avec les sondes S1 et S3 ni aux valeurs de CHI ; on peut donc suggérer que ces composés activent des chemins cinétiques différents (la différence peut porter sur un nombre très restreint de protéines) dans les 2 types cellulaires.

## Chapitre 2 : Recherche de marqueurs de l'état physiologique des gCSCs à travers la signalisation calcique



### Toxicité plus importante sur HEK

LPS 01-18-L-B10  
Chlorpromazine  
Fluphenazine  
PCL 09G07 - 706  
PCL 10G10 - 789  
PCL 10H04 - 793  
LPS 02-10-L-F11  
PCL 10F08 - 777

### Composé non toxique

LPS 01-08-L-C07

### Toxicité équivalente sur TG01 et HEK

LPS 02-10-L-A02  
LPS 02-10-L-A07  
LPS 02-10-L-C08  
LPS 02-10-L-C09  
LPS 02-10-L-D02  
LPS 02-20-L-B05  
LPS 02-20-L-C04  
LPS 02-30-L-F05\*  
LPS 01-18-L-C06\*  
TFP  
LPS 01-12-L-G09  
PCL 09E06 - 685  
PCL 09F04 - 693  
LPS 02-17-L-H11  
LPS 02-18-L-A02  
PCL 09G09 - 708  
LPS 01-18-L-E04  
LPS 01-12-L-E04  
W13  
Calmidazolium

### Toxicité plus importante sur TG01

LPS 01-15-L-H06  
LPS 01-17-L-E07\*  
LPS 01-18-L-D04\*  
LPS 02-03-L-D03  
LPS 02-20-L-A02  
LPS 02-20-L-C02  
LPS 05-01-L-D06  
PCL 09G06 - 705  
LPS 01-18-L-E03  
LPS 01-09-L-F11  
W7  
Compound 48/80

**Figure 58 : Toxicité des composés sur les cellules TG01 et HEK.**

**A :** Comparaison des valeurs  $EC_{50}$  de toxicité obtenues sur les cellules HEK et TG01 et répartition en 3 groupes selon la valeur du ratio des valeurs  $EC_{50}$  obtenues sur les cellules TG01 vs cellules HEK. **B :** Répartition des molécules dans les 3 groupes définis précédemment. Les molécules marquées par \* sont les molécules dont les CHI ne sont pas favorables. Molécules en bleu : famille I (éthylène diamines N,N disubstitués), orange : famille II (pyridazines aminoalkyles et triazines), vert : famille III (analogues du trifluoperazine ou biphényles), violet : famille IV (biscations), bleu clair : famille V (monocations et dérivés nipecotate).



Le criblage de chimiothèques a permis l'identification de 56 molécules liant CaM ; ces molécules sont caractérisées par leurs constantes d'inhibition de la liaison des sondes S1 et S3 à CaM, mettant en évidence plusieurs sites de liaison de ces molécules à CaM. Une étude thermodynamique de la liaison de certaines de ces molécules à CaM a été effectuée ainsi que la détermination de leur coefficient de partage entre des milieux de nature hydrophile et hydrophobe ; ce dernier paramètre nous permet d'écarter 5 molécules de la suite de l'étude. Enfin, l'observation de l'effet toxique des composés permet de mettre en évidence des différences entre deux types cellulaires.

### III. Caractérisation de l'interaction de CaM avec ses cibles

L'interaction de CaM avec des peptides fluorescents (séquences en Annexe III) a été étudiée en fonction du nombre de  $\text{Ca}^{2+}$  liés à la protéine. Comme souligné dans l'introduction de ce chapitre, nous considérons ici que l'interaction de CaM avec ses protéines cibles peut se résumer à l'interaction avec le CaMBD, représenté par un peptide d'une vingtaine d'acides aminés (point I-3.3.2 page 112).

Pour chaque courbe de titration (concentration en peptide fixe, concentrations variables de CaM et  $\text{Ca}^{2+}$ ), la valeur de la constante de dissociation apparente  $K_{app}$  a été déterminée et représentée en fonction de  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Les données ont ensuite été analysées selon le modèle d'Adair Klotz (point II-1 page 120, Figure 52) afin de déterminer les valeurs des 5 constantes d'association A, B, C, D, E de la liaison du peptide aux complexes  $\text{Ca}_n\text{CaM}$  ( $n = 0 - 4$ ) ; pour chaque peptide, les constantes de dissociation correspondantes sont indiquées en Annexe III. Ceci nous a permis de classifier les peptides en 4 groupes, selon les complexes  $\text{Ca}_n \text{CaM}$  ( $n = 1 - 4$ ) reconnus par les différents peptides (Figure 59) et selon le modèle d'interaction de CaM avec ses cibles décrit au point I-3.3.3 (page 113).

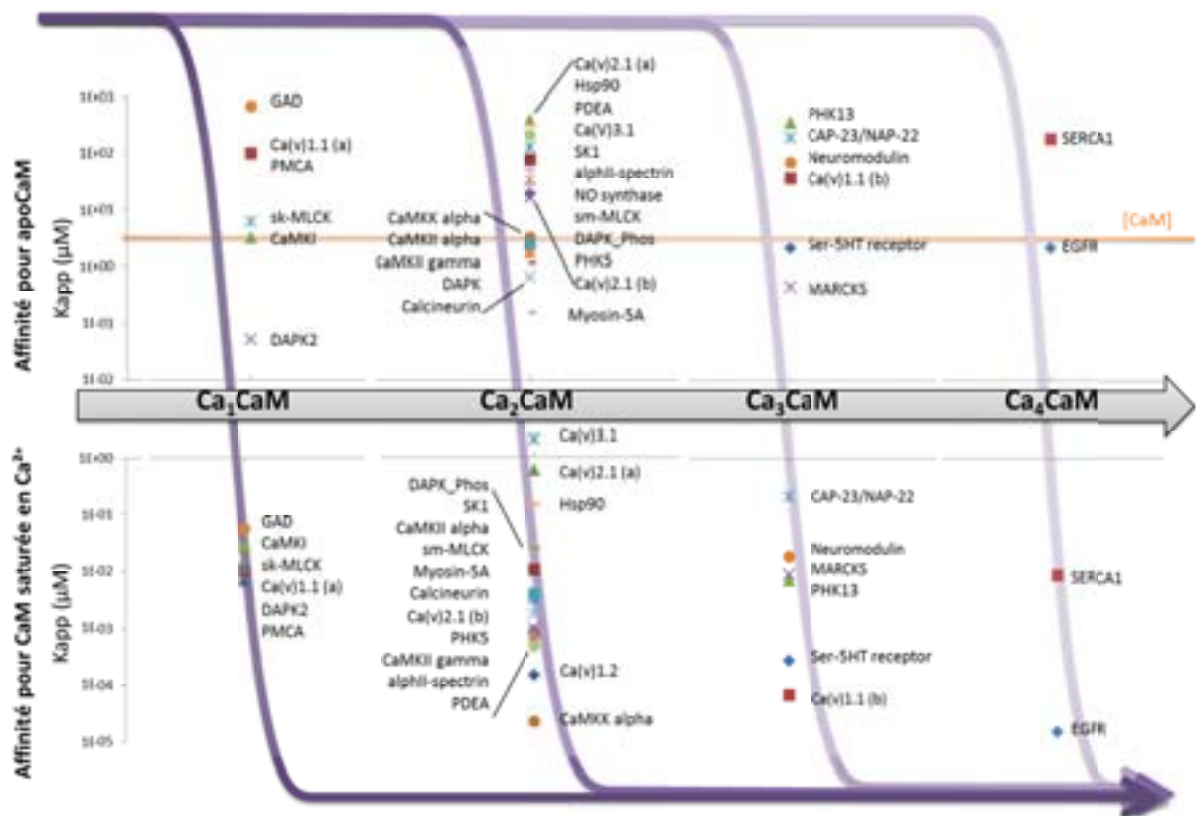


Figure 59 : Interaction des peptides avec CaM selon le nombre d'ions Ca<sup>2+</sup> liés à CaM.

Le nombre d'ions Ca<sup>2+</sup> est déduit de la comparaison des valeurs A, B, C, D, E obtenues pour chaque peptide en liaison avec la CaM humaine selon le modèle d'Adair-Klotz. Chaque peptide est représenté par la protéine à laquelle il appartient. Les affinités représentées dans la partie supérieure représentent les affinités de chaque peptide pour les complexes Ca<sub>m</sub>CaM (m = 0 – (n-1)), les affinités représentées dans la partie inférieure représentent les affinités des complexes Ca<sub>p</sub>CaM (p = n – 4). Les chemins cinétiques représentant l'évolution des valeurs de K<sub>app</sub> en fonction du nombre du Ca<sup>2+</sup> liés à CaM pour chaque ensemble de peptides. La concentration intracellulaire de CaM est indiquée par la ligne horizontale orange : les peptides ayant une valeur de K<sub>app</sub> inférieure peuvent interagir avec apoCaM *in cell*. (a) = domaine PreIQ, (b) = domaine IQ.

Cette approche permet de mettre en évidence la reconnaissance spécifique de chaque complexe Ca<sub>n</sub>CaM (n = 1 – 4) par les cibles de CaM ainsi que les liaisons non favorables. En effet, dans la cellule, la liaison de 4 Ca<sup>2+</sup> à CaM est rarement observée ; les complexes de faible affinité nécessitant la saturation de CaM en Ca<sup>2+</sup> pour se former peuvent être considérés comme non favorables *in cell*, les peptides correspondants ne sont probablement pas des CaMBDs. C'est notamment le cas du peptide SERCA1, domaine n'étant pas considéré comme un CaMBD dans la littérature. Dans le cas l'EGFR, on voit aussi une augmentation de l'affinité du peptide pour CaM avec la liaison de 4 Ca<sup>2+</sup>. Cependant contrairement au peptide précédent, l'affinité du CaMBD pour CaM est significative même en absence de Ca<sup>2+</sup>, suggérant la formation du complexe EGFR - apoCaM *in cell* ; cette affinité augmente de façon importante avec [Ca<sup>2+</sup>] (Dagher et al., 2010).

Cette méthode permet de prédire le nombre minimal d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaires à l'interaction CaM – CaMBD. Les équations utilisées pour la détermination de ce nombre de  $\text{Ca}^{2+}$  sont des équations macroscopiques et ne permettent pas d'accéder au site de fixation des ions  $\text{Ca}^{2+}$ . Cependant, l'association de  $\text{Ca}^{2+}$  à CaM a été décrite à travers plusieurs modèles (Dagher et al., 2010; Haiech et al., 2011), évoqués au point I-3.2 (page 109).

Dans un premier modèle, CaM est décrite comme ayant 2 sites équivalents et non indépendants de liaison de  $\text{Ca}^{2+}$  pour chacun des 2 lobes ; ces sites sont caractérisés par une constante d'association  $k_c$  et un facteur de couplage  $c_c$  au niveau du lobe C, respectivement  $k_n$  et  $c_n$  au niveau du lobe N. Chaque lobe est considéré comme symétrique mais les 2 lobes ne sont pas équivalents. En effet, l'affinité du domaine C terminal de CaM est plus importante que celle du domaine N terminal : les sites du lobe C sont donc occupés avant ceux du lobe N (Linse et al., 1991). Cependant, ce modèle considère que CaM peut être la somme de 2 lobes indépendants, ce qui a été contredit plus tard par la démonstration d'une interaction entre les lobes (Shea et al., 1996; Sorensen and Shea, 1998).

Un deuxième modèle propose la distinction de deux états conformationnels (caractérisés par une constante d'équilibre  $L$ ) et deux paires de sites. Les sites de chaque lobe sont symétriques et caractérisés par les constantes d'association  $k_n$  et  $k_c$  dans le premier état conformationnel et  $c*k_n$  et  $c*k_c$  dans la seconde conformation, respectivement pour les lobes N et C.

Dans un troisième modèle, asymétrique, apoCaM ne possède qu'un site ayant une affinité significative pour  $\text{Ca}^{2+}$  de constante d'association  $k_1$ . La fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur ce site augmente l'affinité du second site pour  $\text{Ca}^{2+}$  (constante d'association  $k_2$ ) et ainsi de suite. Ce modèle décrit une fixation séquentielle et ordonnée du  $\text{Ca}^{2+}$  sur CaM (modèle SOB).

Ces 3 modèles sont caractérisés par 4 paramètres microscopiques liés aux constantes macroscopiques déterminées expérimentalement. Cependant, seul le dernier modèle est en accord avec les données obtenues sur des mutants de CaM où la mutation d'un unique résidu tryptophane dans chaque motif EF-hand permet de suivre l'occupation des sites de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  ; ce modèle a mis en évidence l'ordre de remplissage des sites : site III  $\rightarrow$  site IV  $\rightarrow$  site I  $\rightarrow$  site II (Kilhoffer et al., 1992).

L'étude du nombre minimal de  $\text{Ca}^{2+}$  nécessaire à l'interaction de CaM avec ses cibles combinée à l'ordre de remplissage des différents sites de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  sur CaM, doit permettre de déterminer quels sites de fixation du  $\text{Ca}^{2+}$  et quel lobe de CaM interviennent dans la liaison de CaM à une cible donnée. Cette étude de l'interaction des complexes  $\text{Ca}_n\text{CaM}$  ( $n = 0 - 4$ ) sans muter les motifs EF-hands de CaM permet d'éviter de perturber l'interaction des résidus des motifs EF-hands avec certaines cibles indépendamment de la liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  (Li et al., 2009b). Cette méthode peut être utilisée pour prédire l'interaction de CaM avec ses cibles en fonction de l'augmentation de la concentration cytoplasmique en  $\text{Ca}^{2+}$  observée suite à une stimulation.

## IV. Utilisation des molécules interagissant avec CaM pour inhiber la liaison de CaM avec ses cibles

### 1. IC<sub>50</sub> de déplacement des peptides liés à CaM par chaque molécule

Nous avons précédemment caractérisé

- La liaison de CaM à différents CaMBDs rapportés dans la littérature
- Un ensemble de petites molécules interagissant avec CaM et potentiellement capables d'inhiber la liaison de CaM avec ses cibles, de passer à travers la membrane plasmique et ayant un effet sur la viabilité cellulaire, i.e. modifiant la signalisation cellulaire

Nous nous intéressons maintenant à regarder plus en détail quelles sont les interactions CaM – CaMBD préférentiellement inhibées par chaque petite molécule. Ceci a été réalisé à travers un essai de polarisation de fluorescence dans des conditions de saturation en Ca<sup>2+</sup> et au cours duquel des concentrations croissantes de molécules interagissant avec CaM ont été ajoutées sur chaque complexe CaM – CaMBD préformé. Les résultats (valeurs IC<sub>50</sub>) sont présentés en Annexe IV.

### 2. Classification des molécules et CaMBDs

Les molécules ont été classées selon les CaMBDs dont la liaison avec CaM a été préférentiellement inhibée ; ces résultats dépendent à la fois de l'affinité des CaMBDs pour CaM, de la conformation de CaM en liaison avec un CaMBD, de l'affinité des molécules pour CaM et de leur accessibilité au site de liaison de CaM en présence du CaMBD. Ce classement a été effectué avec le logiciel dChip (Figure 60A), logiciel de Windows conçu pour la clusterisation d'expression de gènes et de SNPs (single nucleotide polymorphisms).

Les CaMBDs semblent être déplacés par les molécules chimiques selon le nombre d'ions Ca<sup>2+</sup> devant être liés à CaM pour permettre la formation du complexe CaM – CaMBD : les CaMBDs liant CaM à partir de 1 Ca<sup>2+</sup> (**groupe P2**) voient leur interaction avec CaM inhibée par des molécules différentes que les CaMBDs nécessitant 3 Ca<sup>2+</sup> liés à CaM (**groupes P1 et P3**) (Figure 60B) ; les CaMBDs nécessitant 2 Ca<sup>2+</sup> sont répartis entre ces 2 groupes. La

liaison à CaM des CaMBDs du groupe P3, représentant les protéines CAP-23/NAP-22, Heat shock protein 90 (Hsp90), Neuromoduline et dans une moindre mesure le canal potassique calcium dépendant (SK1), est fortement inhibée par la majeure partie des antagonistes. D'après la Figure 59, ces peptides sont ceux ayant les constantes d'interaction avec CaM les plus faibles en conditions saturantes en  $\text{Ca}^{2+}$  : ces peptides sont donc plus faiblement liés à CaM et par conséquent potentiellement plus facilement déplaçables par l'ensemble des antagonistes.

De la même façon, les composés peuvent être répartis en 3 groupes selon les CaMBDs préférentiellement inhibés (Figure 60C). On observe ainsi :

- Les composés des familles II (Amino alkyl pyridazine and triazine) et III (Biphenyls) (**groupe A2**) inhibent préférentiellement les CaMBDs liant les complexes  $\text{Ca}_1\text{CaM}$
- Les composés des familles I (Ethylène diamine N,N disubstituted) et V (Monocations et dérivés nipecotates) (**groupe A1**) inhibent préférentiellement les CaMBDs liant les complexes  $\text{Ca}_3\text{CaM}$
- Les composés du **groupe A3** ne permettent pas de faire clairement cette distinction entre les CaMBDs liant  $\text{Ca}_1\text{CaM}$  ou  $\text{Ca}_3\text{CaM}$ . Ces molécules présentent de faibles affinités par rapport à l'inhibition des complexes CaM-CaMBDs et ne semblent pas être spécifiques de l'inhibition de l'une ou l'autre des conformations de CaM

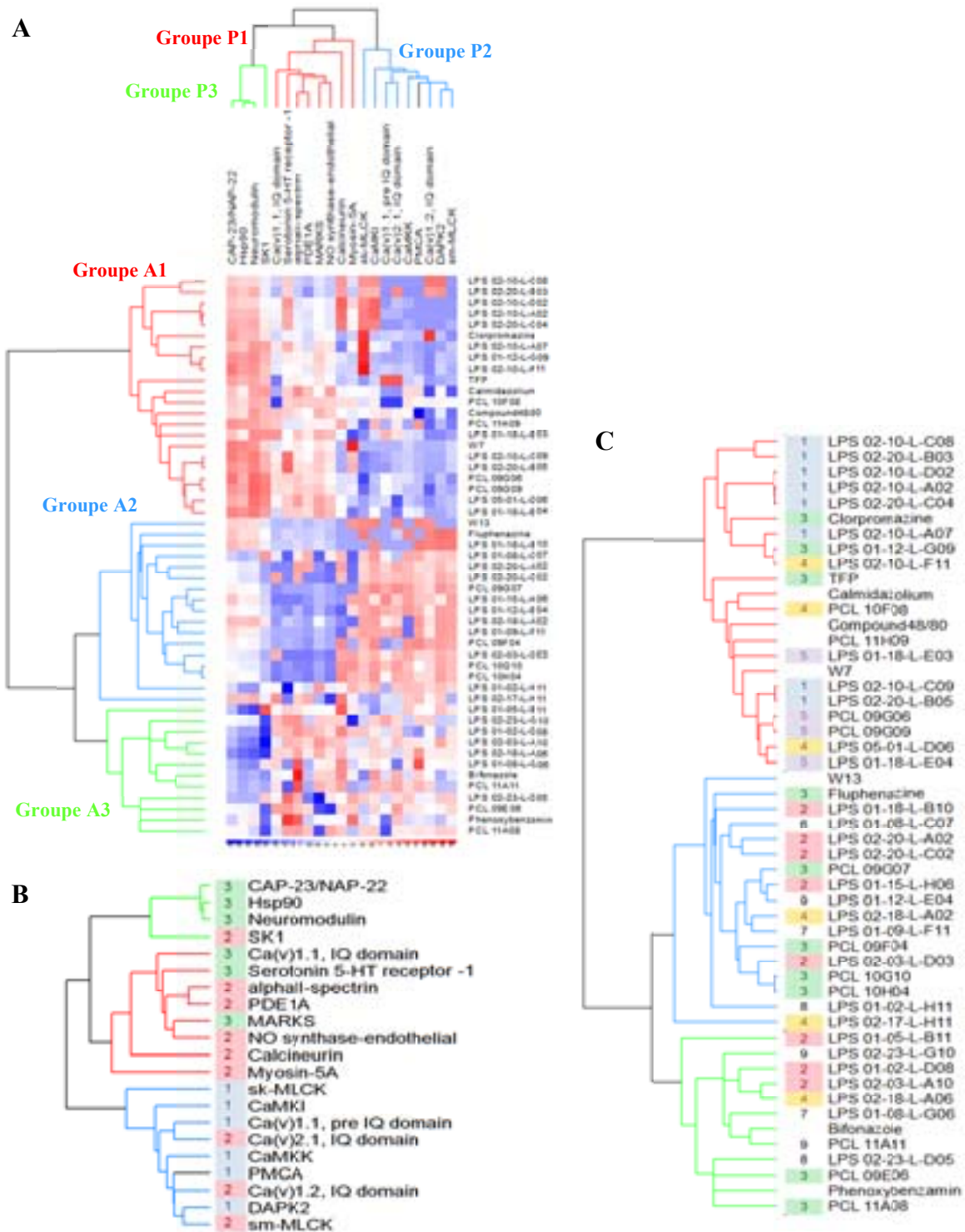


Figure 60 : Classification des CaMBDs et des molécules interagissant avec CaM selon la capacité ( $IC_{50}$ ) de chaque molécule à inhiber chaque complexe CaM – CaMBD.

**A** : La classification des molécules et des CaMBDs a été réalisée avec le logiciel dChip, à partir des valeurs  $IC_{50}$  exprimées en  $M^{-1}$  ; les distances ont été calculées en fonction de la corrélation des valeurs. Les molécules déplaçant les CaMBDs avec une forte  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) sont marquées en bleu, les molécules déplaçant fortement les CaMBDs sont marquées en rouge. La classification des molécules révèle 3 groupes distincts de molécules (A1, A2, A3) et 3 groupes de CaMBDs (P1, P2, P3). **B** : Reproduction de l'arbre de classification des CaMBDs avec le nombre du  $Ca^{2+}$  nécessaires à la liaison CaM – CaMBD. **C** : Reproduction de l'arbre de classification des molécules interagissant avec CaM selon leurs familles chimiques (de 1 à 9).



On note cependant quelques disparités au sein de ces familles chimiques :

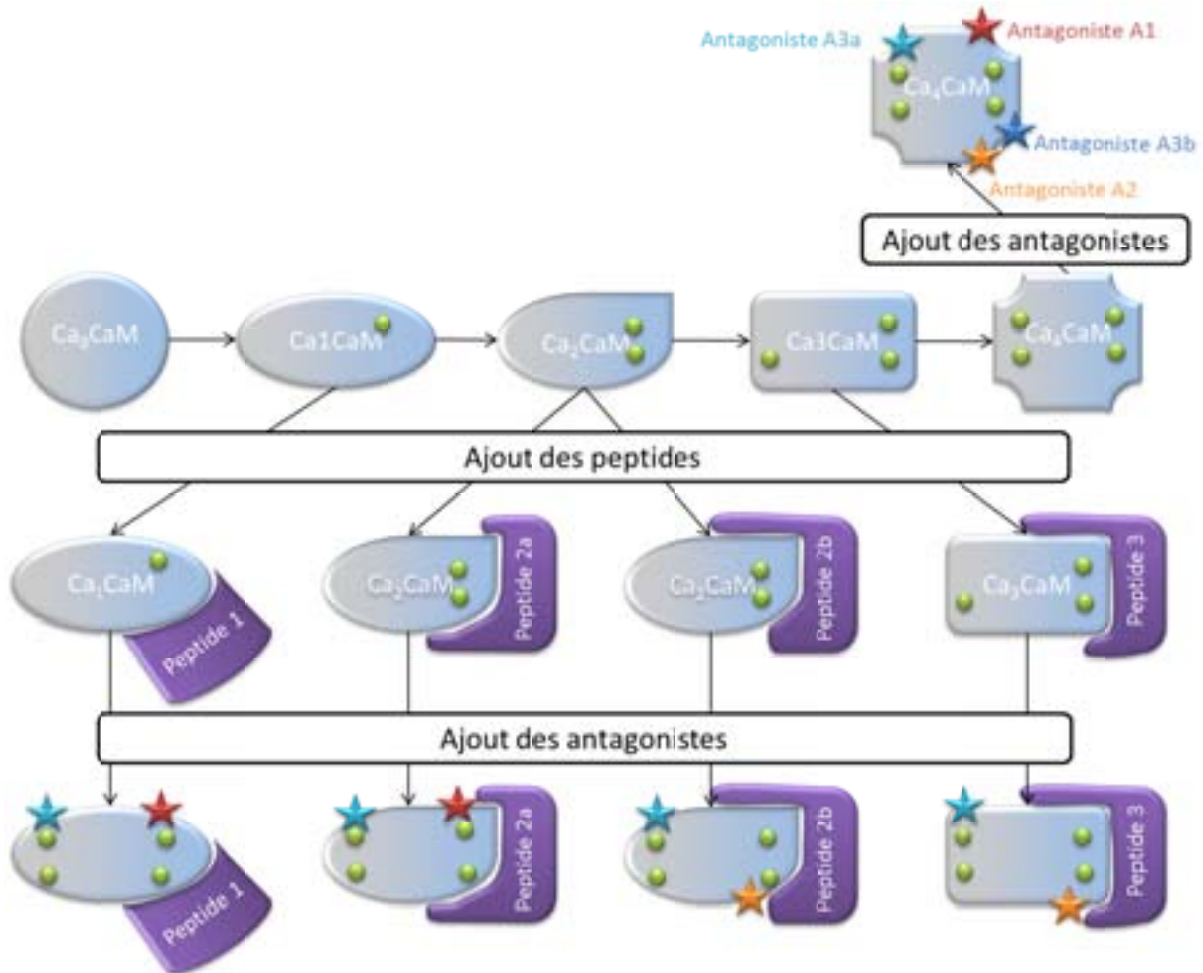
- La molécule LPS 01-12-L-G09 se comporte différemment du reste de la famille III (biphényles) ; ceci s'explique par une structure différente de la plateforme chimique par rapport aux autres molécules de cette famille.
- TFP et Chlorpromazine sont respectivement très similaires à Fluphenazine et PCL 09F04 : la Fluphenazine comprend une chaîne chloroéthylamine supplémentaire par rapport au TFP et la chlorpromazine comprend un atome de chlore en plus par rapport à PCL 09F04. Dans les deux cas, ces changements mineurs de structure ont un impact assez important sur l'affinité de ces molécules pour CaM : la Fluphenazine et PCL 09F04 ont des valeurs de  $K_i$  beaucoup plus élevées que leurs « homologues » respectifs ainsi que des valeurs  $EC_{50}$  de toxicité très différentes (Annexe II) ; ceci suggère des interactions différentes des molécules avec CaM et il n'est donc pas surprenant de voir de grandes différences de CaMBDs inhibés par chacune des molécules de ces deux couples. Cette observation rejoint l'utilisation des couples de molécules W5/W7 et W12/W13 retrouvée dans la littérature : les molécules W5 et W12 ont une affinité pour CaM beaucoup plus faible que leurs dérivés chlorés respectifs, W7 et W13.

Les CaMBDs représentant les domaines IQ des canaux  $Ca_v1.1$  et  $Ca_v1.2$  ne diffèrent que par 4 acides aminés mais leurs déplacements par les molécules utilisées donnent 2 profils très différents : la liaison à CaM de  $Ca_v1.1$  IQ est inhibée par les antagonistes du groupe A1 et celle de  $Ca_v2.1$  IQ par les antagonistes du groupe A2. Ceci témoigne de la spécificité des molécules dans leur capacité à inhiber certaines interactions de CaM. Ainsi, nos molécules interagissant avec CaM sont capables d'inhiber différenciellement 2 peptides de séquences très proches ou 2 protéines appartenant à la même famille.

Cette classification permet de mettre en évidence que certaines molécules interagissant avec CaM chassent de façon différentielle les différents CaMBDs présentés ici. Ces différences proviennent non seulement de l'affinité de CaM pour chaque molécule ( $K_i$ ) et chaque CaMBD ( $EC_{50}$ ) mais aussi des zones d'interaction de CaM avec ces molécules : toutes les molécules ne se lient pas au même endroit, ou du moins ne lient pas les mêmes résidus, de



CaM. Ceci nous permet d'avoir un panel de molécules interagissant avec des conformations spécifiques de CaM, selon que celle-ci soit liée à des CaMBDs ou protéines reconnaissant CaM liée à 1, 2 ou 3  $\text{Ca}^{2+}$ , et sur des domaines différents (Figure 61).



**Figure 61 : Déplacement des CaMBDs liés à CaM selon l'antagoniste utilisé et la conformation de CaM.**

CaM adopte différentes conformations selon le nombre de  $\text{Ca}^{2+}$  liés ; chacune de ces conformations lui permet d'interagir avec différents peptides ou protéines. Le déplacement des peptides liés à CaM par différents antagonistes est favorisé pour les antagonistes pour lesquels le site d'interaction avec CaM est accessible, dépendamment du peptide lié à CaM. On peut ainsi distinguer les antagonistes A1 permettant de chasser les peptides 1 et 2a (référencés comme les peptides P2) et les antagonistes A2 permettant de chasser les peptides 2b et 3 (référencés comme les peptides P1). Les antagonistes A3a ne sont pas sélectifs et les peptides A3b se lient très difficilement à tous les complexes CaM-CaMBD ; ces peptides sont référencés comme les peptides P3. Sur ce schéma, seules les conditions réalisées ont été représentées (notamment vis-à-vis de  $[\text{Ca}^{2+}]$ ).

## V. Perturbation de la signalisation calcique de cellules selon l'état physiologique de la cellule

### 1. Mesure de la concentration calcique intracellulaire

#### 1.1. Calcul de la concentration cytoplasmique en calcium

La mesure de la concentration en calcium cytoplasmique s'effectue avec la sonde Indo1. La transformation de ce ratio en  $[Ca^{2+}]$  s'effectue après calibration du signal obtenu dans chaque type cellulaire. Brièvement, des solutions tamponnées de  $[Ca^{2+}]$  connues sont ajoutées sur les cellules, les cellules sont lysées par la digitonine, le signal obtenu pour chaque solution tampon est comparé à la courbe théorique  $S_{theo} = f([Ca^{2+}])$  :

$$S_{theo} = \frac{S_{min} + S_{max} \times \beta \times K_d \times [Ca^{2+}]}{1 + \beta \times K_d \times [Ca^{2+}]}$$

Où  $S_{min}$  et  $S_{max}$  représentent respectivement les signaux minimal et maximal obtenus avec des solutions de 25 mM EGTA et 10 mM  $CaCl_2$ ,  $\beta$  représente le ratio obtenu à 475 nm (sonde libre de calcium) en conditions libre et saturée de calcium,  $K_d$  représente la constante de dissociation de l'Indo1 pour  $Ca^{2+}$  (250 nM en théorie).

L'ajustement de la courbe théorique sur les points expérimentaux permet d'ajuster la valeur théorique du  $K_d$ .

Une fois la calibration effectuée, la transformation des données expérimentales sous forme de ratio  $S$  en  $[Ca^{2+}]$  s'effectue selon l'équation suivante :

$$[Ca^{2+}] = \frac{S - S_{min}}{S_{max} - S} \times K_d \times \beta$$

#### 1.2. Influence de la sonde calcique sur le signal calcium de la cellule

L'un des points importants pour le suivi d'une cinétique mettant en œuvre une sonde pour mesurer un signal est de s'assurer d'une part que cette sonde ne dénature pas le signal de la cellule et d'autre part que ce signal est bien retransmis à travers cette sonde. Nous avons donc modélisé, de façon très simplifiée, une cellule au niveau de la signalisation calcique cytoplasmique en utilisant les logiciels Cell Designer et Copasi (Figure 62).

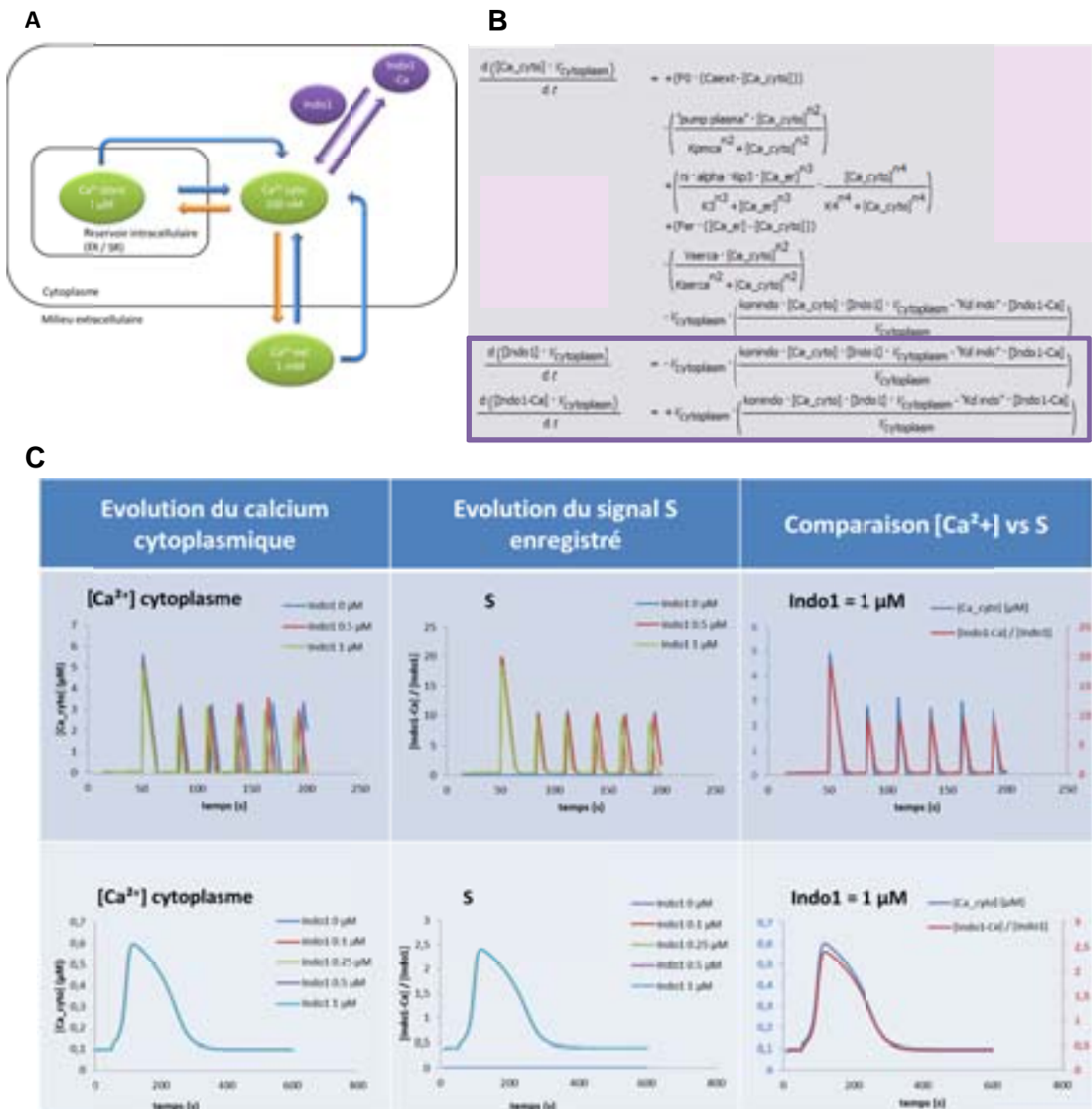


Figure 62 : Influence de la sonde calcique sur le signal calcium et comparaison avec le signal transmis.

À : Schéma des flux de Ca<sup>2+</sup> simplifiés dans la cellule entre le cytoplasme, le réticulum et le milieu extracellulaire. Les flèches bleues représentent une entrée de Ca<sup>2+</sup> dans le cytoplasme via des canaux inductibles, les flèches bleues courbées via des canaux de fuite, les flèches orange représentent une sortie de Ca<sup>2+</sup> du cytoplasme via des pompes. La modélisation des flux de Ca<sup>2+</sup> entre le cytoplasme et la sonde cytoplasmique Indo1 est représentée en violet. B : Equations utilisées pour la modélisation des différents flux ; l'équation de modélisation de l'équilibre entre l'Indo1 libre et l'Indo1 liée à Ca<sup>2+</sup> est encadrée en orange. C : Comparaison de [Ca<sup>2+</sup>] cytoplasmique « réelle » et des ratios [Indo1-Ca<sup>2+</sup>]/[Indo1] pour une concentration intracellulaire en Indo1 de 0 à 1 μM et avec K<sub>d</sub><sub>Indo1/Ca</sub> = 250 nM, K<sub>on</sub><sub>Indo1/Ca</sub> = 1 μM. Cette comparaison a été effectuée pour 2 types de signaux calciques : la 1<sup>ère</sup> ligne du tableau représente un train d'oscillations, la 2<sup>e</sup> ligne représente une unique oscillation, ou augmentation transitoire de Ca<sup>2+</sup>.

Nous avons d'autre part déterminé la concentration d'Indo1 chargée dans nos cellules lors des différentes expériences réalisées en comparant les valeurs de fluorescence brutes obtenues

d'une part sur nos cellules et d'autre part avec la sonde Indo1 sans cellules, de concentration connue. La quantité de sonde ainsi chargée dans nos cellules oscille entre 0,02 et 0,05  $\mu\text{M}$ , ce qui est bien inférieur aux quantités utilisées dans la simulation de l'effet de l'Indo1 sur le signal calcium.

D'après les simulations effectuées avec Virtual Cell, la concentration en Indo1 présente dans le cytoplasme a très peu d'influence sur les signaux « calciques réels » et transmis par l'Indo1. Considérant un signal oscillatoire de  $\text{Ca}^{2+}$ , l'introduction d'Indo1 dans le cytoplasme modifie très légèrement l'amplitude et la fréquence des oscillations : l'amplitude est diminuée et la fréquence est plus importante ; cet effet est proportionnel à la concentration totale d'Indo1. Cependant, cet effet est très faible, même pour une concentration d'Indo1 de 1  $\mu\text{M}$  ; le signal S enregistré est d'autre part très fidèle au signal cytoplasmique. Dans le cas d'une augmentation transitoire de  $[\text{Ca}^{2+}]$  de période assez importante (ici environ 150 sec), la quantité d'Indo1 présente dans le cytoplasme n'a aucun effet.

On peut donc considérer que

- l'Indo1 n'a aucun effet sur des signaux de période assez importante
- l'effet est très faible sur des oscillations de fréquence moyenne
- le signal fluorescent transmis par l'Indo est représentatif du signal calcique intracellulaire

## **2. Caractérisation des effets des molécules sur l'homéostasie calcique de différents types cellulaires**

Après avoir identifié, caractérisé, étudié la capacité à déplacer spécifiquement certaines cibles de CaM, nous nous sommes attachés à caractériser la capacité des petites molécules interagissant avec CaM à modifier l'homéostasie calcique de différents types cellulaires.

L'homéostasie calcique est modifiée dans les cellules tumorales (Figure 63A); nous cherchons ici à identifier des molécules qui nous permettraient de mettre en évidence cette modification dans des cellules propagatrices de glioblastome. Ces molécules seraient de bons candidats dans le cadre d'une recherche de marqueurs de l'état physiologique de ces cellules, en partie défini par la signalisation et l'homéostasie calciques.

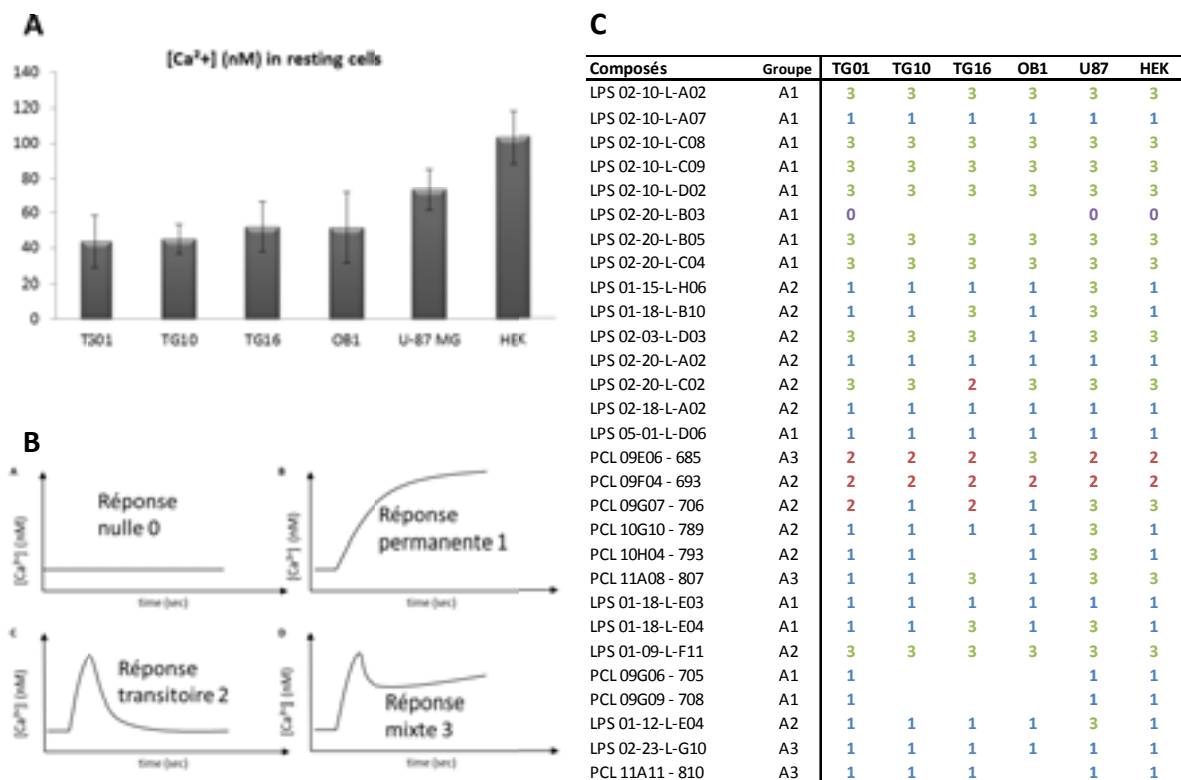
Les molécules chimiques utilisées sont étrangères à la cellule et ne peuvent par conséquent être définies comme des biomarqueurs mais comme révélateurs d'un biomarqueur : l'ajout des molécules sur une cellule induit une réponse cellulaire, marqueur de l'état physiologique de cette cellule. Cependant, par abus de langage et pour des raisons de clarté du discours, nous utiliserons dans ce chapitre le terme biomarqueur pour définir des molécules d'intérêt.

### ***2.1. Modification de l'homéostasie calcique par des molécules interagissant avec CaM selon le type cellulaire***

Les différentes molécules interagissant avec CaM et ayant une valeur de  $K_i$  inférieure à 20  $\mu\text{M}$  ont été testées sur des cellules primaires propagatrices de glioblastomes (TG01, TG10, TG16, OB1), une lignée issue de glioblastome (U-87MG) et une lignée de type épithélial (HEK). Des modifications de l'homéostasie calcique sont observées juste après l'ajout des composés et peuvent être réparties en 4 catégories (Figure 63B) :

- Réponse nulle, type 0 : pas de modification de l'homéostasie calcique
- Réponse permanente, type 1 : on observe une augmentation continue de  $[\text{Ca}^{2+}]$  jusqu'au bout de la cinétique (12 min) qui peut éventuellement se stabiliser à une valeur plateau.
- Réponse transitoire, type 2 : on observe un pic d'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]$  avant un retour à l'équilibre de repos
- Réponse mixte, type 3 : la réponse transitoire est suivie d'une réponse permanente se traduisant soit par une 2<sup>e</sup> vague d'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]$  soit par une stabilisation du signal à une valeur supérieure à celle de l'équilibre de repos

## Chapitre 2 : Recherche de marqueurs de l'état physiologique des gCSCs à travers la signalisation calcique



**Figure 63 : Types de modification de l'homéostasie calcique observés après l'ajout de composés interagissant avec CaM sur les cellules.**

**A :** Mesure du calcium cytoplasmique dans différentes cellules au repos. **B :** Après addition sur les cellules, on distingue les composés n'induisant pas de modification de  $[Ca^{2+}]$ , les composés induisant une augmentation continue de  $Ca^{2+}$  tout au long de la cinétique enregistrée, les composés induisant une augmentation transitoire de  $Ca^{2+}$  suivie un retour à l'équilibre et les composés induisant une réponse de type transitoire immédiatement suivie d'une réponse de type continue. **C :** Types de modification de l'homéostasie calcique observés sur 6 types cellulaires selon le composé interagissant avec CaM ajouté sur les cellules. Les groupes A1, A2, A3 ont été définis au point IV-2 selon les CaMBDs préférentiellement inhibés par chacune des molécules.

Les résultats présentés dans la Figure 63C montrent que la plupart des réponses observées sont de type 1 ou 3; les réponses transitoires simples, avec retour de  $[Ca^{2+}]$  au niveau d'équilibre de la cellule, sont beaucoup plus rares. Ceci pourrait expliquer la toxicité observée pour la quasi-totalité des composés testés en viabilité cellulaire (point II-3.2 page 132) : une concentration élevée permanente en calcium dans le cytoplasme est toxique pour la cellule qui entre alors en apoptose, notamment via le relargage du cytochrome C de la mitochondrie.

Les réponses induites dans les différents types cellulaires dépendent de l'ensemble des calcisomes exprimés dans chacun de ces types cellulaires et de l'action des molécules interagissant avec CaM sur l'activité de certains de ces calcisomes. La comparaison des types de réponses induites dans les 6 types cellulaires permet déjà de mettre en évidence certaines de ces différences.

Parmi l'ensemble des composés testés, environ 60 % (19/30) induisent le même type de modification de l'homéostasie dans les différents types cellulaires testés. La comparaison de ces molécules avec leur classification établie d'après leur capacité à inhiber la liaison de CaM à différents CaMBDs met en évidence que la totalité (13/13) des molécules inhibant les complexes CaMBD-CaM formés à forte  $[Ca^{2+}]$  (peptides P1, antagonistes A1) induisent la même réponse quelque soit le type cellulaire alors que ceci n'est observé que pour le tiers (6/16) des composés inhibant les complexes formés à plus faible  $[Ca^{2+}]$  (peptides P2, antagonistes A2) (Figure 64). On peut donc mettre en évidence 2 catégories d'antagonistes :

- Les antagonistes ne permettant pas de différencier les types cellulaires, i.e. touchant des calcisomes / voies de signalisation calciques communs aux différentes cellules. Ceci met également en évidence l'importance de CaM dans la cellule et la conservation de certains mécanismes ; ces molécules peuvent être utilisées en tant que **marqueurs de calcisomes communs**. Il s'agit principalement des molécules des familles chimiques I (Ethylène diamine N,N disubstitués) et V (Monocations et dérivés nipecotates)
- Les antagonistes permettant de mettre en évidence des spécificités selon les cellules, i.e. touchant des calcisomes / voies de signalisation calciques différentes dans les différents types cellulaires. Il s'agit principalement des familles chimiques II (Amino alkyl pyridazines et triazines) et III (Biphenyls). Ces antagonistes sont également la preuve de la faisabilité de notre étude : l'identification de **marqueurs** des gCSCs basés sur l'utilisation d'antagonistes de CaM est possible.



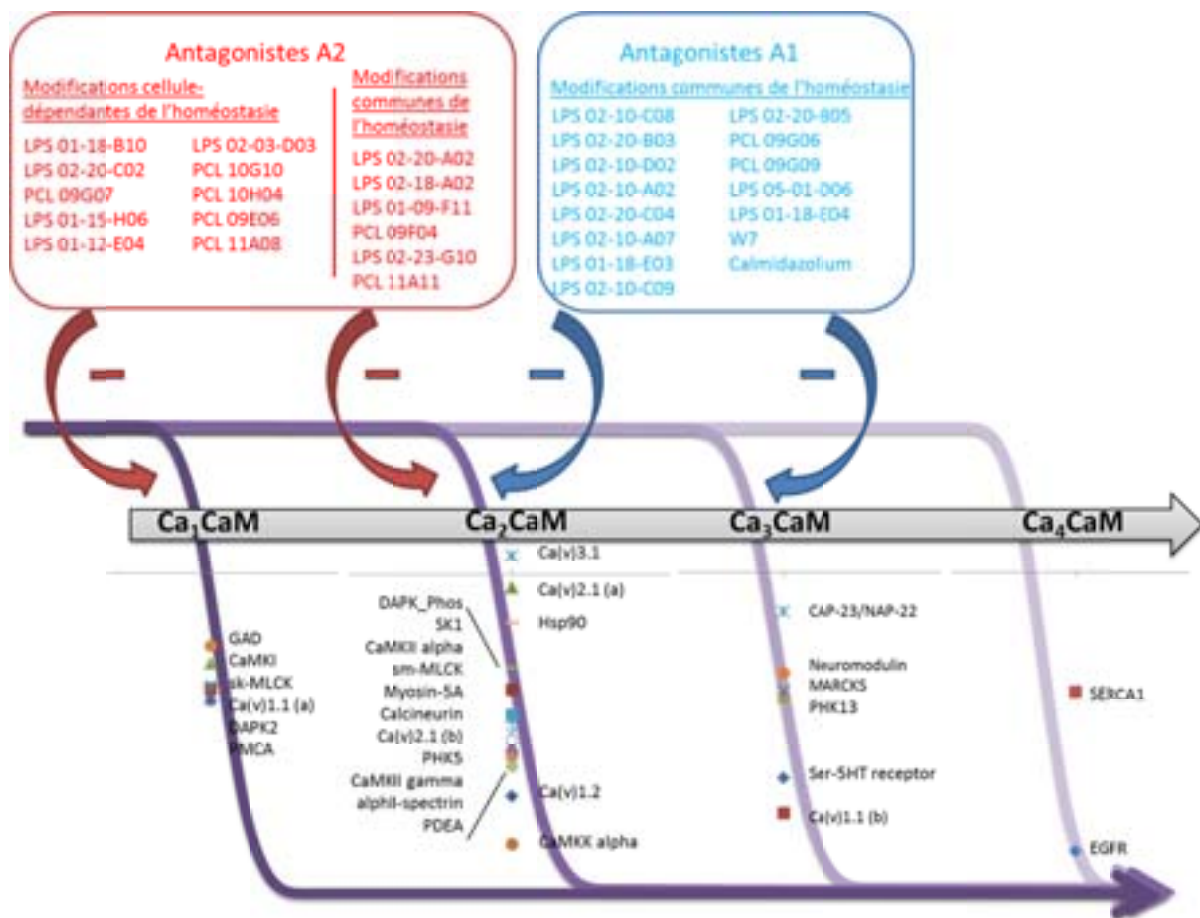


Figure 64 : Comparaison des modifications de l'homéostasie calcique induites par des antagonistes de CaM selon les CaMBDs ciblés.

L'utilisation d'antagonistes des groupes A1 et A2 permet d'inhiber préférentiellement des CaMBDs liant respectivement Ca<sub>2</sub>CaM, Ca<sub>3</sub>CaM et Ca<sub>1</sub>CaM, Ca<sub>2</sub>CaM. Les antagonistes du groupe A1 induisent une même modification de l'homéostasie calcique sur les différents types cellulaires testés (TG01, TG10, TG16, OB1, U-87 MG et HEK) ; certains antagonistes du groupe A2 induisent également une même modification de l'homéostasie calcique dans les différentes cellules alors que d'autres (environ 60 %) induisent une modification de l'homéostasie calcique différente selon le type cellulaire considéré.

La comparaison des modifications de l'homéostasie calcique observées suite à l'ajout des antagonistes A2 permet de mettre en évidence des molécules induisant une réponse spécifique d'une ou plusieurs cellules (Tableau 7):

U-87 MG	LPS 01-15-L-H06 LPS 01-12-L-E04 PCL 10G10 PCL 10H04
OB1	LPS 02-03-L-D03 PCL 09E06
TG16	LPS 02-20-L-C02
TG16 & U-87 MG	LPS 01-18-L-B10
TG01, TG10 & OB1 / TG16, U-87 MG & HEK	PCL 11A08
TG01 & TG16 / TG10 & OB1 / U-87MG & HEK	PCL 09G07

Tableau 7 : Molécules induisant une modification de l'homéostasie spécifique d'un type cellulaire donné



Cependant, mis à part la molécule PCL 09G07 qui induit une réponse cellulaire différente dans les cellules U-87 MG et HEK par rapport aux cellules TG01 et TG16 d'une part et TG10 et OB1 d'autre part, la seule observation des types de modification calciques induites par les antagonistes de CaM ne suffit pas à mettre en évidence l'état physiologique particulier des cellules propagatrices de glioblastome.

## 2.2. Classification en différents groupes d'EC<sub>50</sub>

Une valeur d'EC<sub>50</sub> est déterminée pour chaque molécule et pour chaque type de réponse induite à partir des courbes dose-réponses : une valeur est déterminée pour le signal transitoire (on considère le maximum de [Ca<sup>2+</sup>] obtenue) et une valeur pour le signal permanent (on considère la valeur du plateau ou la valeur maximale de [Ca<sup>2+</sup>] obtenue) ; on obtient ainsi une valeur pour les réponses de type 1 et 2 et deux valeurs pour les réponses de type 3. Les valeurs EC<sub>50</sub> sont déterminées à partir de l'équation suivante :

$$[Ca^{2+}]_{theo} = f([compound]) = \frac{[Ca^{2+}]_0 + [Ca^{2+}]_1 \times \left(\frac{1}{EC_{50}} \times [compound]\right)^n}{1 + \left(\frac{1}{EC_{50}} \times [compound]\right)^n}$$

Où [Ca<sup>2+</sup>]<sub>0</sub> représente la valeur de [Ca<sup>2+</sup>] avant l'ajout des composés, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>1</sub> la valeur maximale de [Ca<sup>2+</sup>] obtenue, n le nombre de Hill. L'ensemble des valeurs EC<sub>50</sub> obtenues pour les réponses transitoires et permanentes est présenté en Annexe V.

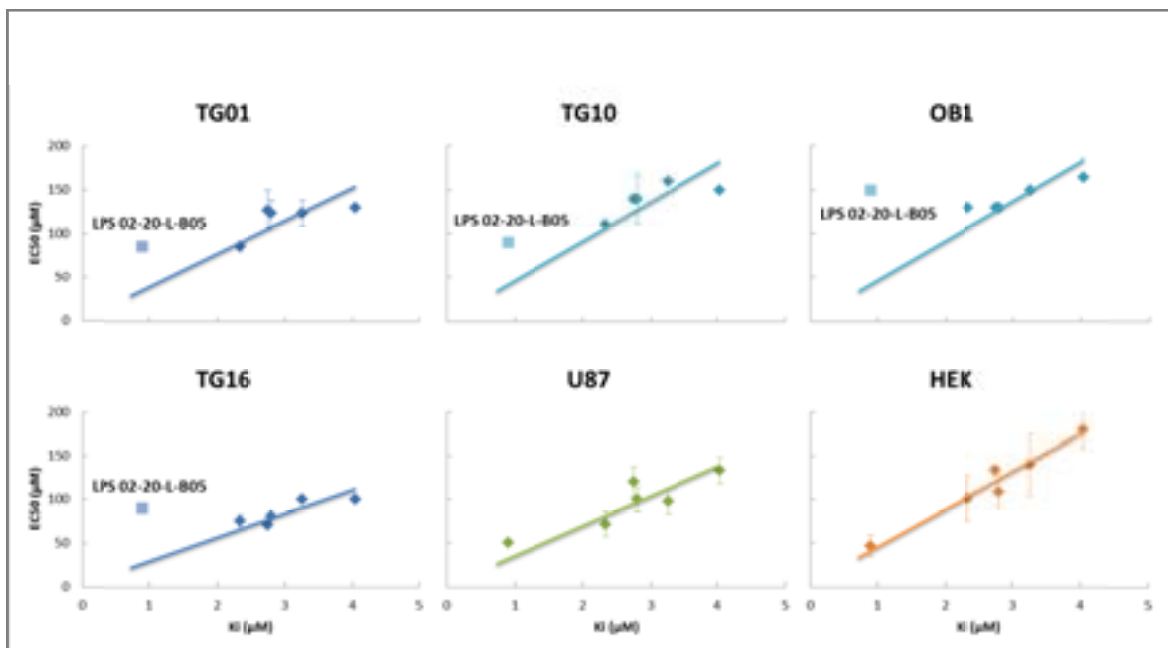
Ces valeurs sont ensuite comparées aux valeurs de Ki obtenues pour chaque molécule sur la CaM purifiée.

### 2.2.1. Spécificité d'interaction des molécules avec CaM dans la cellule ?

Pour chaque famille chimique de molécules, la comparaison EC<sub>50</sub> / Ki permet de caractériser la spécificité d'interaction des molécules avec CaM dans la cellule : dans une même famille chimique et pour des molécules ayant des propriétés physico-chimiques similaires, une corrélation entre l'ensemble des valeurs d'EC<sub>50</sub> et de Ki montre que soit ces molécules interagissent spécifiquement avec CaM dans la cellule soit que les interactions non spécifiques se font exactement avec les mêmes cibles cellulaires. Dans le cas contraire, si une molécule ne présente pas la même relation de proportionnalité entre ses valeurs d'EC<sub>50</sub> et de

Ki, soit cette molécule ne se lie pas à CaM de façon spécifique dans la cellule, soit ce n'est pas le motif caractéristique de la famille chimique qui se lie à CaM mais un autre motif, soit la molécule peut se lier à CaM au niveau de plusieurs sites.

Cette comparaison a pu être faite avec les réponses transitoires induites par les molécules de la famille I et les réponses permanentes induites par les molécules des familles I et II (Figure 65). Sur les 3 séries de graphes présentés, la plupart des molécules montrent un même rapport  $EC_{50} / K_i$  ; cette même proportionnalité serait difficile à obtenir si ces molécules liaient une autre cible cellulaire. On peut donc considérer que la valeur constante du rapport  $EC_{50} / K_i$  est due d'une part à la spécificité d'interaction des molécules avec CaM dans la cellule et d'autre part à l'interaction de ces molécules avec les mêmes résidus de CaM, permettant ainsi d'inhiber la liaison de CaM aux mêmes protéines.



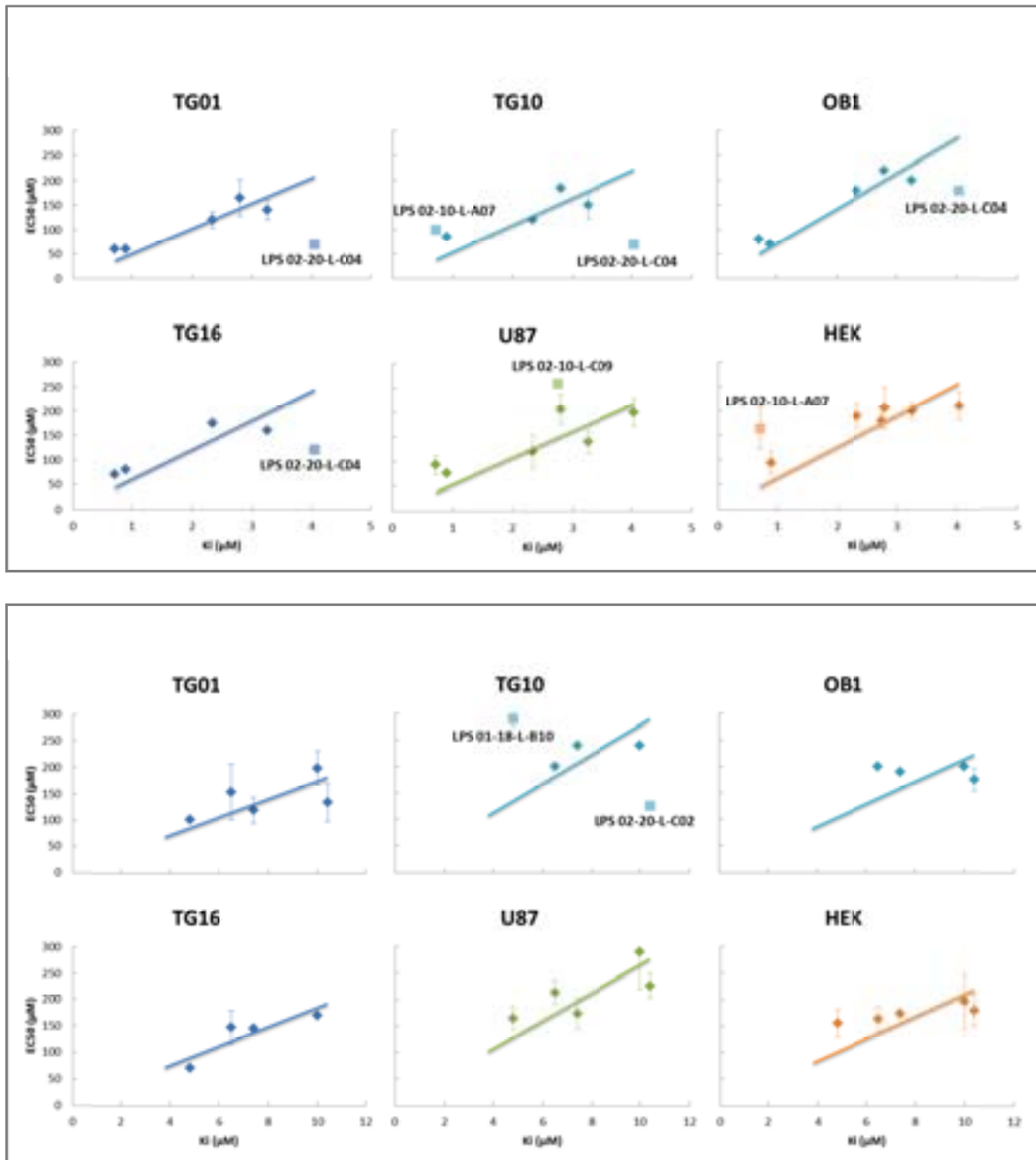


Figure 65: Comparaison des valeurs d' $EC_{50}$  et de  $K_i$  obtenues dans chaque type cellulaire par différents composés selon leur famille chimique et le type de réponse induite.

Les valeurs de  $K_i$  indiquées pour chaque molécule sont les valeurs obtenues pour la liaison des molécules à CaM en compétition avec la sonde S1.

Comme indiqué au point précédent, les molécules de la famille I induisent toutes les mêmes types de modification de l'homéostasie calcique dans les différentes cellules. Cependant, la comparaison des valeurs d' $EC_{50}$  obtenues pour les réponses transitoires et permanentes laisse apparaître quelques différences. La famille II est beaucoup moins homogène que la famille I

dans les réponses induites à la fois par l'ensemble des molécules mais aussi sur les différentes cellules ; cependant la corrélation des valeurs d'EC<sub>50</sub> des réponses permanentes et des valeurs de Ki montre globalement la spécificité de l'interaction de ces molécules avec CaM dans la cellule.

Les molécules **LPS 02-20-L-B05** et **LPS 02-20-L-C04** ont un comportement différent dans les cellules TG01, TG10, TG16 et OB1 : la réponse transitoire est différemment modulée dans les cellules propagatrices de glioblastome et reflète un panel différent de protéine(s) dont la liaison avec CaM a été inhibée. Une autre explication pourrait être la présence d'une protéine, interagissant avec ces molécules et agissant sur l'entrée et la sortie de calcium, présente uniquement dans ces cellules. Ces 2 molécules sont donc de bons candidats en tant que marqueurs de l'état physiologique des gCSCs. De la même façon les molécules LPS 02-10-L-A07, LPS 02-10-L-C09, LPS 01-18-L-B10 et LPS 02-20-L-C02 ont un comportement différent respectivement dans les cellules TG10 et HEK, U-87 MG, TG10 et TG10, et sous-entendent donc des différences de calciprotéines ou calcicomes entre les différentes cellules.

La comparaison des activités cellulaires d'un ensemble d'antagonistes de CaM de même famille chimique avec leurs activités respectives sur la protéine isolée permet donc de mettre en évidence que :

- La majorité des antagonistes sélectionnés interagit avec les mêmes cibles cellulaires
- Des composés n'interagissent pas de façon spécifique avec CaM ou n'inhibent pas la liaison de CaM avec les mêmes calciprotéines que les autres antagonistes mais ont un même comportement dans différents types cellulaires
- Des composés ne se comportent pas de la même façon que les autres composés de la même famille chimique dans certains types cellulaires seulement. Ces composés permettent de mettre en évidence une expression différentielle de composants de la signalisation calcique et peuvent être utilisés en tant que marqueurs d'un ou plusieurs types cellulaires

### 2.2.2. Différences de comportement des molécules selon les types cellulaires

La comparaison des effets induits par des molécules d'une même famille chimique n'est possible qu'avec les familles comptant un nombre minimal de composants. Afin de pouvoir exploiter les résultats de l'ensemble des molécules, nous avons comparé les valeurs  $EC_{50}$  obtenues pour chaque type cellulaire d'une part pour les réponses transitoires et d'autre part pour les réponses continues, aux valeurs  $K_i$ .

Dans chaque cas, 3 principaux groupes de molécules ont pu être identifiés (Annexe VI):

- Groupe 1 : basé sur le rapport  $EC_{50} / K_i$  obtenu pour la majorité des molécules de la famille I
- Groupe 2 : basé sur le rapport  $EC_{50} / K_i$  obtenu pour la majorité des molécules de la famille II. Ce groupe a des valeurs relatives d' $EC_{50}$  plus faibles que le groupe 1
- Groupe 3 : molécules dont les valeurs  $EC_{50}$  sont plus élevées que celles du groupe 1

La comparaison de la répartition des molécules montre que, pour la plupart d'entre elles, il n'y a pas de changement de groupe entre les réponses transitoire et permanente (Tableau 8) : les molécules se comportant de façon similaire aux molécules de la famille I, de la famille II ou autrement pour la réponse transitoire, se comportent respectivement comme les molécules de la famille I, de la famille II ou autrement pour la réponse permanente. On observe toutefois une différence globale pour les molécules PCL 09G07 et PCL 11A08.

## Chapitre 2 : Recherche de marqueurs de l'état physiologique des gCSCs à travers la signalisation calcique

Composés	Réponses Transitoires						Réponses Permanentes					
	TG01	TG10	TG16	OB1	U87	HEK	TG01	TG10	TG16	OB1	U87	HEK
LPS 02-10-L-A02	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LPS 02-10-L-A07							1	3	1	1	1	3
LPS 02-10-L-C08	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LPS 02-10-L-C09	1	1	1	1	1	1					1	1
LPS 02-10-L-D02	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1
LPS 02-20-L-B03												
LPS 02-20-L-B05	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1
LPS 02-20-L-C04	1	1	1	1	1	1	2	2		1	1	1
LPS 01-15-L-H06					2		2	2	2	2	2	2
LPS 01-18-L-B10			1		2		2	1	2		2	2
LPS 02-03-L-D03	2	1	1		2	2	2	2	2	2	2	2
LPS 02-20-L-A02							2	2	2	2	2	2
LPS 02-20-L-C02	2	2	2	2	2	2	2	2		2	2	2
LPS 02-10-L-F11					2							2
LPS 02-17-L-H11												
LPS 02-18-L-A02							1			1	1	1
LPS 05-01-L-D06							3	3	3	3	3	3
PCL 10F08 - 777												
PCL 09E06 - 685	1	1	1	1	1	3				3		
PCL 09F04 - 693	2	2	2	2	2	2						
PCL 09G07 - 706	2		2		2	2		1		1	1	2
PCL 10G10 - 789					2		1	1	1	1	1	1
PCL 10H04 - 793					1		1	1		1	1	1
PCL 11A08 - 807			3		3	3	1	1	1	1	1	1
LPS 01-12-L-G09												
LPS 01-18-L-E03							3	3	3	3	3	3
LPS 01-18-L-E04			1				2	2	2	2	2	2
LPS 02-23-L-D05												
LPS 01-09-L-F11	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2	2
PCL 09G06 - 705							1					
PCL 09G09 - 708												1
LPS 01-12-L-E04					1		2	1	1	2	1	1
LPS 02-23-L-G10							2	2	2	2	2	2
PCL 11A11 - 810							2	2	2		2	2
PCL 11H09 - 878												

**Tableau 8: Répartition des molécules selon les groupes d'EC<sub>50</sub> pour les réponses transitoire et permanente dans les différents types cellulaires.**

Les numéros correspondent aux groupes précédemment définis d'après l'Annexe VI. Les couleurs des composés soulignent les différentes familles chimiques.

On relève également des molécules qui changent de groupe entre les réponses transitoire et permanente pour un nombre plus restreint de types cellulaires (Tableau 9). Le changement de groupe d'EC<sub>50</sub> d'une molécule entre 2 types cellulaires reflète un changement de la cinétique d'action de la molécule. Ce changement est potentiellement causé par une altération des niveaux d'expression des protéines dont la liaison à CaM est inhibée ou par la présence de protéines indépendantes de la régulation de l'homéostasie calcique et liant cette molécule ou par des protéines différentes interagissant avec CaM. Si ce changement de cinétique d'action est observé uniquement pour l'un des deux types de réponses, on peut écarter l'idée d'une protéine « parasite » interagissant avec la molécule.

## Chapitre 2 : Recherche de marqueurs de l'état physiologique des gCSCs à travers la signalisation calcique

LPS 02-20-L-B05	TG01, TG10, TG16, OB1
LPS 01-09-L-F11	TG10, TG16, U-87 MG, HEK
LPS 02-10-L-A07	TG01, HEK
LPS 02-20-L-C04	TG01, TG10
LPS 01-18-L-B10	TG10, TG16
LPS 02-03-L-D03	TG01, TG16
LPS 01-12-L-E04	TG01, OB1
PCL 10G10	U-87 MG
PCL 09E06	HEK

**Tableau 9 : Molécules ayant un comportement différent dans un nombre restreint de types cellulaires**

Ces molécules appartiennent à un groupe d'EC<sub>50</sub> pour la réponse transitoire et à un autre groupe pour la réponse permanente pour quelques types cellulaires.

Toutes ces molécules pourraient être utilisées comme marqueurs de l'état physiologique de cellules spécifiques. Parmi elles, la molécule **LPS 02-20-L-B05** semble, sur le panel de cellules testées ici, spécifique des cellules propagatrices de glioblastome, TG01, TG10, TG16 et OB1.

La plupart des molécules appartenant au groupe 1 d'EC<sub>50</sub> fait partie des molécules inhibant la liaison de CaM aux peptides P2 définis au point IV-2 ; de la même façon, les molécules inhibant la liaison de CaM aux peptides P1 font majoritairement partie du groupe 2 d'EC<sub>50</sub>. Ceci témoigne de la spécificité d'interaction des molécules avec CaM dans la cellule : la répartition des molécules chimiques dans les 2 premiers groupes d'EC<sub>50</sub> correspond globalement à l'inhibition de la régulation CaM dépendante de structures reconnaissant une conformation particulière de CaM. Les molécules du groupe 3 semblent être moins actives que les autres molécules. On peut émettre plusieurs hypothèses : soit une protéine dont la liaison avec CaM est inhibée par ces molécules est présente en quantité plus importante dans la cellule, soit la conformation globale des protéines permet de maintenir la liaison du CaMBD avec CaM malgré la présence de l'inhibiteur, soit la molécule interagit avec d'autres protéines intracellulaires.

## VI. Conclusion

Le pronostic des patients atteints de glioblastome est très sombre du fait de la présence de cellules propagatrices de la tumeur peu sensibles aux thérapies actuelles. Il est donc primordial d'étudier ces cellules attentivement afin de mettre au point de nouvelles thérapies capables de les éliminer. La stratégie abordée dans ce chapitre consiste à identifier des marqueurs de la signalisation calcique de ces cellules permettant de modifier de façon différentielle l'homéostasie calcique des gCSCs. Comme nous l'avons abordé en introduction de ce chapitre, nous n'appliquons pas le terme marqueur à un élément intracellulaire mais à la molécule chimique permettant de mettre en évidence cet élément.

En effet, la signalisation calcique est modifiée dans les cellules cancéreuses et en particulier dans nos cellules (Figure 63). Sachant que la Calmoduline est l'une des protéines les plus importantes de la signalisation calcique, nous avons dans un premier temps cherché à identifier et caractériser des molécules chimiques interagissant avec CaM afin d'avoir à notre disposition une panoplie de molécules nous permettant d'explorer différentes régions de CaM dans sa liaison avec ses cibles. Dans cette approche, il nous a semblé important d'identifier des sets de molécules regroupées en familles chimiques afin de pouvoir faire une pharmacologie fine de CaM. Cette stratégie a été appliquée dès le début des années 80 avec l'utilisation de couples de molécules, W5 / W7 et W12 / W13, utilisés pour différencier les effets de ces composés dépendants de CaM des effets indépendants (Hidaka et al., 1981).

Nous avons mis en évidence que ces molécules peuvent inhiber de façon différentielle la liaison de CaM à ses cibles. Cette inhibition est par ailleurs très sensible aux différents types d'interactions que CaM peut avoir avec ses cibles. Ceci nous a également permis de démontrer que CaM interagit dans la cellule de façon  $[Ca^{2+}]$  dépendante ; par conséquent une modification de la signalisation calcique résultant en un mauvais encodage d'un stimulus engendrerait différentes conformations de CaM et l'activation d'un panel tout à fait différent de ses cibles.

Enfin, nous avons montré que ces molécules induisent *in cell* différentes modifications de l'homéostasie calcique. Ces modifications dépendent pour la plus grande partie de l'inhibition différentielle de la liaison de CaM à certaines de ces cibles. De plus, les signaux calciques générés (ou les valeurs  $EC_{50}$ ) par certaines de ces molécules sont différents : ces molécules



mettent en évidence des interactions CaM – calcisomes différentes dans les différents types cellulaires. Ce sont donc de bons candidats comme marqueurs (ou révélateurs de marqueurs) d'un état physiologique donné. Nous avons notamment pu identifier les molécules suivantes :

- PCL 09G07 induit une réponse transitoire ou permanente dans les cellules propagatrices de glioblastomes et une réponse mixte dans les cellules HEK et U-87 MG ; les 3 groupes de cellules ainsi mis en évidence correspondraient à 3 sous-ensembles de calcisomes.
- LPS 02-20-L-B05 a une valeur d'EC<sub>50</sub> de réponse transitoire plus élevée dans les cellules propagatrices de glioblastome par rapport aux autres molécules de la même famille chimique et par rapport aux cellules HEK et U-87 MG ; cette molécule met en évidence une modification des calcisomes. De plus, l'absence de différence intercellulaire notable induite par les autres composés de la famille des éthylène diamine N,N disubstitués met en évidence la nécessité de réguler très finement l'interaction de CaM avec ses cibles pour identifier des molécules ayant une action spécifique dans les gCSCs et pour éventuellement pouvoir utiliser ces molécules comme sensibilisateurs des gCSCs aux traitements anticancéreux.

Comme nous l'avons vu en première partie de ce chapitre, le système calcique est omniprésent dans la cellule et les interactions des différents composants entre eux sont complexes. À ceci s'ajoute la variabilité spatio-temporelle de l'expression des éléments du calcium toolkit et leur assemblage en diverses combinaisons de calcisomes. La prise en compte de l'ensemble de ces paramètres n'est donc possible que dans un modèle cellulaire, modèle dans lequel de nombreuses inconnues participent à la réponse générée suite à l'application d'un stimulus. Notre travail en plusieurs étapes, à partir d'études visant à caractériser i) l'interaction de CaM avec ses inhibiteurs selon leur famille chimique, ii) l'interaction de CaM avec quelques unes de ses cibles, iii) l'effet des inhibiteurs de CaM sur des complexes CaM – cible et enfin iv) l'effet des inhibiteurs sur un système cellulaire total, nous a permis de nous assurer de la spécificité d'interaction des familles de molécules chimiques identifiées comme inhibiteurs de CaM (à l'exception de quelques molécules), d'obtenir une panoplie de molécules bloquant différentes conformations de CaM et inhibant de façon différentielle la modulation de l'activité de certaines cibles de CaM dans le but de

caractériser l'écosystème calcique d'une cellule donnée. Malgré ces efforts, nous n'avons pu échapper à quelques approximations dans notre travail.

En effet, lorsque nous rapportons la caractérisation de l'interaction de CaM avec les molécules identifiées lors du criblage ou avec des CaMBDs, nous n'avons pris en compte ni les interactions ioniques que CaM peut faire dans la cellule, et notamment avec  $Mg^{2+}$ , ni la place que peuvent prendre les molécules d' $H_2O$  autour des différentes conformations de CaM.

D'autre part, la littérature nous montre que la liaison de CaM à ses cibles peut être résumée à la liaison de CaM à un peptide d'une vingtaine d'acides aminés, le CaMBD (point I-3.3.2, page 112) ; nous nous sommes donc basés sur ces CaMBDs pour caractériser la liaison de CaM avec ses cibles. Cependant, ceci ne prend pas en compte les possibles interactions entre CaM et d'autres parties des protéines cibles, notamment au niveau de l'accessibilité de CaM au CaMBD.

Ensuite, l'étude de l'inhibition de la liaison des CaMBDs à CaM par des antagonistes a été effectuée en solution aqueuse, ne reflétant pas les conditions cellulaires et notamment les conditions retrouvées à proximité de la membrane plasmique. D'autre part, tous nos composés n'ont pas la même hydrophobicité et ne diffusent donc pas de la même façon dans la cellule : certains domaines subcellulaires ne sont atteints que par certaines de ces molécules.

Enfin, l'assemblage des calciprotéines en calcisomes dans la cellule n'a pas été pris en compte : la modification de l'activité d'une de ces protéines engendre la modification de l'activité de l'ensemble du calcisome ; on observe alors un effet « additif » de l'action des antagonistes de CaM.

Malgré ces inconvénients, nous avons pu montrer la possible utilisation de ces molécules en tant que marqueurs de l'ensemble du système calcique d'une cellule, i.e. de l'état physiologique d'une cellule donnée, et en particulier de cellules propagatrices de glioblastomes pour lesquelles la molécule LPS 02-20-L-B05 est un bon candidat.

L'utilisation d'inhibiteurs de CaM comme traitements anticancéreux est rapportée dans la littérature (Mayur et al., 2006b; Shim et al., 2007b; Shin et al., 2006). Ces molécules interagissant avec CaM sont en général peu caractérisées, seule la liaison à CaM est démontrée ainsi que les propriétés anti-prolifératives, anti-angiogéniques ou anti-MDR (multi drug resistance). Cependant, comme nous l'avons vu dans ce chapitre et découlant du rôle central de CaM dans la signalisation calcique, une même molécule interagissant avec CaM inhibe rarement une seule cible de CaM et les effets rapportés sont souvent communs à plusieurs types cellulaires. Il est donc primordial, dans un but thérapeutique, d'identifier des molécules marqueurs de l'état physiologique des cellules ciblées dans chaque étude.

L'EGFR (epidermal growth factor receptor) joue un rôle important dans la cancérisation à travers sa surexpression ou ses mutations dans les cellules tumorales (Sibilia et al., 2007). L'activité de l'EGFR passe par une régulation à la fois par des kinases dépendantes de CaM et par CaM (Dagher et al., 2010; Sanchez-Gonzalez et al., 2010) et l'utilisation d'inhibiteurs de CaM permet de diminuer l'affinité du récepteur pour son ligand (Bodine and Tupper, 1984) ; l'utilisation d'antagonistes spécifiques de CaM et ciblant la liaison de CaM à l'EGFR peut donc être une approche dans le cadre d'une chimiothérapie.

D'autre part, l'utilisation d'antagonistes de CaM en synergie avec des anti-cancéreux permet de potentialiser la réponse cellulaire dans le cadre d'une chimiothérapie. Il a ainsi été montré il y a presque 10 ans, que l'utilisation des antagonistes TFP ou W7 permet d'augmenter l'activité inhibitrice de CaM du Tamoxifène, traditionnellement prescrit dans le traitement du cancer du sein ; l'utilisation de ces deux molécules en synergie permet d'induire une apoptose plus rapide et plus efficace par des antagonistes de CaM non cytotoxiques (Frankfurt et al., 1995).

Cette potentialisation a également été testée dans des cellules de cancer du sein ayant développé une résistance multiple aux molécules chimiques, phénotype que nous retrouvons dans les cellules propagatrices de glioblastomes. Il a ainsi été montré que l'utilisation d'un antagoniste de CaM inhibant à la fois le rôle de CaM dans la progression du cycle cellulaire et l'activité des P-glycoprotéines, protéines d'afflux responsables du phénotype de résistance multiple aux agents chimiques, potentialise l'effet anti-tumoral de la Doxorubicine classiquement utilisée (Liu et al., 2010a).

L'utilisation d'antagonistes de CaM est donc une voie qui peut être ciblée dans de nouvelles thérapies ; à ce jour, l'absence de spécificité des inhibiteurs connus de CaM limite son utilisation à quelques cas. Notre étude peut permettre de sélectionner des composés à utiliser en synergie avec le Témzolomide, agent chimiothérapeutique de référence dans le traitement des glioblastomes

## **Chapitre 3**

### **Recherche de marqueurs membranaires des cellules propagatrices de Glioblastome**

## I. Introduction

### 1. Les protéines membranaires : interface entre les milieux intra- et extracellulaire

Les protéines de la membrane plasmique sont les premiers senseurs des modifications du microenvironnement et sont impliquées dans des fonctions biologiques telles que la signalisation intra- et extracellulaire, le transport d'ions et de molécules spécifiques ou encore les interactions cellule-cellule et cellule-matrice (Figure 30). Les protéines associées à la membrane peuvent être liées de façon permanente ou transitoire à la membrane plasmique (Escriba et al., 2008). Ces protéines sont des initiateurs ou médiateurs de changements phénotypiques associés à la transformation maligne d'une cellule, incluant la prolifération, l'adhésion, la migration et faisant de ces protéines des objets centraux dans divers processus biologiques ainsi que des cibles potentielles de médicaments (Dorsam and Gutkind, 2007; Gschwind et al., 2004). L'altération des niveaux d'expression de protéines de la membrane plasmique peut passer par une surexpression de récepteurs contribuant à la croissance cellulaire et activés par des ligands circulant dans le microenvironnement ou encore par une sous expression de molécules d'adhésion permettant aux cellules de se détacher de la masse tumorale et de migrer ; la neutralisation de certaines de ces protéines par l'utilisation d'anticorps ou d'inhibiteurs chimiques a permis d'augmenter la survie de certains patients (Swanton et al., 2006) et de bloquer la progression tumorale dans le cas de xénogreffes de glioblastomes (Fan et al., 2010).

#### *1.1. Protéines membranaires et métastases*

L'une des étapes nécessaires à la formation de métastases est le détachement de cellules de la masse tumorale, leur invasion du tissu matriciel et leur migration à des sites distants où elles peuvent induire l'angiogenèse et se multiplier pour former des tumeurs secondaires (Encart 6). Le processus métastatique dépend en grande partie des interactions entre les protéines de la membrane plasmique des cellules tumorales et les protéines du microenvironnement ; l'altération de l'expression de certaines protéines de la membrane plasmique permet aux cellules métastatiques de se lier plus fortement à des protéines spécifiques de la matrice

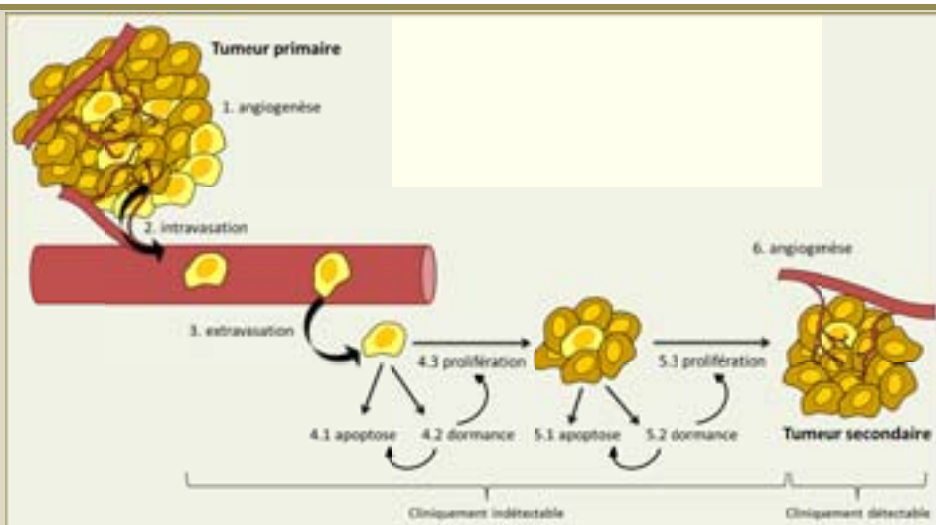
extracellulaire dont les laminines, collagènes, protéoglycanes (Chambers et al., 2002). Cette interaction active des cascades de signalisation intracellulaires, régulant l'expression de gènes, l'organisation du cytosquelette, l'adhésion cellulaire, les mécanismes de survie et la dégradation de la matrice extracellulaire par des enzymes spécifiques telles que les métalloprotéinases et le plasminogène de type urokinase. L'ensemble de ces changements permet à la cellule tumorale d'acquérir des propriétés d'invasivité, de migration et de survie dans différents microenvironnements (explicités dans le Chapitre 1).

#### **Encart 6 : Formation de métastases**

Les métastases permettent l'expansion de la tumeur à partir d'un site primaire vers des organes distants. Dans le cas des glioblastomes la formation des métastases reste localisée dans le cerveau : seuls 8 cas de métastases dans d'autres organes ont été rapportés dans la littérature (Armstrong et al., 2011). Ce très faible pourcentage de formation de métastases dans d'autres régions de l'organisme pourrait être expliqué par i) l'incapacité pour les cellules tumorales de survivre dans un environnement différent de celui du cerveau, ii) des barrières physiques limitant l'expansion de la tumeur, iii) le décès prématuré des patients des suites de la tumeur cérébrale. Que les métastases soient présentes dans d'autres organes ou non, le diagnostic de la tumeur avant leur formation ou l'inhibition de leur formation sont cruciaux dans la réponse au traitement.

La formation de métastases s'effectue en plusieurs étapes. Les cellules tumorales doivent promouvoir l'**angiogenèse** pour supporter leurs besoins métaboliques ; la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est également une voie migratoire permettant aux cellules d'entrer dans le système circulatoire (**intravasation**). Les cellules tumorales doivent survivre dans la circulation sanguine ou lymphatique jusqu'à leur établissement dans un organe (**extravasation**) où elles doivent être capables d'initier et de maintenir la croissance tumorale pour former des **micrométastases préangiogéniques** ; cette croissance peut être supportée par le développement de nouveaux vaisseaux sanguins pour permettre la formation d'une **tumeur macroscopique** (Figure 66).

La formation de métastases peut s'effectuer bien après l'éradication de la tumeur primaire comme cela a été observé dans le cancer du sein ou les mélanomes (Karrison et al., 1999). La **dormance** est difficilement observable expérimentalement mais le groupe de Folkman a montré l'existence de micrométastases pré-angiogéniques où la division cellulaire est compensée par l'apoptose induite par l'absence de vascularisation ; l'état de dormance apparent cesse lorsque les métastases sont capables d'induire une angiogenèse (Holmgren et al., 1995). La dormance peut également être due à la présence de cellules isolées incapables d'entrer dans le cycle cellulaire mais n'ayant pas perdu leur potentiel tumorigénique lorsqu'elles sont réinjectées dans l'organe tumoral primaire (Naumov et al., 2002), i.e. suite à une modification du microenvironnement.



sanguins  
guine (en  
cteurs de  
s besoins  
sable des

Des cellules capables d'acquérir des propriétés mésenchymateuses à travers une **EMT** (Encart 2) ont été identifiées dans de nombreux cancers ; parmi les propriétés acquises, on compte la capacité d'invasivité des tissus environnants, la dissémination systémique à des sites distants ainsi que l'acquisition d'un phénotype de cellules souches (Mani et al., 2008). Cette observation suggère que les CSCs seraient à l'origine des métastases (Chapitre 1 point II-2.4).

La modélisation du processus métastatique a permis de mettre en évidence certaines interactions moléculaires clés. Cette modélisation est effectuée par injection dans un modèle animal de cellules tumorales soit de façon orthotopique (modèle métastatique spontané) soit directement dans la circulation sanguine (modèle métastatique expérimental) (Fidler, 1991; Welch, 1997). Le couplage de ces modélisations avec l'utilisation d'inhibiteurs divers et de la microscopie ont permis de mettre en évidence le rôle des métalloprotéinases (**MMPs**) en particulier au niveau de l'extravasation et de la croissance des cellules dans des organes distants (Chambers and Matrisian, 1997). Le récepteur **CXCR4** joue également un rôle important dans le processus métastatique en sensibilisant les CSCs au gradient chimiotactique de SDF-1 exprimé par plusieurs organes cibles des métastases (Gassmann et al., 2009) ; d'autres chimiokines agissent également sur la voie **RAS/MAPK**. L'**EGFR** permet aux cellules métastatiques de répondre au facteur de croissance TGF- $\alpha$  (Radinsky et al., 1995). La recherche de gènes suppresseurs de métastases, inhibant la formation de métastases mais pas la tumorigénicité au site primaire, a permis de mettre en évidence 6 gènes (NME1, KAI1, KiSS1, BrMS1, MKK4, Maspin) ; leurs mécanismes d'action ne sont pas ou peu identifiés mais ils interviennent dans la régulation de l'initiation et du maintien de la croissance des cellules tumorales aux sites secondaires (Yoshida et al., 2000). D'autre part, le **microenvironnement** dans lequel s'établissent les métastases influence le phénotype de ces cellules et la réponse à la chimiothérapie (Dalton, 1999).



### *1.2. Protéines membranaires et signalisation intracellulaire*

La phosphorylation des résidus d'acides aminés tyrosine, sérine et thréonine est une modification post transcriptionnelle réversible des protéines entrant dans la régulation de voies de signalisation intracellulaires et le contrôle de processus biologiques. Cette phosphorylation est strictement régulée par un équilibre entre l'activité des protéines kinases et phosphatases. Le taux de protéines phosphorylées dans la cellule à un instant donné est faible : la phosphorylation est une modification transitoire des protéines permettant à la cellule de répondre à des changements de son environnement en activant des voies de signalisation par phosphorylation / déphosphorylation (Thingholm et al., 2009) ; une phosphorylation anormale des protéines a été reliée à de nombreuses maladies dont le cancer.

Les tyrosine kinases font partie des oncogènes connus les plus importants. Les récepteurs tyrosine kinase (RTKs) sont localisés au niveau de la membrane plasmique et lient des peptides circulants tels que EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor), l'insuline et ILGF (insulin-like growth factor). Suite à la liaison de son ligand respectif, le RTK dimérise et s'autophosphoryle, induisant la phosphorylation de résidus tyrosines d'autres protéines (Schlessinger, 2000) dans des voies de signalisation favorisant généralement la croissance cellulaire (Chapitre 1, point I-1.3). Dans le cadre de traitements administrés aux patientes atteintes d'un cancer du sein, plusieurs médicaments ciblent des RTKs tels que l'EGFR (Capdevila et al., 2009) ou HER-2 (Scaltriti et al., 2009).

### *1.3. Protéines membranaires et biomarqueurs*

Les protéines membranaires peuvent être utilisées comme biomarqueurs dans la **détection précoce des tumeurs**. Dans certains cancers, des tests sanguins permettent de révéler la présence d'antigènes circulants associés à la tumeur tels que la PSA (prostate-specific antigen), le CEA (carcinoembryonic antigen) et CD44 dans les tumeurs du sein, du côlon, de la tête et du cou (Mayer et al., 2008) ; cependant, ces essais ne permettent pas de détecter des molécules spécifiques et exclusives de la tumeur associée, ce qui limite leur utilisation et leur fiabilité. D'autre part, des problèmes techniques limitent l'analyse du protéome complet du plasma sanguin (Hanash et al., 2008). L'émission de microvésicules par les cellules tumorales

(Chapitre 1, point II-4.2.2) dans le sang ou l'urine offre une importante opportunité d'accéder de manière non invasive et non biaisée (hétérogénéité tumorale régionale) à l'information biologique des cellules dont elles sont issues (Al-Nedawi et al., 2008). Ces microvésicules sont facilement accessibles pour une caractérisation moléculaire et fonctionnelle et leur analyse dans le système sanguin de souris ayant subi une xénogreffe de glioblastome humain a permis de mettre en évidence la présence de l'oncogène EGFR<sub>VIII</sub> exprimé seulement par une petite fraction de cellules tumorales (Al-Nedawi et al., 2008; Biernat et al., 2004). Cette approche est explorée pour la mise en évidence de biomarqueurs associés au cancer de la prostate (Duijvesz et al., 2011).

Les protéines membranaires peuvent également être utilisées comme **marqueurs de pronostic** ou de **prédiction du bénéfice d'un traitement**. Dans le cas du cancer du sein, la mesure de l'expression du récepteur à l'oestradiol par immunohistochimie permet de prédire la réponse aux traitements endocriniens adjuvants associés au Tamoxifène (Knoop et al., 2001) (30 % des patientes traitées par le Tamoxifène ont une rechute de la tumeur dans les 15 ans). L'identification d'un marqueur de pronostic permettrait dans ce cas de déterminer les patientes auxquelles administrer un traitement endocrinien et les patientes auxquelles il faudrait ajouter une chimiothérapie. Dans ce cadre, une équipe a identifié un ensemble de 47 protéines montrant une expression différentielle entre des patientes résistantes au Tamoxifène ou non, parmi lesquelles quelques protéines membranaires dont un inducteur de métalloprotéinases de la matrice extracellulaire ; cette protéine a été validée comme étant surexprimée dans les tumeurs résistant à la thérapie (Umar et al., 2009).

Depuis quelques années, la compréhension des mécanismes moléculaires de la tumorigénicité des glioblastomes est au cœur des préoccupations à travers des études génomiques et transcriptomiques. Certains clusters d'expression de gènes et de miRNAs ont ainsi permis de subdiviser les glioblastomes en plusieurs groupes, reflétant l'agressivité de la tumeur et étant corrélés à la survie des patients (Kim et al., 2011a; Phillips et al., 2006; Verhaak et al., 2010) (Chapitre 1, point I-1.4.2). De la même façon, certains groupes se sont intéressés aux propriétés des gCSCs en essayant de les caractériser au niveau génomique, transcriptomique et moléculaire (Beier et al., 2007; Gonzalez-Gomez et al., 2011; Patru et al., 2010; Silber et al., 2009).

En 2001, le groupe de Sonnhammer a décrit un modèle de prédiction des hélices transmembranaires des protéines (modèle TMHMM), permettant ainsi de déterminer les protéines intégrées à la membrane plasmique dans plusieurs génomes. Ce modèle a ainsi permis de déterminer que 30 % des gènes du génome humain codent pour des protéines membranaires (Krogh et al., 2001). Aujourd'hui, un travail initié entre la Ligue contre le cancer et la société Transgene met en évidence que 36 % environ des protéines sont transmembranaires et capables de s'associer en complexes supramoléculaires. Cependant, ces protéines, peu solubles, ne peuvent être analysées en gels 2D du fait de l'absence d'isofocalisation (protéines trop basiques), ce qui rend les études de protéines membranaires plus difficiles.

## 2. Protéomes de cellules de glioblastomes

Plusieurs études protéomiques ont été effectuées sur des cellules de glioblastome pour tenter de comprendre la physiopathologie de ces tumeurs (Deighton et al., 2010). Une étude du protéome de gliomes de différents grades a ainsi pu identifier un set de 72 protéines exprimées différemment dont 29 ont été annotées comme ayant un rôle potentiel dans la pathologie des gliomes (Chumbalkar et al., 2005). Une autre étude a mis en évidence un ensemble de marqueurs potentiels corrélés avec la survie des patients (Iwadate et al., 2004). Plus récemment, une analyse a permis l'identification de 2660 protéines représentant le protéome total de cellules de glioblastome (Melchior et al., 2009).

Cependant, l'étude d'un protéome global, généralement à partir de gels 2D, permet d'identifier principalement les protéines solubles. La détection de protéines plus hydrophobes et basiques, telles que les protéines de la membrane plasmique, doit passer par une décomplexification des échantillons, i.e. par l'isolation de sous-ensembles de protéines.

La caractérisation du protéome membranaire des glioblastomes a débuté avec l'étude de lignées de glioblastomes (Seyfried et al., 2008) et de modèles de xénogreffes (Rajcevic et al., 2009). Dans une étude récente, des cellules de glioblastome issues de biopsies ont été utilisées dans une caractérisation de protéome membranaire, permettant l'identification de 7 nouvelles protéines (codées par les gènes ANXA2, XRCC6, SCARB2, GOLIM4, CAMKIIA, RAB3A et SV2A) exprimées de façon différentielle. Cette étude a également mis en évidence 3 voies

de signalisation principalement affectées par la tumorigénisation : la signalisation de la réponse inflammatoire rapide, la signalisation des calvéolines et la signalisation calcique (Polisetty et al., 2012a) ; la modification de cette dernière voie de signalisation a également été identifiée au niveau transcriptomique (Dong et al., 2010). Parmi les éléments de la signalisation calcique identifiés comme exprimés de façon anormale, l'étude de Polisetty a identifié des canaux et pompes calciques de la membrane plasmique ainsi que plusieurs protéines de liaison au calcium dont des transporteurs et senseurs de calcium, des protéines régulatrices et effectrices, des éléments de la famille des protéines S100.

### 3. Protéomes de cellules souches de glioblastome

Jusqu'à présent seules deux équipes ont analysé le protéome complet de cellules gCSCs. La première équipe a mis en évidence la perturbation de la voie de signalisation IL-6/STAT3/HIF1 $\alpha$  décrite dans plusieurs cancers. STAT3 est un facteur de transcription associé à la régulation des cellules souches et impliqué dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, l'angiogenèse, la surveillance immunitaire, l'invasion et la formation de métastases (Haura et al., 2005). Cette étude a été effectuée par une approche de phosphoprotéomique, utilisant une étape d'enrichissement en phosphoprotéines avant l'analyse par spectrométrie de masse, et a permis de mettre en évidence l'inhibition de la phosphorylation de STAT3 et la stimulation d'IL-6 en conditions hypoxiques (Nilsson et al., 2010).

La seconde étude a été réalisée en comparant des cellules gCSCs, des cellules souches neurales (NSCs) et des cellules de la masse tumorale microdissectées à partir de coupes de biopsies tumorales. Cette analyse a été effectuée à partir de gels 2D d'extraits protéiques différenciellement marqués et a permis l'identification de 108 protéines dont 18 sont surexprimées de façon sélective dans les gCSCs, 22 sont communes aux gCSCs et NSCs et 19 aux gCSCs et cellules de la masse tumorale. L'étude des protéines exprimées spécifiquement par les gCSCs a permis de mettre, entre autres, en évidence la sécrétion de HDGF (hepatoma derived growth factor) spécifiquement par ces cellules (Thirant et al., 2012) ; HDGF est un facteur proangiogénique influençant la migration cellulaire et est associé à une faible survie des patients (Hsu et al., 2012).

D'autre part, certaines protéines membranaires ont été publiées comme biomarqueurs des gCSCs, dont le plus communément utilisé étant le CD133. Cependant, comme décrit dans le Chapitre 1 de ce manuscrit, ces marqueurs ont soit été invalidés par d'autres études soit ne sont pas spécifiques des gCSCs car partagés avec les cellules souches neurales ou les cellules différenciées du tissu sain (Chapitre 1, point II-2.5).

Jusqu'à présent, le protéome membranaire des gCSCs n'a pas été caractérisé : l'étude du protéome global de ces cellules ne permet d'identifier que les protéines les plus exprimées, rarement présentes au niveau de la membrane plasmique. Nous nous sommes donc attachés à caractériser le protéome membranaire des gCSCs que nous tâcherons d'analyser dans deux directions :

- L'identification des protéines membranaires utilisables comme biomarqueurs ou comme cibles thérapeutiques (Ben-Porath et al., 2008a; Murat et al., 2008) ; une grande proportion de marqueurs membranaires étudiés dans la littérature étant des protéines du « cluster de différenciation » (CDxxx), nous avons concentré notre recherche de biomarqueurs sur ces ensembles de protéines
- Comme de nombreuses cascades de signalisation, le signal calcium est déclenché via un ligand extracellulaire qui, en se liant à un récepteur membranaire, module l'entrée du calcium ; il nous a par conséquent semblé important de caractériser l'expression des protéines de la membrane plasmique impliquées dans le signal calcium

Afin d'obtenir des résultats les plus spécifiques possibles, nous avons comparé le protéome de plusieurs types de gCSCs (TG01, TG10, OB1) avec des cellules souches neurales (NSC), une lignée de cellules de glioblastome (U-87 MG) et une lignée non neurale épithéliale (HEK, human embryonic kidney).

## II. Isolation et identification des protéines membranaires

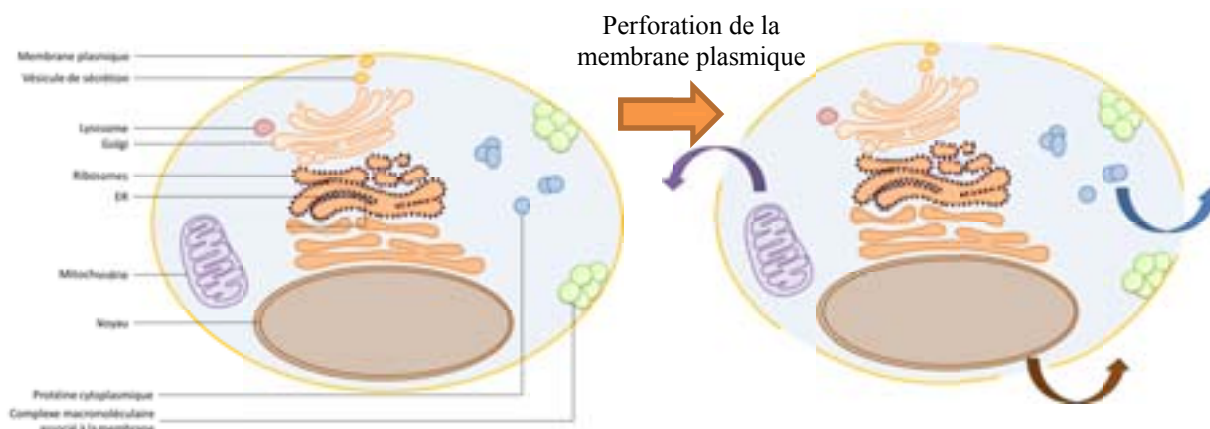
### 1. Isolation des protéines membranaires

Les protéines membranaires sont sous représentées dans les résultats d'analyses protéomiques : dans les approches classiques, ces protéines ne représentent que 5 à 15 % des protéines identifiées alors que 36 % environ des gènes humains codent pour des protéines membranaires (Ahram et al., 2006; Krogh et al., 2001). Les difficultés d'analyse des protéines membranaires sont principalement liées à leur hydrophobicité et leur faible abondance. En effet, le caractère hydrophobe des protéines leur permet d'être intégrées dans les membranes mais cela complique également l'accessibilité aux sites de digestion protéolytiques, étape indispensable à leur identification, et diminue la solubilité des protéines en solution aqueuse. D'autre part, l'identification des protéines contenues dans des mélanges complexes, présentant une gamme dynamique de concentrations importante, se limite aux protéines les plus fortement exprimées ; il est donc indispensable de simplifier les échantillons afin de les enrichir en protéines membranaires.

Plusieurs méthodes ont été proposées afin d'enrichir les échantillons en protéines membranaires parmi lesquelles le marquage des protéines de surface suivi d'une purification par chromatographie d'affinité (Braschi and Wilson, 2006; Sabarth et al., 2002; Zhao et al., 2004), l'utilisation de microbilles magnétiques marquées et dirigées contre la Concanavalline A (lectine communément utilisée pour détecter les protéines membranaires glycosylées) (Lee et al., 2008), l'utilisation d'anticorps immobilisés contre des protéines membranaires (anti-CD15) (Chang et al., 2004), la digestion et isolation des peptides de surface (Bledi et al., 2003), la formation de microparticules (Miguet et al., 2006; Miguet et al., 2007). L'analyse des échantillons protéiques obtenus par ces différentes méthodes permet d'obtenir entre 30 et 80 % de protéines associées à la membrane plasmique (Josic and Clifton, 2007) ; les contaminations les plus fréquentes proviennent de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique (ER).

Afin d'enrichir les échantillons en protéines membranaires, nous avons réalisé des « ghosts » (fantômes membranaires), ou vésicules membranaire, formés par lyse mécanique et débarrassés des débris cellulaires et protéines cytoplasmiques par centrifugations (Matériel et méthodes, point II-14). La formation de ghosts ne permet pas l'élimination de la majeure

partie des organelles, du fait de la continuité des endomembranes, mais permet de conserver une grande partie des complexes macromoléculaires associés à la membrane (Figure 67). Les protéines contenues dans ces ghosts ont ensuite été séparées par électrophorèse (gel 1D), digérées par des enzymes protéolytiques et identifiées par spectrométrie de masse<sup>8</sup>.



**Figure 67 : Ghosts membranaires.**

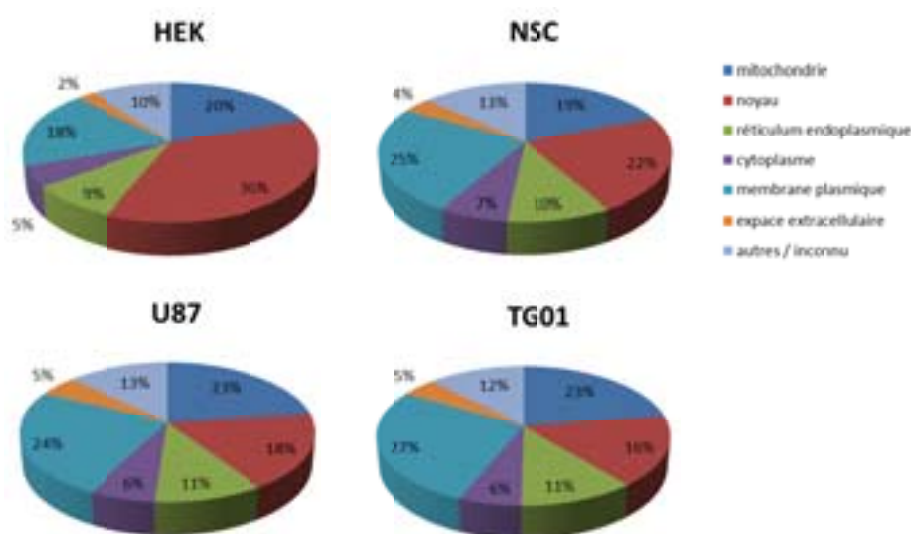
Les ghosts sont obtenus par lyse mécanique des cellules et permettent de « vider » la cellule de ces composants non liés à la membrane plasmique. Le complexe endomembranaire (réticulum endoplasmique (ER), ribosomes, golgi, lysosomes, vésicules de sécrétion, membrane plasmique) et les complexes macromoléculaires associés à la membrane sont conservés en majeure partie.

---

<sup>8</sup> Les données de spectrométrie de masse ont été générées par Dr Sarah Cianferani, Dr Jean-Michel Saliou et Sarah Lennon, UMR 7178

## 2. Localisation cellulaire des protéines identifiées

Les échantillons contiennent 18 à 27 % de protéines appartenant à la membrane plasmique (Figure 68). Le reste des échantillons est constitué d'un mélange de protéines issues d'organites intracellulaires, également à l'origine de ghosts, avec une forte composante nucléaire et mitochondriale (respectivement 16 à 36 % et 19 à 23 %) ; peu de protéines cytoplasmiques ont été identifiées (entre 5 et 7 % des échantillons).



**Figure 68 : Répartition des protéines identifiées par spectrométrie de masse dans les différents échantillons.**  
La localisation cellulaire des protéines identifiées a été déterminée suivant les annotations de Gene Ontology (GO) (Encart 7) ; cette représentation ne prend pas en compte les niveaux d'expression de chaque protéine.

La majeure différence entre les échantillons se situe au niveau des protéines nucléaires : il semble que le noyau soit absent d'un certain nombre de ghosts obtenus à partir des cellules TG01 et U-87 MG et dans une moindre mesure des cellules NSCs. Ceci pourrait être dû à une continuité des endomembranes moins importante ou moins résistante dans les cellules tumorales par rapport aux cellules HEK.

Dans les cellules HEK, le faible pourcentage de protéines membranaires identifiées vient de la surreprésentation des protéines nucléaires par rapport aux autres échantillons mais également d'un nombre moins important de protéines identifiées : 323 protéines annotées comme localisées au niveau de la membrane plasmique ont été identifiées dans les cellules HEK alors que 467, 453 et 427 protéines ont été identifiées respectivement dans les cellules NSC, TG01 et U87.



**Encart 7 : Gene Ontology**

<http://www.geneontology.org/>

Gene Ontology (GO) est un projet initié dans le but de standardiser la représentation des gènes et protéines retrouvées dans différentes bases de données à travers l'utilisation d'un vocabulaire et d'annotations contrôlés. Initié en 1998, par le rassemblement des informations contenues dans les bases de données de 3 organismes (drosophile, Saccharomyces, souris), GO rassemble aujourd'hui les éléments d'un répertoire extensif de génomes de plantes, animaux et organismes microbiens.

GO est structuré selon 3 ontologies décrivant les produits de gènes en termes de processus biologique, composant cellulaire et fonction moléculaire, indépendamment des espèces.

L'utilisation des termes de GO dans différentes bases de données permet une certaine uniformité des données. La structuration du vocabulaire utilisé et les relations des différents termes entre eux permettent un questionnement de la base de données à différents niveaux.

### 3. Sensibilité de détection des protéines

L'hétérogénéité intra échantillon induit un élargissement de la gamme dynamique des taux d'expression des protéines et donc une sensibilité de détection moindre par rapport aux protéines plus faiblement exprimées tels que les RCPGs (récepteurs couplés aux protéines G). Une bonne évaluation de la sensibilité des résultats obtenus est donc l'identification de ces protéines membranaires. Le génome humain contient 382 endo-RCPGs dont 84 sont exprimés dans les cellules TG01 par plus d'une molécule ARNm par cellule d'après les données de transcriptomique ; parmi ces RCPGs, 7 sont exprimés de façon différentielle dans les gCSCs par rapport à des cellules de glioblastomes, de tissu cérébral sain ou épithéliales non neurales (données non publiées). L'analyse du protéome membranaire a permis l'identification de 3 de ces RCPGs : CD97, Latrophilin-2, GPR56, dont la détection est corrélée au niveau d'expression transcriptomique (Tableau 10). L'analyse protéomique nous permet donc d'identifier des protéines exprimées en transcriptomique avec une valeur de  $Ct \leq 25$  ; la détection d'aucun de ces RCPGs n'a été confirmée dans les cellules U87 dans lesquelles les RCPGs sont plus faiblement transcrits.

		CD97	LPHN2	GPR56
Transcriptome (Ct)	TG01	25,3	24,0	24,2
	U-87 MG	27,5	28,1	24,9
	NSC	31,3	28,7	22,6
Protéome (nb peptides)	TG01	2	5	3
	U-87 MG	0	0	0
	NSC	0	0	7

**Tableau 10 : Comparaison des niveaux d'expressions transcriptomique et protéomique de 3 RCPGs.**

Les données ont été normalisées par rapport au gène RPLP0 exprimé à 21,2 Ct. Abréviation : Ct = threshold cycle : cycle de PCR minimal à partir duquel l'ADN rétrotranscrit est détecté.

L'absence d'identification d'un nombre plus important de RCPGs est probablement due à la structure particulière de ces protéines. Ces protéines sont composées d'un domaine N terminal extracellulaire, d'un cœur hydrophobe de 7 hélices transmembranaires et d'un domaine C terminal cytoplasmique. Les domaines extracellulaire et membranaire sont impliqués dans la liaison du ligand tandis que le domaine cytoplasmique, composé de 3 boucles et d'une région C terminale, est impliqué dans la transmission du signal et le recrutement de complexes protéiques de domaines intracellulaires (Rosenbaum et al., 2009). La composition des RCPGs contient peu de sites de protéolyse intra membranaires pour la trypsine et la chymotrypsine, communément utilisées pour obtenir des peptides identifiables par spectrométrie de masse ; cette caractéristique des RCPGs limite donc la détection des peptides requis pour l'identification de ces protéines et ne permet d'identifier que les RCPGs ayant une grande queue extracellulaire, contenant potentiellement des peptides identifiables en spectrométrie de masse.

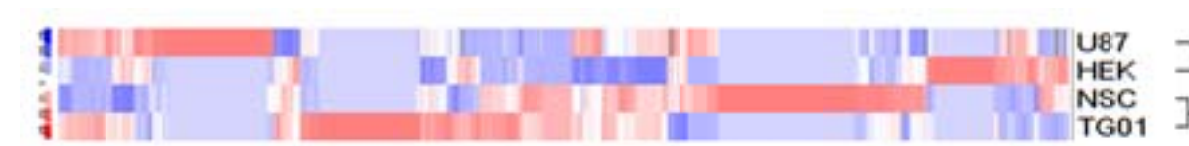
#### 4. Expression différentielle du protéome membranaire

L'expression des protéines membranaires a été comparée dans les différents échantillons selon le nombre de peptides identifiés pour chaque protéine (Figure 69). Pour un type cellulaire donné, la surexpression d'une protéine a été définie soit par son absence dans les autres types cellulaires soit par un ratio de nombre de peptides identifiés supérieur ou égal à 1.5 par rapport aux autres types cellulaires ; on peut ainsi identifier

- 114 protéines surexprimées spécifiquement dans les cellules TG0, dont 93 avec un ratio  $\geq 2$

- 154 protéines surexprimées spécifiquement dans les cellules NSC, dont 128 avec un ratio  $\geq 2$
- 107 protéines surexprimées spécifiquement dans les cellules U-87 MG, dont 86 avec un ratio  $\geq 2$
- 75 protéines exprimées communément dans les cellules TG01 et NSC
- 37 protéines exprimées communément dans les cellules TG01 et U-87 MG
- 12 protéines exprimées communément dans les cellules TG01 et HEK

Ces observations permettent de caractériser les cellules TG01 comme partageant à la fois des propriétés des cellules souches neurales et des propriétés de cellules tumorales. D'autre part, le rassemblement des cellules TG01 et NSC dans le clustering présenté en Figure 69 rejoint la proximité des profils transcriptomique (Lee et al., 2006a) et protéomique globaux (Thirant et al., 2012) des deux types cellulaires : d'après le protéome membranaire global, les cellules TG01 sont proches des cellules NSC et beaucoup plus éloignées des cellules U-87 MG et HEK.

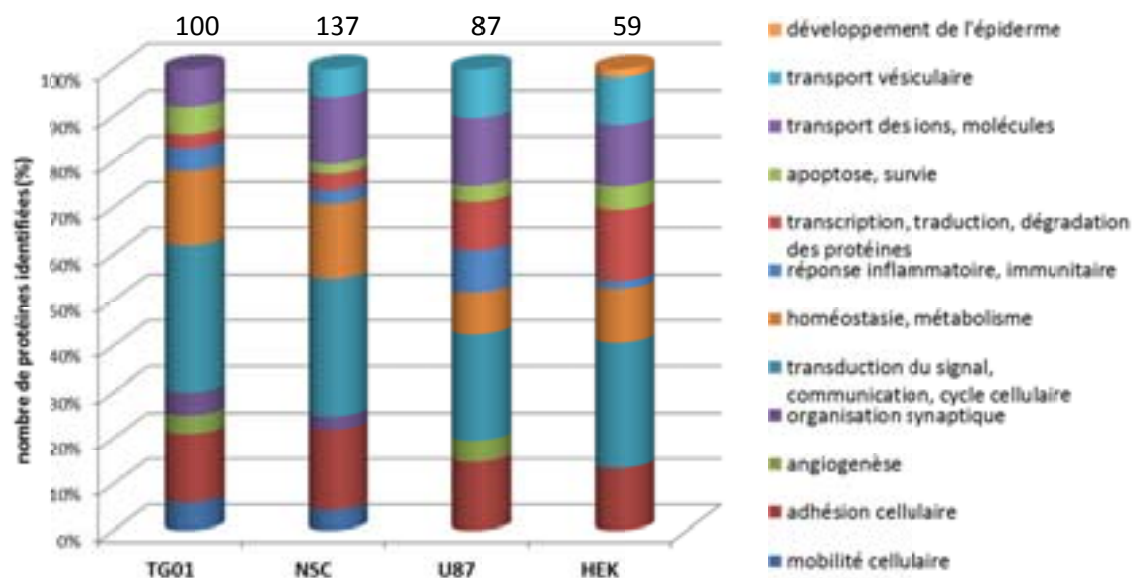


**Figure 69 : Expression des protéines membranaires dans les différents types cellulaires.**

L'expression des protéines membranaires détectées avec 2 peptides ou plus dans au moins un type cellulaire a été comparée dans les différentes cellules. Le clustering a été effectué par le logiciel dChip ; les protéines marquées en rouge correspondent à une surexpression, les protéines marquées en bleu à une sous expression, les protéines marquées en blanc à une expression moyenne ou identique dans les différents échantillons.

Les gènes surexprimés ont ensuite été classés selon les processus biologiques dans lesquels ils sont impliqués (Figure 70). Ces résultats permettent de mettre en évidence la surexpression de protéines impliquées dans la physiopathologie des gCSCs. On peut en particulier identifier des protéines impliquées dans la migration et l'adhésion cellulaires, l'angiogenèse (processus également retrouvé dans les cellules U-87 MG mais basé sur des protéines différentes), l'homéostasie cellulaire et certaines voies de signalisation intracellulaires. On peut également observer qu'aucune protéine impliquée dans la migration cellulaire ne semble surexprimée dans les cellules U-87 MG ; cette propriété pourrait donc être imputée au caractère invasif et de mobilité des gCSCs et cellules souches et expliquerait l'absence de métastases dans les expérimentations de xéno greffes avec des cellules U-87 MG. D'autre part, la surexpression de

protéines angiogéniques dans les cellules TG01 et U-87 MG met en évidence et confirme le fort potentiel angiogénique de ces cellules tumorales.



**Figure 70 : Répartition des protéines surexprimées selon les processus biologiques impliqués.**

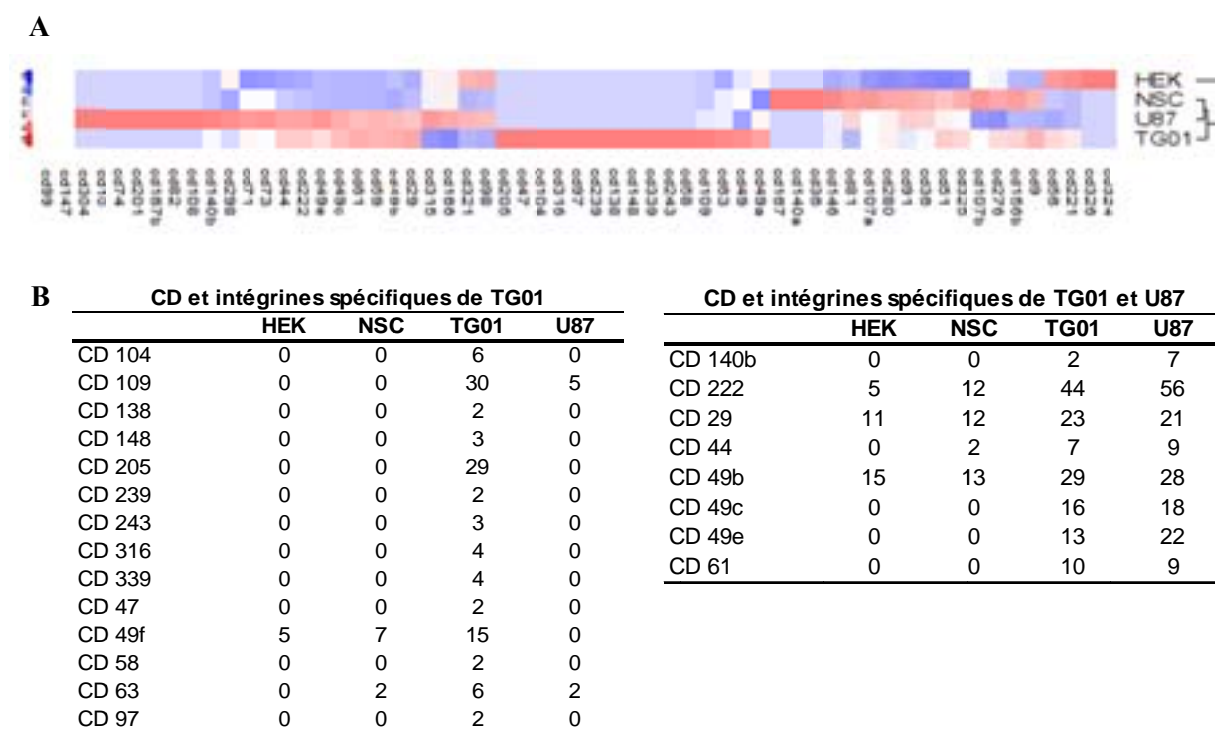
Résultats présentés sous la forme de pourcentages du nombre total de protéines surexprimées dans chaque type cellulaire ; le nombre total de protéines correspondant est indiqué au-dessus de chaque bâtonnet de l'histogramme. Les protéines comptabilisées sont celles exprimées avec un ratio  $\geq 1.5$  pour le / les échantillon(s) par rapport aux autres échantillons. L'annotation des processus biologiques a été faite d'après Gene Ontology.

### III. Clusters de différenciation et Intégrines

Les **clusters de différenciation** (CD) sont des molécules de surface constituant la carte d'identité des cellules immunitaires. Ces clusters ont été définis en 1984 par le « human leucocyte differentiation antigens workshops » (HDLA) pour permettre de développer des anticorps ciblant ces cellules. D'un point de vue physiologique, ces molécules peuvent agir en tant que récepteurs ou ligands et être impliquées dans des voies de signalisation ou dans l'adhésion cellulaire ; plus de 350 CD ont été identifiés chez l'homme (Zola et al., 2007).

Parmi les CD, certains sont également connus sous une nomenclature intégrine. Les **intégrines** sont des glycoprotéines formant des récepteurs hétérodimériques pour les molécules de la matrice extracellulaire et jouant un rôle essentiel dans la formation des métastases (Hood and Cheresh, 2002). Ces récepteurs sont constitués d'une sous unité  $\alpha$  et d'une sous unité  $\beta$  : les combinaisons de 18 sous unités  $\alpha$  et 8 sous unités  $\beta$  permettent de former au moins 24 hétérodimères différents. Dans le cas du cancer du sein, les intégrines  $\beta_1$ ,  $\alpha_v$  et  $\alpha_6$  sont plus fortement exprimées dans les cellules capables de générer des métastases et la surexpression de l'intégrine  $\beta_1$  est corrélée avec un pronostic plus sombre (Lund et al., 2009) ; l'étude du protéome de cellules tumorales du pancréas a également révélé une surexpression de l'intégrine  $\beta_1$  (Chen et al., 2005). Dans le cas des glioblastomes, l'expression d' $\alpha_5\beta_1$  est associée à un phénotype tumoral plus agressif et la surexpression de la sous unité  $\alpha_5$  est corrélée avec une survie plus faible des patients ; cette surexpression est également responsable de l'inhibition de la voie p53 suite à l'action du Témzolomide (Janouskova et al., 2012).

L'expression de ces protéines a été comparée dans les différents types cellulaires (Figure 71A). Cette classification permet i) de distinguer les cellules HEK, non neurales et pour lesquelles peu de CDs sont exprimés, des autres types cellulaires et ii) de mettre en évidence le partage de molécules entre les gCSCs et NSC d'une part et entre les gCSCs et cellules différenciées de la masse tumorale d'autre part ; très peu de protéines sont surexprimées conjointement dans les autres types cellulaires.



**Figure 71 : Expression des CDs dans les différents types cellulaires.**

**A** : Clusterisation de l'ensemble des CDs détectés avec au moins 2 peptides dans un type cellulaire. La clusterisation a été effectuée avec le logiciel dChip. **B** : CDs spécifiques ou surexprimés dans les cellules TG01 (gauche) et surexprimés conjointement dans les cellules TG01 et U87 (droite) avec le nombre de peptides identifiés pour chaque type cellulaire.

Parmi les **intégrines** exprimées conjointement par TG01 et U87, on retrouve les sous unités  $\alpha_5$  (CD49e) et  $\beta_1$  (CD29), corrélées à un phénotype agressif des glioblastomes (Chen et al., 2005) ainsi que la sous unité  $\alpha_2$  (CD49b), surexprimée en présence de TGF $\beta$ 1 (Miyake et al., 2000). La sous unité  $\alpha_3$  (CD49c) a également été identifiée comme étant surexprimée dans les glioblastomes (Xiao et al., 2009) ainsi que la sous unité  $\beta_3$  (CD 61) en association avec  $\alpha_V$  dans la périphérie invasive des glioblastomes et la vasculature associée aux glioblastomes ; l'intégrine  $\alpha_V\beta_3$  a un rôle pro angiogénique mais peut également être anti-angiogénique selon le contexte microenvironnemental (Kanamori et al., 2006). Cette analyse permet également de retrouver la molécule CD140b, aussi connue sous le nom de **PDGFR $\beta$** , surexprimée dans les cellules de glioblastome (Maderna et al., 2007) et fortement impliquée dans l'angiogenèse (Guo et al., 2003; Shen et al., 2009) ; cette molécule est étudiée en tant que cible thérapeutique dans plusieurs cancers (Coluccia et al., 2008; Kaplan et al., 2006; Reinmuth et al., 2009; Shi et al., 2011).

Parmi les protéines surexprimées spécifiquement dans les cellules TG01, **CD109** est une glycoprotéine impliquée dans la signalisation de TGF $\beta$  en intervenant au niveau de l'internalisation du récepteur, initiant la dégradation du récepteur et l'inhibition de la signalisation intracellulaire de TGF $\beta$  (Bizet et al., 2011). La dérégulation de l'expression de CD109 a été identifiée dans de nombreux cancers tout en n'étant pas détectée dans les tissus sains (à l'exception des testicules) (Hashimoto et al., 2004). Le profil d'expression protéomique de cette molécule sur nos différents types cellulaires confirme ces données : CD109 n'est exprimée ni dans HEK ni dans NSC mais est détectée dans les cellules U-87 MG. À ce jour, l'expression de CD109 n'a pas été reportée dans les CSCs ; notre analyse montre donc pour la première fois une forte surexpression de CD109 dans les gCSCs par rapport aux cellules de la masse tumorale.

**CD205** est un récepteur impliqué dans le processus de présentation des antigènes de classe I et de classe II permettant d'initier la réponse immunitaire ; ce récepteur est également impliqué dans la reconnaissance des cellules apoptotiques ou nécrotiques (Shrimpton et al., 2009). Dans une étude portant sur le cancer des ovaires, l'expression de CD205 a été identifiée dans des cellules tumorales, stimulée par l'expression de l'interleukine 6 (IL6) ; cette étude met en évidence le rôle de CD205 dans l'adhésion à la matrice extracellulaire et la formation de métastases (Giridhar et al., 2011). De façon surprenante, CD205 est sous exprimé dans d'autres types de tumeurs, et agit probablement comme un gène suppresseur de tumeur, associé avec un état différencié et une diminution de la prolifération, probablement sous l'effet de l'interleukine 4 (al-Tubuly et al., 1996; Tungekar et al., 1996). D'après nos résultats, CD205 est surexprimé de façon spécifique dans les TG01 ; on peut donc supposer que, de la même façon que dans le cancer des ovaires, CD205 est impliqué dans le processus métastatique des gCSCs.

**CD104, intégrine  $\beta_4$** , est impliqué dans l'activation des voies de signalisation PI3K-AKT-mTOR, Ras-ERK, NFAT suite à la liaison d'un ligand extracellulaire (Hu et al., 2012). Bien que l'expression de CD104 ait été reliée à la tumorigénicité des cellules, dont des cellules de gliomes de haut grade (Giancotti, 2007; Previtali et al., 1996), la comparaison de plusieurs lignées de glioblastomes a mis en évidence l'absence d'expression dans les cellules U-87 MG (Belot et al., 2001), confirmée par nos données. L'analyse protéomique effectuée a permis

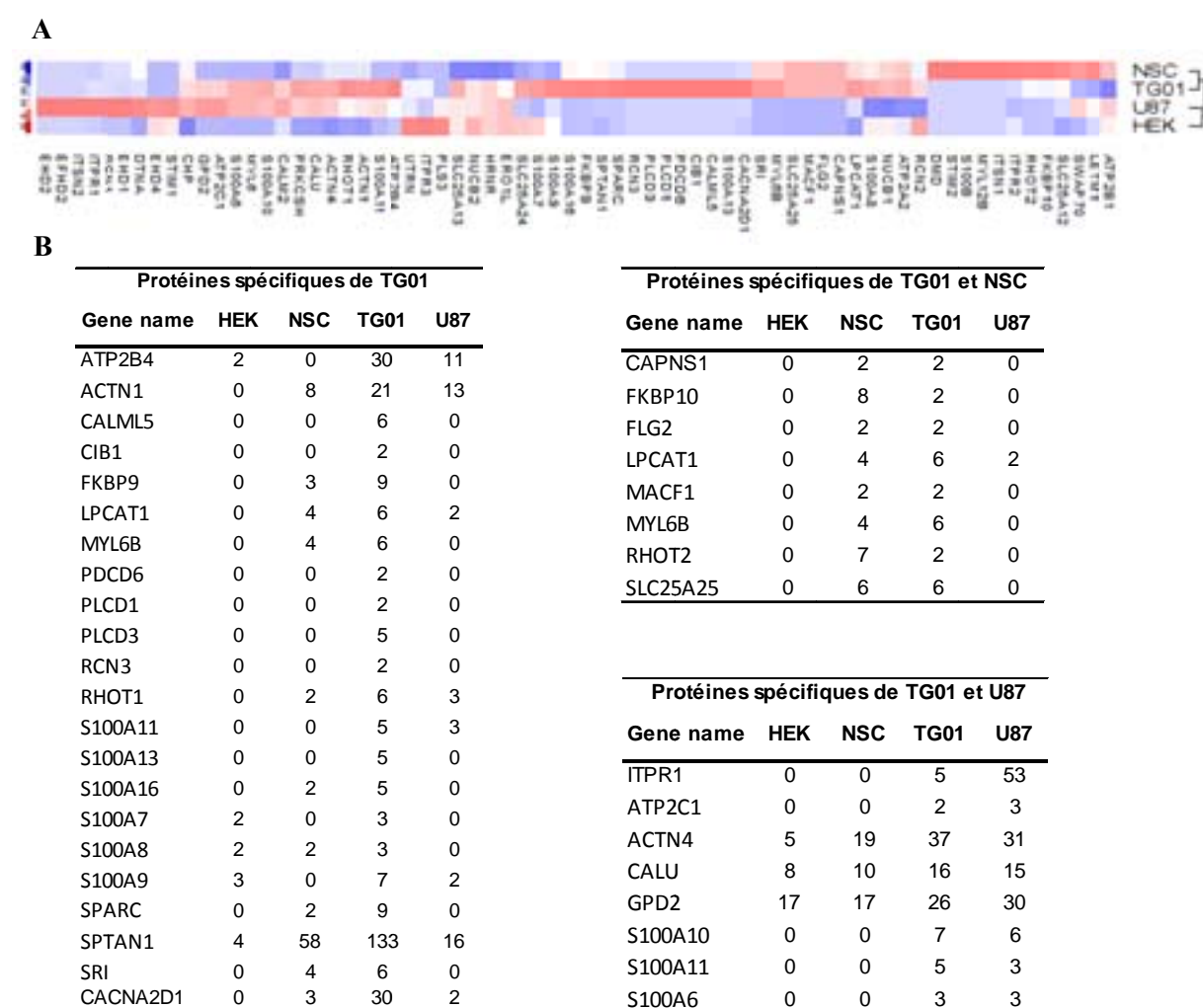
d'identifier CD104 uniquement dans les cellules TG01, reflétant le phénotype tumorigénique de ces cellules. Cependant, cette détection n'a pas été effectuée avec un nombre assez important de peptides (6) pour pouvoir supposer que cette protéine soit surexprimée par rapport aux cellules de la masse tumorale (cellules de glioblastome autres que U-87 MG) ; la présence de CD104 devra être confirmée sur d'autres lignées de gCSCs.

L'intégrine  $\alpha_6\beta_1$  forme un point d'ancrage des cellules souches neurales adultes dans la niche périvasculaire. La sous unité  $\alpha_6$  (CD49f) été décrite comme surexprimée dans les gCSCs et impliquée dans la prolifération et la tumorigénicité des cellules (Lathia et al., 2010) ainsi que dans l'invasion des gCSCs (Velpula et al., 2012). Nos résultats sont cohérents avec nos données : expression de CD49f dans les NSCs, surexpression dans les TG01 et absence dans les U-87 MG ; à travers la littérature et nos résultats, cette protéine peut être considérée comme surexprimée spécifiquement dans les gCSCs et pourrait être utilisée comme biomarqueur de ces cellules.



#### IV. Protéome calcique

La liste des protéines membranaires, ou associées à la membrane, obtenue précédemment a été filtrée par rapport à l'implication des protéines dans la signalisation calcique : seules les protéines appartenant au calcium toolkit ou au EFhandome (listées en Annexes VII et VIII) ont été conservées. La comparaison de ce sous protéome dans les différents types cellulaires nous permet ici encore d'observer des propriétés communes aux cellules TG01 et NSC (Figure 72A).



**Figure 72 : Expression des protéines impliquées dans la signalisation calcique.**

**A :** Clusterisation de l'ensemble des protéines impliquées dans la signalisation calcique détectées avec au moins 2 peptides dans un type cellulaire. La clusterisation a été effectuée avec le logiciel dChip. **B :** Protéines spécifiques ou surexprimées dans les cellules TG01 (gauche) et surexprimées conjointement dans les cellules TG01 et NSC (droite, haut) ou les cellules TG01 et U87 (droite, bas) avec le nombre de peptides identifiés pour chaque type cellulaire. La clusterisation a été effectuée avec le logiciel dChip ; les protéines sont représentées par les noms de leurs gènes respectifs.

## 1. Protéines S100, marqueurs de tumeurs

Parmi les protéines surexprimées dans les cellules TG01 ou conjointement avec les cellules NSC ou U-87 MG, on retrouve les protéines de la famille S100, souvent impliquées dans la progression tumorale. Bien que le rôle précis de ces protéines ne soit pas identifié, plusieurs membres de cette famille sont associés à la formation de métastases à travers l'interaction avec les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (Salama et al., 2008) ou ont un rôle de chimioattractants (Phipps et al., 2011); certaines de ces protéines peuvent également réguler des facteurs de transcription, dont p53 (Grigorian et al., 2001).

L'expression de la protéine **S100A6** a notamment été corrélée avec le grade des gliomes (Camby et al., 1999) et la migration cellulaire (Kucharczak et al., 2001) et est préférentiellement exprimée dans les cellules associées à la niche périvasculaire (niche des cellules souches) dans un modèle génétique de gliome (Harris et al., 2008). Les protéines **S100A10** et **S100A11** sont également communément surexprimées dans les cellules TG01 et U87 et rapportées dans la littérature comme impliquées dans plusieurs cancers (Hao et al., 2012; Liu et al., 2010b; Tan et al., 2011). Cependant, à ce jour aucune étude n'a rapporté la surexpression de ces protéines dans les glioblastomes.

Parmi les protéines exprimées spécifiquement ou surexprimées dans les cellules TG01, **S100A9** est associée entre autres avec les tumeurs du sein de haut grade (McKiernan et al., 2011) et **S100A13** a été détectée dans les gliomes de haut grade au niveau des niches périvasculaires (Landriscina et al., 2006), environnements privilégiés des gCSCs. Cette observation rejoint les données obtenues lors de notre analyse mettant en évidence la surexpression de S100A13 dans les cellules TG01; l'absence d'expression de cette protéine dans les cellules U-87 MG peut être corrélée au fait que ces cellules soient une lignée cellulaire et non des cellules primaires issues de la tumeur ou que la protéine S100A13, marqueur de tumeurs de haut grade, soit exprimée principalement dans les gCSCs et non dans les cellules de la masse tumorale.

## 2. Protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique

Parmi les protéines impliquées dans la signalisation calcique, nous nous intéressons particulièrement aux protéines impliquées dans la régulation de l'entrée / sortie de calcium du cytoplasme, modulant l'homéostasie calcique. Certaines familles de protéines n'ont été identifiées dans aucun type cellulaire : il s'agit probablement d'une difficulté d'accès aux peptides utilisés pour l'identification des protéines concernées, de la même façon que pour les RCPGs (point II-3).

La **sous unité  $\alpha_2\delta-1$  des canaux calciques voltage dépendants** est fortement surexprimée dans les cellules TG01 par rapport aux cellules NSC et U-87 MG. L'expression de cette sous unité augmente la densité des canaux calciques voltage dépendant au niveau de la membrane plasmique (Davies et al., 2007; Shistik et al., 1995). Plus récemment, il a été mis en évidence que cette protéine est impliquée dans la synaptogenèse, processus altéré dans les cellules TG01 (mis en évidence au point II-4), indépendamment de la fonction du canal calcique (Garcia et al., 2008). Dans des modèles de douleur neuropathique, la surexpression de la protéine  $\alpha_2\delta-1$  et sa localisation périphérique laissent supposer un rôle dans la régénération neuronale et la plasticité cellulaire (Bauer et al., 2009).

Les **pompes calciques ATPasiques** ont un profil d'expression assez intéressant : on retrouve en effet une sous-expression de PMCA1 et une surexpression de PMCA4 dans les cellules TG01 ; PMCA4 est également légèrement surexprimée dans les cellules U-87 MG. Dans la cellule, l'altération des capacités d'efflux du calcium peut avoir de nombreuses conséquences dont la réduction de la sensibilité à l'apoptose ou l'augmentation de la réponse cellulaire à un facteur de croissance. Cependant, les différentes études ayant rapporté l'altération de l'expression d'isoformes des pompes calciques membranaires ont mis en évidence une surexpression de PMCA1 et une sous-expression de PMCA4. En effet, la sous-expression de PMCA1 favorise la nécrose et l'expression de PMCA4 est associée à un phénotype de différenciation (Curry et al., 2012; Roberts-Thomson et al., 2010). Ces données vont dans le sens du nombre de peptides identifiées pour U-87 MG pour les protéines PMCA1 et PMCA4 (respectivement 24 et 11) mais sont contraires à ce que l'on obtient pour les cellules TG01 ; cette observation met en évidence la biologie particulière de ces cellules, notamment au niveau de la signalisation calcique dont la régulation est altérée.

## V. Conclusion

L'étude des protéines de la membrane plasmique est de plus en plus utilisée dans la recherche de biomarqueurs dans le cadre de pronostiques, de monitoring et de prédiction des bénéfices d'un traitement. Ces protéines peuvent également être utilisées comme cibles thérapeutiques potentielles : aujourd'hui environ 2/3 des molécules ciblant des protéines particulières sont dirigées contre des protéines de la membrane plasmique. Cependant, les protéines membranaires sont hydrophobes et possèdent plusieurs domaines transmembranaires, ce qui complexifie les méthodes requises pour leur isolation et identification. La plupart des études du protéome membranaire sont effectuées sur des lignées cellulaires mais des stratégies utilisant des tissus cliniques couplées à des études de spectrométrie de masse sont de plus en plus développées (Leth-Larsen et al., 2010). L'utilisation de marqueurs potentiels identifiés en protéomique nécessite leur validation à travers l'utilisation d'un nombre assez important de matériels cliniques.

La comparaison des protéomes membranaires issus de cellules de gCSCs avec des cellules souches neurales, tumorales et épithéliales nous a permis de mettre en évidence plusieurs protéines surexprimées dans les cellules TG01. Cette analyse décrit pour la première fois l'étude du protéome membranaire de gCSCs et a permis l'identification de plusieurs biomarqueurs potentiels des gCSCs. En effet, les protéines CD109 et CD205 ont certes été décrites dans des cellules tumorales, dont des cellules de glioblastome, mais la surexpression de ces protéines dans les cellules TG01 par rapport aux cellules U-87 MG est amplement suffisante pour considérer ces protéines en tant que candidats biomarqueurs des gCSCs. De la même façon, les protéines S100A9 et S100A13 ont préalablement été identifiées dans des tumeurs du sein et de glioblastome de haut grade mais n'ont pas été reliées aux gCSCs. Cette étude nous a également permis de détecter des protéines impliquées dans la signalisation calcique comme étant différentiellement exprimées dans les cellules TG01 par rapport aux autres types cellulaires, dont la PMCA1, la PMCA4, la sous unité  $\alpha_2\delta-1$  des canaux calciques voltage dépendants.

L'ensemble des protéines différentiellement exprimées n'a pas été commenté mais contribue au phénotype de cellules souches tumorales des TG01, partageant à la fois des propriétés de cellules souches et de cellules de glioblastome comme mis en évidence par l'expression

commune de certaines protéines ou de processus biologiques affectés. Cependant, les quelques protéines discutées nous semblent de bon candidats en tant que biomarqueurs potentiels des gCSCs. La sélection de ces protéines devra être confirmée par une seconde analyse protéomique incluant d'autres gCSCs (OB1 et TG10) et réalisée par le Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique (UMR 7178, Dr Sarah Cianferani, Dr Jean-Michel Saliou, Sarah Lenon) ainsi que par un marquage en cytométrie en flux ou sur des coupes histologiques de neurosphères.

Certaines protéines ont été décrites dans plusieurs types de cancers ou voies de signalisation associées à la tumorigénisation mais n'ont été identifiées dans aucun de nos échantillons cellulaires. Ces éléments peuvent donner un aspect biaisé dans le cas d'une caractérisation protéomique mais n'est pas gênante dans le cadre d'une étude différentielle. D'autre part, la comparaison de notre étude avec celle de Polisetty réalisée sur le protéome membranaire de cellules de glioblastome en comparaison avec du tissu cérébral de patient épileptique (Polisetty et al., 2012a) montre l'identification commune d'un certain nombre de protéines, dont les protéines de la famille S100, des intégrines, des clusters de différenciation ou des protéines impliquées dans la signalisation calcique (Annexe IX).

Cependant, cette étude n'a pas permis l'identification de certaines protéines rapportées dans les glioblastomes. Il s'agit en autres de l'intégrine  $\alpha_4$ , de la protéine S100A4, de la famille des annexines (Polisetty et al., 2012a; Thirant et al., 2012) ; la protéine HDGF, potentielle cible thérapeutique des gCSCs (Thirant et al., 2012), n'a été identifiée dans notre analyse spectrométrique qu'avec 1 peptide, ce qui ne permet pas de valider sa présence. Ces différences peuvent être dues à la structure des protéines (problème de génération des peptides nécessaires à leur identification) ou à la préparation des échantillons. En effet, nos échantillons sont congelés une première fois à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  avant d'être recentrifugés ; cette étape peut induire la perte des protéines les moins ancrées à la membrane. Cependant, dans le cas d'une étude différentielle, ces différences ne sont pas gênantes bien qu'elles induisent inévitablement la réduction du nombre de biomarqueurs potentiels.

Dans le Chapitre précédent, nous avons caractérisé l'inhibition de la liaison de la Calmoduline (CaM) à un certain nombre de peptides par plusieurs antagonistes. Dans le cas de la pompe calcique de la membrane plasmique (PMCA), la liaison de CaM induit l'activation (levée de l'auto-inhibition) de la pompe. Certains antagonistes inhibent la liaison de CaM à la PMCA4 avec une forte affinité mais de façon aspécifique (Calmidazolium, PCL 10F08, PCL 09G06 avec des valeurs  $IC_{50}$  respectives de 8, 10 et 25  $\mu\text{M}$ ). D'autres antagonistes sont plus spécifiques de la PMCA4 mais avec des valeurs  $IC_{50}$  beaucoup plus élevées : LPS 02-18-L-A06 ( $IC_{50} = 2212 \mu\text{M}$ ) et LPS 01-08-L-G06 ( $IC_{50} = 2418 \mu\text{M}$ ) en ne tenant pas compte de l'inhibition des peptides CAP-23/NAP-22, Hsp90 et Neuromodulin dont la liaison à CaM est fortement inhibée par tous les antagonistes. Ces deux molécules ne figurent pas parmi les antagonistes testés sur l'induction de la modification de l'homéostasie cellulaire présentée dans le Chapitre 2 car leurs valeurs de  $K_i$  de liaison à CaM sont élevées (Annexe II) mais le composé **LPS 01-08-L-G06** permet de mettre en évidence une différence de modification de l'homéostasie calcique dans les cellules gCSCs (réponse cinétique de type 1, permanente) par rapport aux cellules de la masse tumorale (réponse cinétique de type 2, transitoire). Cette différence de modification de l'homéostasie calcique nous permet également de supposer que ce composé n'inhibe pas la liaison de CaM à la PMCA1, surexprimée dans les cellules U-87 MG, de la même façon et nous permet de proposer le composé LPS 01-08-L-G06 comme un marqueur potentiel des gCSCs.

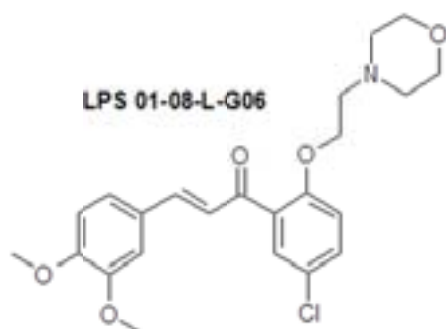


Figure 73 : Structure du composé LPS 01-08-L-G06, famille des chalcones.

## **Conclusion Générale**

Ce travail s'inscrit pleinement dans les deux axes développés au laboratoire : d'une part l'étude des cellules propagatrices de glioblastome, et d'autre part l'étude de la Calmoduline, protéine majeure de la signalisation calcique, interagissant avec une pléthore d'autres protéines cellulaires intervenant dans la gestion de la signalisation calcique et contrôlant des évènements cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la mort cellulaire, ....

Les cellules propagatrices de glioblastome, plus communément appelées cellules souches cancéreuses de glioblastome, sont considérées comme responsables de l'agressivité et de la résistance aux traitements usuels des gliomes de haut grade. Ces cellules ont des propriétés de cellules souches normales : elles sont rares, ont des capacités d'auto-renouvellement illimitées et peuvent se différencier par le biais de divisions asymétriques pour reformer la tumeur originelle *in vivo* (Reya et al., 2001). Parmi les nombreux mécanismes de survie cellulaire activés dans ces cellules et médiant leur résistance aux traitements standard, ces cellules sont capables d'interagir avec leur microenvironnement pour faciliter l'immunosuppression, la migration des cellules, l'angiogenèse et l'invasivité tumorale (Bonavia et al., 2011; Li and Lattera, 2012). Cette grande plasticité cellulaire permet aux gCSCs de trouver des « voies de secours » et de s'adapter à des traitements ciblés. Ceci est renforcé par la redondance des voies de signalisation activées dans les cellules de glioblastome, comme en témoigne l'observation d'un « switch RTK » dans le cadre de thérapies ciblant l'EGFR : les cellules sont capables d'activer d'autres voies des RTKs promouvant la survie cellulaire et responsables de l'effet transitoire des inhibiteurs de l'EGFR (Engelman et al., 2007; Stommel et al., 2007). Les thérapies nouvelles doivent donc s'attacher à cibler plusieurs voies de signalisation des CSCs, permettant à la fois d'affaiblir le système tumoral et de booster le système immunitaire.

Cependant, la mise en place d'une thérapie agressive pour éliminer ces CSCs nécessite l'identification de marqueurs de ces cellules afin de pouvoir i) les isoler et cibler de façon très sélective, en épargnant les cellules du tissu sain environnant, et ii) caractériser l'état physiologique et évaluer l'efficacité d'un traitement sur la physiologie de ces cellules. Jusqu'à aujourd'hui, différentes équipes ont cherché à identifier de tels marqueurs mais aucun ne s'est révélé être spécifique des gCSCs (Patru et al., 2010).

D'autre part, la signalisation calcique est modifiée dans les cellules tumorales ; le signal calcium contrôle de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la



différenciation, la mort cellulaire, la migration, le métabolisme,... à travers sa traduction en événements biochimiques par des protéines senseurs du signal calcium (Haiech et al., 2011). Parmi les senseurs calciques, la Calmoduline (CaM) joue un rôle central et sa perturbation par des molécules chimiques permet de générer un signal calcium en absence de stimulus extérieur ; ce signal constitue une empreinte caractéristique de l'appareillage moléculaire responsable de la signalisation calcique (calcisomes) d'une cellule dans un état physiologique donné (Dagher et al., 2009).

L'objectif de ce travail a été de déterminer des biomarqueurs des gCSCs permettant de cibler ces cellules et de caractériser leur état physiologique. Pour cela, le travail a été organisé sur deux axes principaux :

- L'identification et la caractérisation d'antagonistes de CaM permettant de générer une signature calcique spécifique des gCSCs
- L'identification de protéines exprimées exclusivement ou surexprimées à la surface des gCSCs

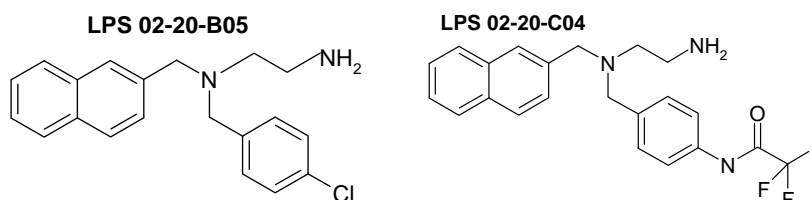
Dans une première partie, nous avons recherché des petites molécules chimiques capables d'interagir différemment avec CaM à travers un criblage de chimiothèques par anisotropie de fluorescence. Les molécules sélectionnées ont ensuite été caractérisées par des études préliminaires chimiques, de thermodynamique de liaison à CaM, de disponibilité biologique et de pertinence d'utilisation biologique. Une caractérisation plus approfondie a ensuite été réalisée afin d'identifier les protéines dont la liaison à CaM est préférentiellement inhibée pour chacune de ces molécules. En parallèle, nous avons caractérisé la perturbation de l'homéostasie calcique induite suite à l'ajout des antagonistes sur plusieurs types cellulaires que nous avons comparés à des cellules primaires propagatrices de glioblastome.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence dans un premier temps

- La diversité chimique des molécules capables d'interagir avec CaM

- L'interaction préférentielle de CaM avec certaines cibles intracellulaires (représentées par des peptides d'une vingtaine d'acide aminés) selon  $[Ca^{2+}]$
- La capacité des antagonistes de CaM à inhiber la liaison de CaM à ses cibles
- L'inhibition de la liaison de CaM à ses cibles dépendent à la fois de la famille chimique de l'antagoniste (groupes A1, A2, A3) utilisé et de la quantité minimale (1, 2, 3, 4) de  $Ca^{2+}$  nécessaire à la liaison de CaM à ses cibles (groupes P1, P2) : les antagonistes A1 inhibent préférentiellement les peptides P1 interagissant avec CaM liée à 2 ou 3  $Ca^{2+}$  tandis que les antagonistes A2 inhibent les peptides P2 interagissant avec CaM liée à 1 ou 2  $Ca^{2+}$
- La capacité des antagonistes de CaM à générer des signaux calciques différents et parfois dépendants du type cellulaire
- La spécificité d'interaction de la majorité des antagonistes avec CaM dans la cellule

En combinant l'ensemble de ces résultats, nous avons dans un deuxième temps pu mettre en évidence que les antagonistes du groupe A1 peuvent être considérés comme des marqueurs de calcisomes communs alors que les antagonistes du groupe A2 peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'un ou plusieurs type(s) cellulaire(s). Parmi ces antagonistes, la molécule **LPS 02-20-L-B05**, et dans une moindre mesure la molécule **LPS 02-20-L-C04** se comportent différemment dans les cellules de gCSCs par rapport aux cellules HEK et U-87 MG : ces molécules sont de bons candidats en tant que biomarqueurs de l'état physiologique des gCSCs. De façon surprenante, ces deux molécules ont été classées dans le groupe A1, marqueurs des calcisomes communs. Ceci suggère que soit ces molécules interagissent avec une protéine spécifiquement exprimée dans ces cellules, dépendante ou indépendante de CaM, soit l'expression / l'activité d'un calcisome commun est dérégulée, reflétant une modification profonde de la signalisation calcique de ces cellules.



**Figure 74 : Structure des composés LPS 02-20-L-B05 et LPS 02-20-L-C04**

Ces 2 composés appartiennent à la famille des éthylène diamine N,N disubstitués dont la plateforme chimique est représentée en noire ; le cycle aromatique bleu est également commun à l'ensemble des molécules de cette famille.

Dans une seconde partie, nous nous sommes attachés à caractériser de façon différentielle le protéome membranaire de gCSCs. Nous avons pu mettre en évidence plusieurs protéines exprimées spécifiquement ou surexprimées dans les cellules TG01, principalement impliquées dans la migration et l'adhésion cellulaires, l'angiogenèse, l'homéostasie cellulaire et des voies de signalisation intracellulaires. Nous avons identifié des protéines surexprimées communément dans les cellules TG10 et NSC d'une part et TG01 et U-87 MG d'autre part, reflétant les propriétés partagées des gCSCs avec les NSC et les cellules de la masse tumorale.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à deux ensembles de protéines : les clusters de différenciation (CD) et les protéines impliquées dans la signalisation calcique. Cette analyse a permis d'identifier des protéines exprimées à la fois dans les cellules TG10 et U-87 MG et déjà corrélées dans la littérature avec un phénotype agressif de glioblastome ; il s'agit des intégrines  $\alpha_5$ ,  $\beta_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , du récepteur PDGFR $\beta$ , des protéines S100A10 et S100A11. D'autres protéines ont été identifiées de façon spécifique dans les cellules TG01 :

- **CD109**, impliquée dans l'inhibition de la signalisation de TGF $\beta$  et dont l'expression est dérégulée dans de nombreux cancers
- **CD205**, dont le rôle peut être ambivalent mais dont une surexpression impliquée dans la formation de métastases a été rapportée dans le cancer de l'ovaire
- L'**intégrine  $\beta_4$** , impliquée dans l'activation des voies de signalisation angiogéniques et tumorigéniques PI3K-AKT-mTOR, ras-ERK, NFAT ; la surexpression de cette protéine est cependant moins importante que pour les deux précédentes
- **S100A6** et **S100A13**, impliquées dans la migration cellulaire, exprimées dans les cellules de glioblastomes de haut grade et associées à la niche périvasculaire
- **S100A9**, décrit dans les tumeurs du sein de haut grade
- La **sous unité  $\alpha_2\delta-1$  des canaux calciques voltage dépendants**, impliquée dans la synaptogenèse et la plasticité cellulaire
- La pompe calcique **PMCA4** et la sous-expression de l'isoforme PMCA1. Cette distribution particulière est opposée à celle observée dans les cellules U-87 MG et d'autres cellules tumorales et met en évidence la biologie particulière des cellules TG01

Certaines de ces protéines ont été identifiées dans différents cancers, dont des glioblastomes, mais n'ont jamais été rapportées dans des CSCs ; d'autre part, la surexpression de ces protéines dans les cellules TG01 par rapport aux cellules U-87 MG présage de leur importance dans le processus tumoral et permet de proposer ces molécules en tant que biomarqueurs des gCSCs.

De plus, la combinaison des deux études rapportées dans ce travail, d'une part l'altération de l'expression de deux isoformes de la pompe calcique spécifiquement dans les cellules TG01 et d'autre part la caractérisation des antagonistes de CaM comme inhibiteurs spécifiques de la liaison de CaM à un sous ensemble de ses protéines cibles, permet de proposer la molécule **LPS 01-08-L-G06** comme biomarqueur de gCSCs.

Ce travail de thèse nous a permis de développer deux types de biomarqueurs des cellules souches cancéreuses, un biomarqueur fonctionnel caractéristique du système de gestion de l'homéostasie calcique d'une cellule et des biomarqueurs protéiques ciblant les protéines membranaires différenciellement exprimées dans les cellules cancéreuses de glioblastomes. La molécule LPS 02-20-L-B05 a été identifiée à partir de 4 types de gCSCs et peut donc être supposé assez fiable. Par contre, l'étude protéomique différentielle n'a été effectuée qu'avec un type de gCSCs ; l'étude de l'expression des marqueurs identifiés dans les cellules TG01 ainsi que dans d'autres types de CSCs par cytométrie en flux ou western blot devrait permettre leur confirmation / infirmation en tant que biomarqueurs des gCSCs.

Les biomarqueurs membranaires pourront être utilisés soit comme cibles thérapeutiques pour des agents chimiothérapeutiques soit dans le cadre d'une immunothérapie. En effet, le manque de réponse du système immunitaire face aux glioblastomes (le cerveau est un organe immunoprivilégié) a poussé au développement de méthodes permettant de stimuler le système immunitaire vis-à-vis d'antigènes spécifiques de ces glioblastomes. L'**immunothérapie passive** utilise des **anticorps** monoclonaux spécifiques des cellules tumorales bloquant la fonction d'un récepteur ou ayant une activité ADCC (antibody dependent cellular toxicity). Plusieurs anticorps ciblant l'EGFR ont été synthétisés, dont le Nimotuzumab ; ces anticorps

induisent l'internalisation du complexe formé ainsi qu'une cytotoxicité. Les études cliniques de phase I/II ont montré une augmentation de la survie des patients de 3 mois par rapport aux patients traités avec le protocole de référence seul (Ramos et al., 2006). Ces anticorps peuvent également être couplés à des molécules chimiques (ADCs : antibody-drug conjugates) permettant de cibler précisément la biodistribution des agents chimiothérapeutiques (Alley et al., 2010). Une deuxième stratégie, l'**immunothérapie adoptive** consiste à prélever des cellules immunitaires spécifiques de la tumeur, les amplifier *ex vivo* et les réintroduire dans l'organisme du patient. Cette stratégie a été utilisée avec des cellules LAK (lymphokine-activated killer) en tant que thérapie adjuvante dans le cas de glioblastomes nouvellement diagnostiqués dans une étude de phase II ; la médiane de survie des patients est passée à 20,5 mois (Dillman et al., 2009). Une troisième méthode, l'**immunothérapie active** spécifique ou **vaccination thérapeutique**, consiste à stimuler le système immunitaire envers les cellules tumorales et une réponse cellulaire cytotoxique ; cette réponse est induite via des antigènes des cellules tumorales présentés par les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) aux cellules effectrices du système immunitaire. Les cellules du système immunitaire peuvent être activées de 3 façons différentes : i) en rendant les cellules immunitaires plus agressives, ii) en rendant les cellules tumorales plus immunogènes, i.e. par l'expression de cytokines ou molécules de costimulation à proximité de l'antigène tumoral, iii) par des cellules présentatrices d'antigènes amplifiées et chargées avec l'antigène cible ; cette dernière stratégie a été approuvée par la FDA dans le cas du cancer de la prostate en avril 2010 (Thara et al., 2011). Enfin, une autre stratégie consiste à générer des **cellules dendritiques** (DC, cellule présentatrice d'antigènes) *in vitro*, à les activer par exposition avec des peptides tumoraux (antigènes synthétiques ou présents dans un lysat de cellules tumorales, cellules tumorales irradiées, mRNAs tumoraux, ...) et induire leur maturation par des cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , PGE2, IFN $\gamma$ ) avant de les injecter en intradermique (Xu et al., 2012); les DCs sont alors capables d'induire une forte réponse immunitaire intracrânienne (Yu et al., 2001) permettant de diminuer la quantité de TNF $\beta$  intratumorale et d'augmenter la survie des patients dans des essais cliniques de phase I, I/II ou II (Fadul et al., 2011; Liau et al., 2005).

Les biomarqueurs de la signalisation calcique, et notamment LPS 02-20-L-B05, peuvent être utilisés pour définir une signature des gCSCs ; cette approche peut être abordée pour déterminer l'effet d'un agent chimiothérapeutique sur la physiologie de ce type de cellules.

Nous avons également postulé que l'utilisation de ces molécules pouvait avoir un effet thérapeutique. En effet, l'utilisation d'antagonistes de CaM a été approuvée pour le traitement de certaines pathologies, principalement psychiatriques. Aujourd'hui, de rares équipes de recherche montrent les bénéfices de l'utilisation d'antagonistes de CaM dans le traitement de certaines tumeurs. Ces antagonistes sont principalement utilisés conjointement avec un agent chimiothérapeutique plus classique et permettent de sensibiliser les cellules à des traitements peut actifs, notamment du fait de leur toxicité sur les tissus sains environnants (Aloy et al., 2008; Beier et al., 2008; Bilir et al., 2008). L'étape suivante de ce travail effectué pour identifier des biomarqueurs de la signalisation calcique sera de tester et de caractériser les effets de ces molécules en synergie avec le Témazolomide ou d'autres agents chimiothérapeutiques.

L'ensemble de ce travail a permis d'identifier des biomarqueurs des gCSCs et de mettre en évidence l'utilisation de petites molécules comme outils de recherche ou comme potentiels agents thérapeutiques. Ceci nous également permis de mettre en évidence les effets très différents que peuvent avoir plusieurs antagonistes d'une même protéine et de considérer la Calmoduline comme une cible thérapeutique à part entière. Enfin, l'étude du protéome membranaire nous a permis de mettre en évidence plusieurs processus biologiques altérés dans les gCSCs, de façon spécifique ou conjointement avec les NSC ou cellules différenciées de la masse tumorale ; ceci souligne les propriétés que partagent les gCSCs à la fois avec les NSC et les cellules tumorales.

## **Matériel et Méthodes**

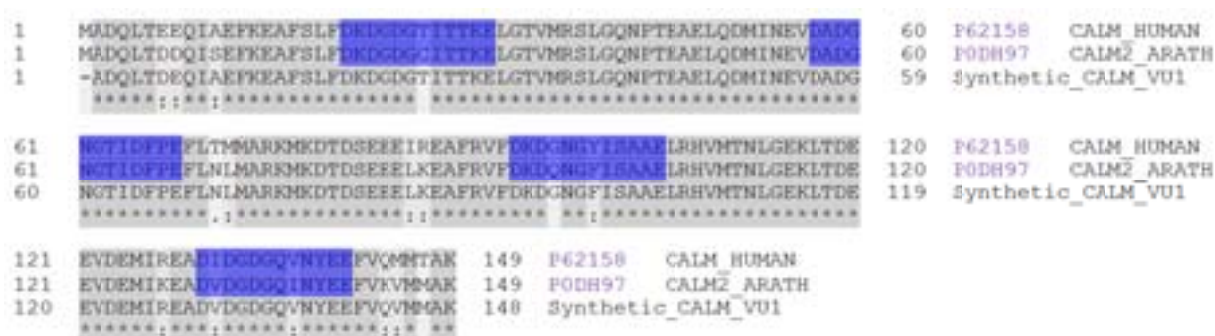
## I. Matériels

### 1. Composants chimiques

Les produits chimiques commerciaux ont été utilisés sans aucune purification ultérieure. DMSO, KCl, Hepes, Tris, MOPS, MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, EGTA, NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, glucose et digitonine ont été achetés chez Sigma, les tampons calciques de calibration ont été achetés chez Invitrogen et l'Indo1-AM chez FluoProbes. Les solutions aqueuses ont été réalisées avec de l'eau ultrapure (Milli-Q).

### 2. Protéines, Peptides et Sondes

Les essais ont été réalisés avec la Calmoduline humaine (CaM) ou la Calmoduline synthétique (SynCaM ou VU1) de chez ProtEra. SynCaM est une protéine hybride entre les CaM humaine et végétale, utilisée pour caractériser la liaison des molécules chimiques à CaM (Roberts et al., 1985).



**Figure 75 : Alignement des séquences de la Calmoduline.**

Alignement des séquences de la Calmoduline humaine, de la Calmoduline d'Arabidopsis thaliana et de la Calmoduline synthétique (VU1), protéine hybride entre les 2 précédentes. Les divergences de séquences sont surlignées en gris clair, les motifs de liaison de Ca<sup>2+</sup> sont en bleu.

Les peptides synthétiques sont marqués en N terminal par la carboxytetramethylrhodamine (Schafer-N, Copenhagen) (Annexe III).



### 3. Chimiothèques

#### 3.1. Strasbourg

Cette chimiothèque appartient à la plateforme de chimie et biologie intégrative de Strasbourg (PCBIS) et est référencée dans la Chimiothèque Nationale du CNRS (<http://chimiotheque-nationale.enscm.fr/>). La chimiothèque de Strasbourg comprend plus de 5300 composés conservés dans des plaques 96 puits à 10 mM dans du DMSO ; la pureté des composés est de plus de 80 % (caractérisation par LC-MS). Cette chimiothèque est labélisée ISO 9001:2000 depuis 2007.

#### 3.2. Prestwick

Cette chimiothèque contient 1120 molécules dont 90 % sont des médicaments et 10 % des alcaloïdes bioactifs ; ces molécules présentent soit déjà ou très proches d'une forme médicamenteuse. Les composés ont été sélectionnés d'après leur diversité chimique et pharmacologique ainsi que pour leur distribution et absence de toxicité chez l'homme.

#### 3.3. Composés commerciaux

Les composés commerciaux Trifluoperazine, Fluphenazine, Clorpromazine, Calmidazolium et Bifonazole ont été commandés chez Sigma ; W7, W5, W12 et W13 chez Calbiochem.

## II. Méthodes

### 1. Mesures spectroscopiques

Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Nanodrop (Thermo Scientific). La concentration protéique des échantillons est mesurée à 280 nm avec des coefficients d'extinction molaire de  $1\ 500\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  et  $2\ 560\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  pour SynCaM et la CaM humaine respectivement. La concentration des peptides et des sondes est mesurée avec des coefficients d'extinction molaire de  $103\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  à 565 nm.

## 2. Mesures de polarisation de fluorescence (FP)

Le degré de polarisation est défini par l'équation  $FP = (I_{//} - I_{\perp}) / (I_{//} + I_{\perp})$  avec  $I_{//}$  et  $I_{\perp}$  les intensités de fluorescence des émissions polarisées verticalement ( $//$ ) et horizontalement ( $\perp$ ) lorsque l'échantillon est excité par une lumière polarisée verticalement (Annexe I).

Les mesures de polarisation de fluorescence sont effectuées sur un appareil Victor3 (Perkin Elmer et Analytical Sciences, Boston, MA) avec une longueur d'onde d'excitation de 530 nm (bande passante 7 nm) et une longueur d'onde d'émission de 610 nm (bande passante 10 nm).

## 3. Titration des sondes fluorescentes sur CaM à différentes concentrations calciques

Les tampons calciques (0 nM – 1,35  $\mu$ M) sont préparés à partir des solutions CaEGTA et  $K_2$ EGTA ; la concentration calcique finale est déterminée par

$$[Ca^{2+}] = K_d^{EGTA} \frac{[CaEGTA]}{[K_2EGTA]}$$

Avec  $K_d^{EGTA}$  la constante de dissociation de l'EGTA et du  $Ca^{2+}$ , et  $[CaEGTA] / [K_2EGTA]$  le ratio des deux solutions mères à 10 mM.

Les sondes fluorescentes sont préparées dans les différents tampons calciques à 0,2  $\mu$ M. SynCaM est préparée dans le tampon d'essai (30 mM MOPS, 100 mM KCl, pH 7,2) à 20  $\mu$ M puis diluée robotiquement (BiomeK 2000) en cascade (0,16 – 20  $\mu$ M) dans chaque tampon calcique.

L'essai est réalisé en ajoutant robotiquement dans une plaque 96 puits 15  $\mu$ l de sonde et 15  $\mu$ l de SynCaM dilués dans le même tampon calcique. La plaque est mélangée et incubée 5 min à température ambiante. La constante d'équilibre ( $K_d$ ) de la liaison de chaque sonde à SynCaM ( $FP = f([SynCaM])$ ) dans chaque tampon calcique est calculée en utilisant le complément Solver de Microsoft Excel d'après l'équation décrite au Chapitre 2, point II-1.

#### 4. Identification de molécules interagissant avec CaM par essai FP compétitif

Les chimiothèques sont criblées en ajoutant robotiquement (BiomeK 2000) dans une plaque 96 puits (Corning Costar 3686, noire à fond plat) 15 µl de composé à 20 µM dilué dans du tampon d'essai (50 mM Hepes, 150 mM KCl, 10 µM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.5) et 15 µl du mélange SynCaM à 4 µM – sonde fluorescente à 0,2 µM diluées dans le même tampon. La plaque est mélangée et incubée 5 min à température ambiante. L'équilibre entre la sonde liée et la sonde libre est mesuré pour chaque puits par polarisation de fluorescence.

#### 5. Facteur Z'

La qualité de l'essai de criblage haut débit est évaluée par le facteur Z' calculé selon :

$$Z' = 1 - \frac{3SD_{bound} + 3SD_{free}}{mFP_{bound} - mFP_{free}}$$

avec SD l'écart type de l'ensemble des valeurs et mFP les valeurs de polarisation de fluorescence exprimées par 1000 x FP. L'état « bound » représente la sonde liée à SynCaM et l'état « free » représente la sonde non liée

#### 6. Titration de molécules chimiques sur SynCaM par FP compétitif avec les sondes fluorescentes

Dans une plaque 96 puits (Corning Costar 3686, noire à fond plat) et dans un volume de 30 µl, les composés (concentrations finales 0,5 – 500 µM) sont ajoutés robotiquement (BiomeK 2000) au mélange SynCaM (2 µM) – Sonde fluorescente (0,2 µM) dans le tampon d'essai (50 mM Hepes, 150 mM KCl, 100 µM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,5) ; les concentrations finales de DMSO n'excèdent pas 1 %. La plaque est mélangée et incubée 5 min à température ambiante. L'équilibre entre la sonde liée et la sonde libre est mesuré pour chaque puits par polarisation de fluorescence.

Les paramètres à l'équilibre sont déterminés par la courbe FP = f([composé]) en utilisant le complément Solver de Microsoft Excel et le modèle compétitif décrit par (Roehrl et al., 2004).

## 7. Titration de peptides fluorescents sur CaM à différentes concentrations calciques

Les peptides fluorescents sont dilués robotiquement (BiomeK 2000, Beckman Coulter) dans les différents tampons calciques à 0,2  $\mu\text{M}$  dans une plaque 96 puits (Corning Costar 3686, Acton, MA). CaM est préparée dans le tampon d'essai (30 mM MOPS, 100 mM KCl, pH 7,2) à 20  $\mu\text{M}$  puis diluée en cascade (0,02 – 20  $\mu\text{M}$ ) dans chaque tampon calcique.

L'essai est réalisé en ajoutant robotiquement dans une plaque 96 puits 7,5  $\mu\text{l}$  de peptide et 7,5  $\mu\text{l}$  de CaM dilués dans le même tampon calcique. La plaque est mélangée et incubée 5 min à température ambiante. Les résultats sont traités de la même façon qu'au point II-3.

## 8. Déplacement des peptides fluorescents par les molécules chimiques par essai FP compétitif

Les peptides et CaM sont mélangés à des concentrations respectives de 0,2  $\mu\text{M}$  et 2  $\mu\text{M}$  dans le tampon d'essai (30 mM MOPS, 100 mM KCl, 100  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ , pH 7,2) et distribués robotiquement (BiomeK 2000) dans une plaque 96 puits (Corning Costar 3686, Acton, MA). Les molécules chimiques sont préparées dans le même tampon et diluées en cascade de 2000 à 0,02  $\mu\text{M}$ .

L'essai est réalisé en ajoutant robotiquement dans une plaque 96 puits 7,5  $\mu\text{l}$  de composé dans chaque puits contenant 7,5  $\mu\text{l}$  du mélange peptide – CaM. La plaque est mélangée et incubée 5 min à température ambiante. L'équilibre entre la sonde liée et la sonde libre est mesuré pour chaque puits par polarisation de fluorescence et la concentration pour laquelle 50 % des peptides sont déplacés ( $\text{IC}_{50}$ ) pour chaque molécule est en utilisant le complément Solver de Microsoft Excel d'après l'équation suivante :

$$FP = \frac{FP_0 + FP_{min} \times \left(\frac{1}{\text{IC}_{50}} \times [\text{composé}]\right)^n}{\left(\frac{1}{\text{IC}_{50}} \times [\text{composé}]\right)^n}$$

Avec, pour chaque couple peptide – composé,  $FP_0$  la valeur FP sans composé,  $FP_{min}$  la valeur FP obtenue pour 100 % de déplacement du peptide, n le nombre de Hill.

## 9. Titration microcalorimétrique isothermique de composés sur SynCaM

Les mesures sont effectuées à 25 °C dans le tampon d'expérimentation (0 mM Hepes, 150 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub> à pH 7,5) sous agitation (300 rpm) continue avec un calorimètre de titration VP-ITC. Les solutions sont dégazées par un barreau magnétique sous vide avant utilisation.

La cellule est chargée avec 1,4 ml SynCaM diluée dans la solution tampon à 10 µM pour les composés LPS 02-10-L-C08, LPS 02-20-L-A02, LPS 05-01-L-D06 ou 30 µM pour les composés LPS 01-18-L-E03, LPS 01-18-L-E04 ; la cellule de référence contient de l'eau distillée. Les titrations sont réalisées avec une seringue de 300 µl contenant l'un des composés dilué dans la solution tampon à 1 mM pour LPS 02-20-L-A02, LPS 05-01-L-D06 ou 0,5 mM pour LPS 01-18-L-E03, LPS 01-18-L-E04, LPS 02-10-L-C08. Chaque titration consiste en 60 injections consécutives de 3 µl pendant 5,1 sec et avec un intervalle de 3 min entre chaque injection ; l'effet de la dilution est mesuré en injectant les composés dans la solution tampon sans protéine.

La variation enthalpique de chaque injection est calculée en intégrant l'aire sous la courbe aux temps correspondants et dont les valeurs dues à l'effet de dilution sont soustraites. Les données sont analysées avec le logiciel MicroCal Origin. Les valeurs des variations enthalpique, entropique, de K<sub>d</sub>, de stoechiométrie sont dérivées de l'analyse des données.

La deuxième série de mesure est réalisée par Philippe Tsekov dans une solution tampon contenant 50mM Hepes, 2 mM CaCl<sub>2</sub> à pH 7,5, 25 °C avec 15 µM de SynCaM et 150 – 500 µM de composés.

## 10. Mesure de l'index d'hydrophobicité de molécules par chromatographie (CHI)

Ces mesures ont été effectuées par la plateforme TechMed<sup>ILL</sup>.

Brièvement, chaque composé est préparé précisément à 10 mM dans du DMSO et dilué au 1/50, en duplicata, dans NH<sub>4</sub><sup>+</sup>CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup> / CH<sub>3</sub>CN (3/2 v/v). Une solution de standardisation contenant 10 molécules de CHI connus est préparée dans le même tampon à 0,1 mg/ml pour chaque molécule. Les échantillons et les standards sont injectés en HPLC (Gilson) et les

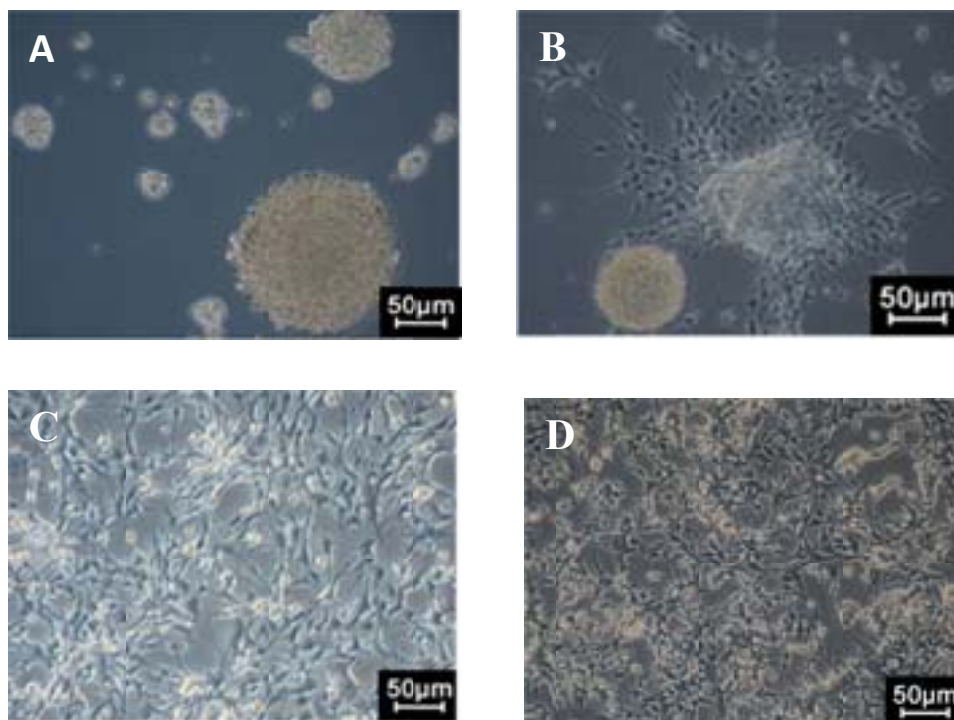
colonnes de chromatographie (Luna C18(2) 100 A 50x46 mm) sont réalisées en phase inverse à température ambiante ; les composés sont détectés à 254 et 230 nm.

La phase stationnaire (solvant A) est de l'acétate d'ammonium 50 mM pH 7,4 ; la phase mobile organique (solvant B) est de l'acétonitrile. Les injections sont de 5  $\mu$ l à 2 ml/min comme suit :

- 0 – 0,2 min : solvant A 100 % - solvant B 0 %
- 2,7 – 3,2 min: solvant A 0 % - solvant B 100 %
- 3,4 – 6,1 min: solvant A 100 % - solvant B 0 %

Les temps de rétention ( $t_R$ ) pour les molécules standard sont utilisés pour tracer la droite de calibration  $CHI = f(t_R) + t_{R0}$ ; la pente de la droite est déterminée par régression linéaire et les valeurs CHI des échantillons sont déterminées d'après l'équation de cette droite.

## 11. Culture cellulaire



**Figure 76 : Cellules en culture.**

**A :** Cellules TG01, **B :** Cellules NSC, **C :** Cellules U-87 MG, **D :** Cellules HEK. Les cellules sont cultivées dans leurs milieux respectifs dans un incubateur à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % humidité.

### **11.1. Cellules TG**

Les cellules TG sont dérivées de gCSCs isolées par l'équipe du Pr H. Chneiweiss (Hôpital Ste Anne et Centre Broca Paris, CNRS) à partir de biopsies de glioblastomes ; plus de 10 types de cellules primaires, chacune provenant d'un patient différent, ont été obtenues parmi lesquelles les cellules TG01, TG10, TG16 et OB1.

Les cellules sont cultivées en suspension dans du milieu NS34 (Dubelcco's Modified Eagle Medium:F12 1:1, glucose 0.6 %, GlutaMAX-I 2 mM, Hepes buffer 5 mM, Sodium bicarbonate 0.1 %, pénicilline 1 U/mL, streptomycine 1 µg/mL, N-2 supplément 1X, G-5 supplément 1X, B-27 supplément 0.5X ; les composants sont achetés chez Invitrogen) dans une atmosphère à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % humidité. Le temps de doublement des cellules est de 3 à 4 jours mais celui-ci peut être plus long lorsque les cellules s'agglutinent en neurosphères.

Le milieu est changé tous les 3 à 4 jours et est accompagné d'une dissociation mécanique des neurosphères (100 aller-retour avec une pipette P1000) ; les cellules sont réensemencées avec 10 % de milieu conditionné et 90 % de milieu frais à  $2,5 \cdot 10^6$  cellules par flasque T75.

### **11.2. Cellules NSC**

Les cellules souches neurales primaires sont obtenues à partir de cellules souches neurales fœtales isolées par l'équipe de M.P. Junier (Hôpital Ste Anne Paris V, CNRS INSERM).

Les cellules sont cultivées en semi-adhérence sous forme de neurosphères dans le milieu « murine NSC basal medium » (Neurocult, StemCell) supplémenté par des suppléments de prolifération (Neurocult, StemCell), 10 ng/ml bFGF recombinant humain, 20 ng/ml EGF humain dans une atmosphère à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % humidité. Le temps de génération de ces cellules est de 10 jours environ.

Les cellules sont dissociées mécaniquement (100 aller-retour avec une pipette P1000) 1 fois par semaine et réensemencées dans 10 % de milieu conditionné et 90 % de milieu frais à  $2,5 \cdot 10^6$  cellules par flasque T75.

### **11.3. Cellules U-87 MG**

La lignée U-87 MG (ATCC HTB14) est dérivée d'un astrocytome humain de grade IV d'après la classification 2007 de l'OMS.

Les cellules croissent en adhérence et sont cultivées dans le « Eagle's Minimal Essential Medium » supplémenté par 10 % sérum de veau fœtal, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine (composants achetés chez Invitrogen) dans une atmosphère à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % humidité.

Les cellules sont divisées tous les 3 à 4 jours lorsqu'elles atteignent une confluence de 80 % environ. Les cellules sont détachées du support avec de la Trypsine / EDTA (Invitrogen) et réensemencées au tiers dans du milieu frais.

### **11.4. Cellules HEK**

La lignée cellulaire HEK293 est dérivée de cellules embryonnaires de rein humaines ; la lignée a été générée par la transformation de cellules primaires par l'adénovirus 5 DNA.

Les cellules croissent en adhérence et sont cultivées dans le « Minimal Essential Medium » supplémenté par 10 % sérum de veau fœtal, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine (composants achetés chez Invitrogen) dans une atmosphère à 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 100 % humidité.

Les cellules sont divisées tous les 3 à 4 jours lorsqu'elles atteignent une confluence de 80 % environ. Les cellules sont détachées du support avec de la Trypsine / EDTA (Invitrogen) et réensemencées au quart dans du milieu frais.

## **12. Essai de viabilité cellulaire**

Les cellules sont ensemencées dans une plaque 96 puits (Greiner 655090) à une densité de  $3 \cdot 10^4$  cellules pour TG01 ou  $5 \cdot 10^4$  cellules pour HEK dans 100 µl de milieu. Les cellules sont incubées avec chaque composé à différentes concentrations (1 – 500 µM) pendant 24h. La viabilité cellulaire à 24h est déterminée par le kit luminescent « Cell Titer Glo » (Promega) selon le protocole fourni. La luminescence est enregistrée sur un appareil Victor et les courbes de titration sont analysées avec le complément Solver de Microsoft Excel d'après cette équation :



$$S = \frac{S_0 + S_1 \left( \frac{1}{EC_{50}} \times [compound] \right)^n}{1 + \left( \frac{1}{EC_{50}} \times [compound] \right)^n}$$

Avec S le signal enregistré, S<sub>0</sub> le signal sans composé, S<sub>1</sub> le signal obtenu pour l'effet maximal, EC<sub>50</sub> la concentration pour laquelle on obtient 50 % de l'effet maximal, n le nombre de Hill.

### 13. Mesures du calcium cytosolique

Deux jours avant l'expérimentation, les cellules sontensemencées dans une flasque T75 de façon ce qu'elles arrivent à 80 % de confluence 2 jours plus tard. Le jour de l'expérimentation, les cellules sont lavées au PBS et incubées 45 min dans le noir à 37 °C avec 5 µM Indo1-AM dans le tampon d'expérimentation (NaCl 137,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM, KCl 6 mM, Glucose 5,6 mM, Hepes 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM, pH 7,2). Les cellules sont ensuite rincées au PBS, resuspendues dans le tampon d'expérimentation etensemencées à 5.10<sup>4</sup> cellules, 37,5 µl dans une plaque 384 puits (Greiner 781091) ; la plaque est centrifugée 5 min à 800 rpm. En parallèle, les molécules chimiques sont diluées en cascade (8 µM – 2 mM) dans le tampon d'expérimentation et 60 µl sont déposées dans une plaque 384 puits (Greiner 784201) ; la digitonine (500 µM), l'EGTA (10 mM) et CaCl<sub>2</sub> (25 mM) sont dilués dans le même tampon et distribués dans la même plaque.

Chaque essai est réalisé en triplicat et robotiquement (FlexStation, Molecular Devices) ; l'excitation est fixée à 385 nm, l'émission de la sonde Indo1 liée à Ca<sup>2+</sup> à 401 nm et de la sonde libre à 475 nm. Les lectures de fluorescence sont réalisées toutes les 5 secondes sur une durée de 12 min à 24 °C. À t = 35 sec, 12,5 µl de composés sont ajoutés sur les cellules et à t = 635 sec 12,5 µl de digitonine sont ajoutés. Les résultats sont analysés sous forme de ratio de valeurs obtenues à 401 et 475 nm ; S est ensuite converti en [Ca<sup>2+</sup>] et l'EC<sub>50</sub> de la modification de la concentration cytoplasmique en Ca<sup>2+</sup> est déterminée comme décrit au Chapitre 2, point V-1.1.

### 14. Extraction des membranes cellulaires (ghosts)

Les cellules contenues dans 4 flasques 225 sont lavées au PBS et avec du tampon de lyse (10 mM Hepes pH7.4, 2 mM EGTA, cocktail d'inhibiteur de protéases). La lyse des cellules s'effectue de façon mécanique dans du tampon de lyse (10 ml) par des allers-retours de la suspension cellulaire à travers une aiguille 22G montée sur une seringue de 25 ml toutes les 5 – 10 min jusqu'à la lyse de plus de 90 % des cellules. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (10 min, 3 000 rpm) et le surnageant est centrifugé 1h30 à 14 000 rpm. Les ghosts membranaires sont resuspendus dans 300 µl de tampon de lyse, dosés par Bradford et conservés à -20 °C.

### 15. Spectrométrie de masse

Cette analyse a été réalisée par la plateforme de Spectrométrie de Masse de Cronenbourg, Laboratoire de Spectrométrie de masse BioOrganique, UMR 7178.

Les échantillons sont concentrés au Speedvac jusqu'à obtenir un volume de 60 µl, dénaturés et déposés sur un gel 1D acrylamide (8 - 15 %) à migration lente ; le gel est ensuite fixé, coloré au bleu de Coomassie, les pistes sont découpées de façon systématique en bandes de 2 – 4 mm de largeur et déposées en plaque 96 puits. Les bandes sont trypsines, les peptides sont extraits du gel (solvant ACN/H<sub>2</sub>O/HCOOH) et évaporés (volume final 8 µl). Les échantillons (5 µl) sont ensuite injectés sur nanoUPLC couplée au spectromètre de masse ESI-Q-TOF Synapt ; les spectres de fragmentation des peptides sont comparés à ceux de la banque SwissProt et les protéines sont annotées selon GO (gene ontology). Le critère de validation de la présence d'une protéine est l'identification de 2 peptides de cette protéine avec un taux de faux positifs nul.

## **Annexes**

## I. Anisotropie de fluorescence

Les molécules fluorescentes absorbent les photons ayant une longueur d'onde particulière et émettent, dans un délai de quelques nanosecondes, à une autre longueur d'onde de plus faible énergie. Un champ électromagnétique (tel que la lumière) peut induire des oscillations par résonance des électrons d'un fluorophore. L'interaction entre la lumière et les électrons peut permettre à une paire d'électrons de passer d'une orbitale  $S_0$  stable à un **état d'excitation** de plus grande énergie (orbitale  $S_1$ ). La capacité d'un fluorophore à absorber une longueur d'onde particulière (photon d'énergie donnée) est reliée à la capacité de chaque électron à entrer dans un état excité ; cette valeur est définie expérimentalement par le coefficient d'extinction molaire (ou coefficient d'absorption molaire)  $\epsilon$  d'une molécule à une longueur d'onde donnée. Un électron dans un état excité perd rapidement de l'énergie par relaxation vibratoire entre états excités de haute énergie ; l'électron revient alors à un état de plus faible énergie avec une **émission de photon** (de plus faible énergie que le photon absorbé initialement). Cette différence d'énergie entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission est connue sous le nom de «**shift de Sokes** ».

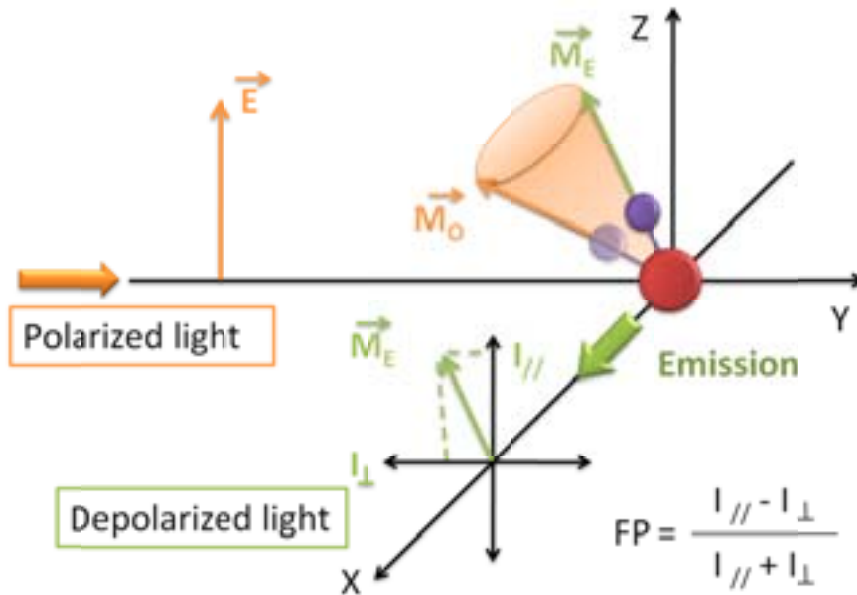
En 1946, Förster exploita cette théorie quantitative basée sur le transfert non radioactif d'énergie d'excitation entre 2 fluorophores, basée sur l'interaction électrostatique de 2 dipôles (donneur et accepteur) géographiquement proches (1 – 10 nm), distance caractéristique d'interaction de molécules biologiques (Förster, 1946). Le transfert d'énergie de résonance de Förster (**FRET**) est aujourd'hui utilisé dans de nombreux laboratoires pour mettre en évidence l'interaction de cibles moléculaires (Erickson et al., 2001; Erickson et al., 2003; Truong and Ikura, 2001). Une variante de FRET, **homoFRET**, se réfère au transfert d'énergie entre 2 mêmes fluorophores dont les spectres d'émission et d'excitation se superposent ; cette technique est notamment utilisée pour identifier des états d'oligomérisation d'une protéine (Gautier et al., 2001). L'homoFRET a également été utilisé pour mesurer la liaison d'une protéine marquée à une cible quelconque dans la cellule : la perte d'anisotropie (i.e. perte de polarisation) d'émission lorsque le fluorophore est excité avec une lumière polarisée reflète la modification des propriétés hydrodynamiques de la protéine marquée.

Dans une population de fluorophores orientés aléatoirement et excités par une lumière polarisée, les molécules orientées parallèlement à l'axe de polarisation sont préférentiellement

excitées. Les photons émis par les fluorophores excités sont ensuite mesurés à travers 2 filtres polarisés, un parallèle ( $I_{//}$ ) et l'autre perpendiculaire ( $I_{\perp}$ ) à l'excitation de polarisation (Figure 77). Les valeurs de **polarisation de fluorescence** (FP) ou d'**anisotropie d'émission** additives (A), sont déterminées par la mesure du degré d'orientation du fluorophore :

$$FP = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}} \quad A = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}} \quad \text{soit} \quad FP = \frac{3A - 2}{A}$$

Dans le cas où le fluorophore change d'orientation entre les moments d'excitation et d'émission, la lumière est alors dépolarisée et la valeur de A diminue.

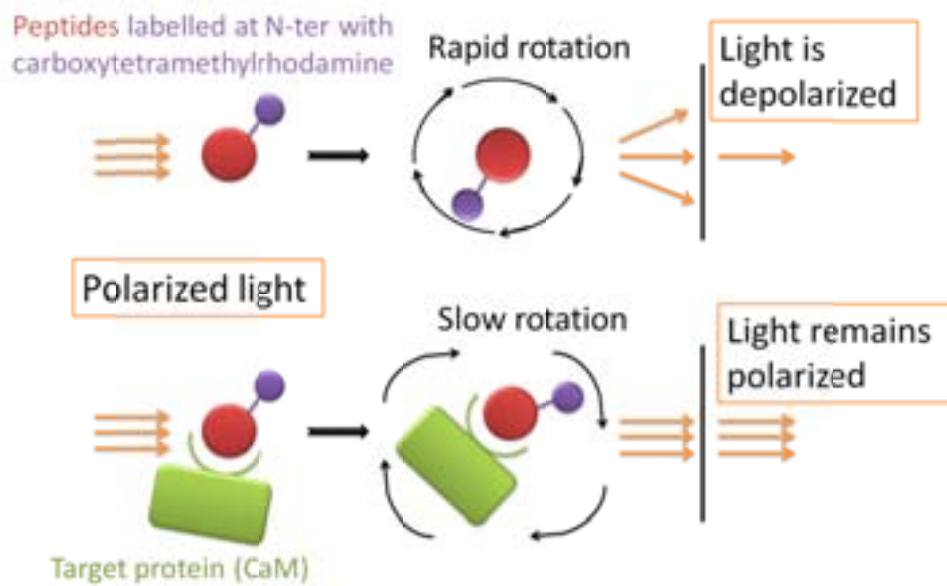


**Figure 77 : Principe de mesure d'anisotropie ou de polarisation de fluorescence.**

Le fluorophore est excité avec une lumière polarisée de direction (champ électrique)  $\vec{E}$ . La quantité de dépolarisation entre l'excitation et l'émission de fluorescence est mesurée par la détection des intensités de fluorescences parallèle ( $I_{//}$ ) et perpendiculaire ( $I_{\perp}$ ) à la direction de l'excitation.

La polarisation de fluorescence est utilisée pour mesurer le **changement de taille apparente** d'une molécule marquée (Checovich et al., 1995). Lorsqu'une petite molécule fluorescente est excitée avec une lumière polarisée, la lumière émise est largement dépolarisée du fait de la rotation rapide de cette molécule en solution entre le moment d'excitation et d'émission de la fluorescence. Dans le cas où cette même molécule est liée à un récepteur, le volume moléculaire apparent de la petite molécule augmente et sa vitesse de rotation est considérablement réduite ; par conséquent, la direction d'émission de la fluorescence est la même que celle d'excitation (Figure 78). Les états libre et lié d'une petite molécule

fluorescente ont donc chacun une valeur intrinsèque de polarisation de fluorescence, respectivement  $FP_{free}$  et  $FP_{bound}$ . La mesure de polarisation d'un mélange de molécules liées et libres est donc une moyenne pondérée de ces 2 valeurs extrêmes : il n'y a pas besoin de purifier les molécules liées des non liées afin de pouvoir étudier un équilibre de liaison ; cette méthode est donc rapide, simple et précise. De plus, la mesure de FP étant ratiométrique, les résultats sont moins sensibles aux problèmes de quenching ou de fluorescence non directement liée à l'essai, comme cela peut être le cas dans les analyses de FRET classiques.

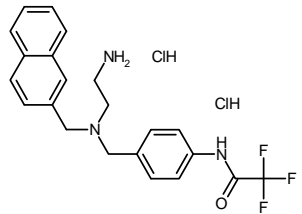
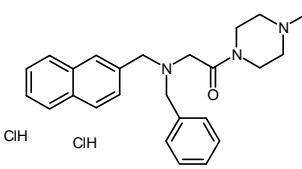
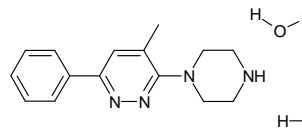
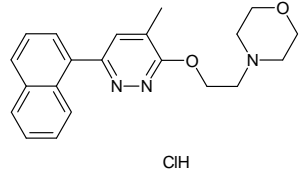
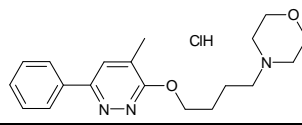
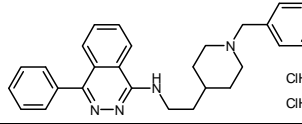
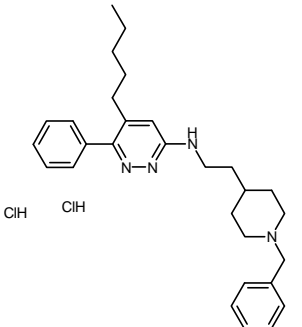


**Figure 78 : Principe de criblage à haut débit par mesure d'anisotropie de fluorescence.**

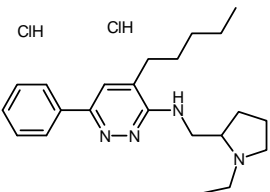
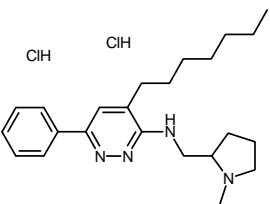
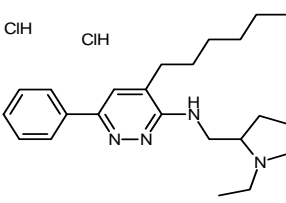
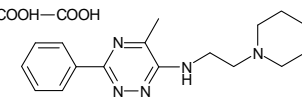
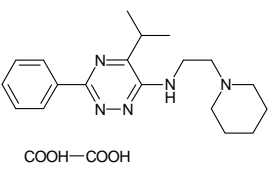
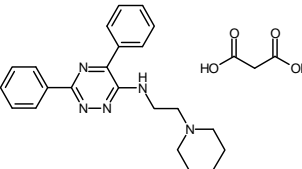
La vitesse de rotation d'une molécule est inversement proportionnelle à sa taille apparente. Un fluorophore lié à une petite molécule et excité par une lumière polarisée aura une rotation rapide et peut donc dépolariiser la lumière. Dans les mêmes conditions, un fluorophore lié à une structure plus importante (protéine) aura une vitesse de rotation plus lente et émettra une lumière peu dépolariisée.

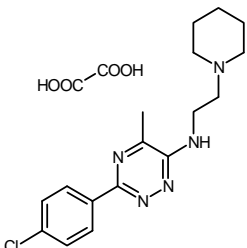
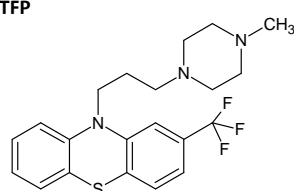
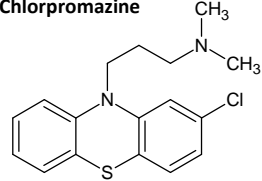
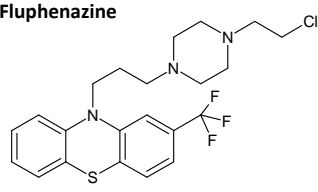
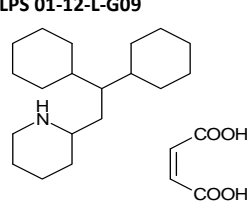
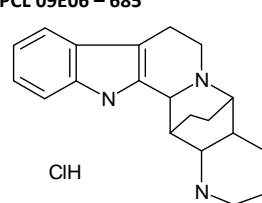
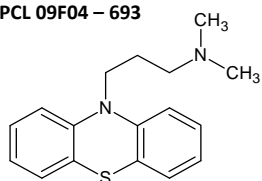
## II. Caractérisation des molécules interagissant avec la Calmoduline

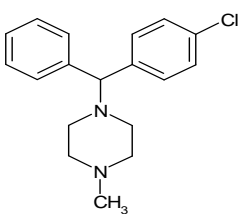
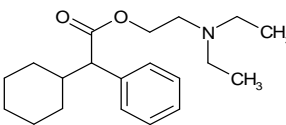
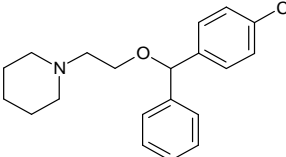
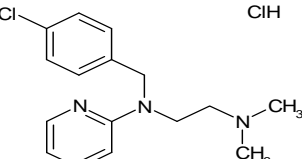
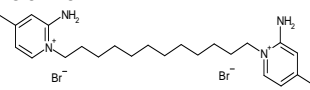
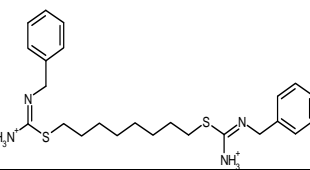
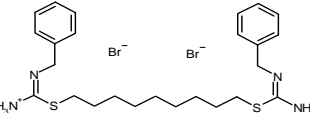
Famille chimique	Antagonistes	Compétition de liaison à CaM avec les sondes			Caractéristiques thermodynamiques de liaison à CaM							Disponibilité CHI	Induction de la mort cellulaire			
		Ki / S1 ( $\mu\text{M}$ )	Ki / S3 ( $\mu\text{M}$ )	ratio	nb sites	Ka <sub>1</sub> ( $\text{M}^{-1}$ )	Ka <sub>2</sub> ( $\text{M}^{-1}$ )	$\Delta\text{H}1$ (kcal $\text{M}^{-1}$ )	$\Delta\text{H}2$ (kcal $\text{M}^{-1}$ )	TAS 1 (kcal $\text{M}^{-1}$ )	TAS 2 (kcal $\text{M}^{-1}$ )		EC <sub>50</sub> HEK ( $\mu\text{M}$ )	nH HEK	EC <sub>50</sub> TG01 ( $\mu\text{M}$ )	nH TG01
Family I : Ethylene diamine N,N disubstituted	<b>LPS 02- 10-L-A02</b>  COOH-COOH	2,34 ± 0,04	6,00 ± 0	2,6	1	2,49E+05		-1,9		5,5		76,1	11,4	2,8	14,4	2,7
	<b>LPS 02-10-L-A07</b>  ClH ClH	0,72 ± 0,01	3,25 ± 0,07	4,5								84,7	5,7	7,2	7,5	11,0
	<b>LPS 02-10-L-C08</b>  BrH	3,26 ± 0,17	4,00 ± 0	1,2	2	5,20E+05	9,50E+06	3	1,7	9,6	11,2	62,4	14,5	2,4	18,9	4,3
	<b>LPS 02-10-L-C09</b>  COOH-COOH	2,75 ± 0,03	3,22 ± 0,08	1,2	1	1,24E+06		-5,8		2,5		79	8,4	5,8	7,6	3,3
	<b>LPS 02-10-L-D02</b>  COOH-COOH	2,80 ± 0,81	3,47 ± 0,25	1,2	1	2,03E+05		-2,5		4,7		76,6	10,1	6,3	9,9	2,6
	<b>LPS 02-20-L-B03</b>  ClH	1,27 ± 0,1	2,01 ± 0,02	1,6	1	1,09E+05		-15,4		-7,7		53,3				
	<b>LPS 02-20-L-B05</b>  ClH ClH	0,901 ± 0,004	1,654 ± 0,133	1,8								84,2	11,4	4,1	9,7	4,6

Familie chimique	Antagonistes	Compétition de liaison à CaM avec les sondes			Caractéristiques thermodynamiques de liaison à CaM							Disponibilité		Induction de la mort cellulaire			
		Ki / S1 ( $\mu\text{M}$ )	Ki / S3 ( $\mu\text{M}$ )	ratio	no sites	Ka <sub>1</sub> ( $\text{M}^{-1}$ )	Ka <sub>2</sub> ( $\text{M}^{-1}$ )	$\Delta\text{H1}$ (kcal $\text{M}^{-1}$ )	$\Delta\text{H2}$ (kcal $\text{M}^{-1}$ )	TAS 1 (kcal $\text{M}^{-1}$ )	TAS 2 (kcal $\text{M}^{-1}$ )	CHI	EC <sub>50</sub> HEK ( $\mu\text{M}$ )	nH HEK	EC <sub>50</sub> TG01 ( $\mu\text{M}$ )	nH TG01	
Family II: Amino alkyl pyridazine and triazine	<b>LPS 02-20-L-C04</b> 	4,04 ± 0,2	3,63 ± 0,13	0,9	1	1,91E+06		3,8		12,4		75,7	31,3	4,6	32,1	13,6	
	<b>LPS 02-30-L-F05</b> 	3,40 ± 0,01	3,81 ± 0,01	1,1	1	3,98E+05		-1,5		6,1		96,1	67,7	2,1	48,5	3,4	
Family II: Amino alkyl pyridazine and triazine	<b>LPS 01-02-L-B11</b> 	96 ± 2	106 ± 9	1,1								45,7					
	<b>LPS 01-02-L-D08</b> 	45 ± 2	43 ± 3	1,0								78,5					
	<b>LPS 01-05-L-B11</b> 	23,7 ± 0,04	16,5 ± 0,3	0,7	1	1,34E+05		-5,3		1,7		65,7					
	<b>LPS 01-15-L-H06</b> 	6,5 ± 0,3	6,6 ± 0,1	1,0	1	6,20E+05		-3,4		4,5		73,3	24,6	2,1	9,2	4,2	
	<b>LPS 01-17-L-E07</b> 	3,9 ± 0,2	4 ± 0,1	1,0								93,2	10,3	7,5	4,1	4,8	



Famille chimique	Antagonistes	Compétition de liaison à CaM avec les sondes			Caractéristiques thermodynamiques de liaison à CaM							Disponibilité		Induction de la mort cellulaire			
		Ki / S1 (μM)	Ki / S3 (μM)	ratio	nb sites	Ka <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> )	Ka <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> )	ΔH1 (kcal M <sup>-1</sup> )	ΔH2 (kcal M <sup>-1</sup> )	TΔS 1 (kcal M <sup>-1</sup> )	TΔS 2 (kcal M <sup>-1</sup> )	CHI	EC <sub>50</sub> HEK (μM)	nH HEK	EC <sub>50</sub> TG01 (μM)	nH TG01	
	<b>LPS 01-18-L-B10</b> 	4,8 ± 0,4	4,8 ± 0,4	1,0	1	7,56E+04		-9,4		-2,8		84,2	37,3	2,5	53,3	3,0	
	<b>LPS 01-18-L-C06</b> 	0,65 ± 0,05	0,74 ± 0,09	1,1								100,4	18,3	5,3	15,9	19,7	
	<b>LPS 01-18-L-D04</b> 	1,85 ± 0,01	1,92 ± 0,15	1,0	1	2,95E+05		6		13,5		91,8	19,0	3,3	12,0	2,0	
	<b>LPS 02-03-L-A10</b> 	21,4 ± 0,3	20 ± 1	0,9								63,8					
	<b>LPS 02-03-L-D03</b> 	10 ± 0,6	10,6 ± 0,5	1,0	2	7,90E+04	9,00E+05	23,9	0,1	30,7	8,2	76,6	142,3	4,3	82,9	1,8	
	<b>LPS 02-20-L-A02</b> 	7,4 ± 0,1	7,7 ± 0,2	1,0								82,3	181,7	2,8	91,1	1,9	

Famille chimique	Antagonistes	Compétition de liaison à CaM avec les sondes			Caractéristiques thermodynamiques de liaison à CaM							Disponibilité	Induction de la mort cellulaire			
		Ki / S1 (μM)	Ki / S3 (μM)	ratio	no sites	Ka <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> )	Ka <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> )	ΔH1 (kcal M <sup>-1</sup> )	ΔH2 (kcal M <sup>-1</sup> )	TΔS 1 (kcal M <sup>-1</sup> )	TΔS 2 (kcal M <sup>-1</sup> )		CHI	EC <sub>50</sub> HEK (μM)	nH HEK	EC <sub>50</sub> TG01 (μM)
Family III: Trifluoperazine analogues	<b>LPS 02-20-L-C02</b> 	10,4 ± 0,6	11 ± 1	1,1	1	1,74E+05		-1,7		5,4		50,5	68,0	3,4	41,5	2,8
	<b>TFP</b> 	0,86 ± 0,06	0,86 ± 0,05	1,0									136,4	8,6	96,0	2,1
	<b>Chlorpromazine</b> 	6,5 ± 0,1	6,4 ± 0,1	1,0									42,7	5,0	63,7	2,0
	<b>Fluphenazine</b> 	6,5 ± 0,2	6,3 ± 0,2	1,0									10,8	1,6	38,3	6,7
	<b>LPS 01-12-L-G09</b> 	2,12	4,4	2,1	1	5,59E+04		-4,9		1,6			11,3	4,8	8,5	6,8
	<b>PCL 09E06 – 685</b> 	1,96 ± 0,05	2,02 ± 0,15	1,0	1	6,16E+05		-2,9		5			37,8	4,4	36,0	2,7
	<b>PCL 09F04 – 693</b> 	10,4 ± 0,6	11,5 ± 0,3	1,1									74,8	5,4	63,9	1,9

Famille chimique	Antagonistes	Compétition de liaison à CaM avec les sondes			Caractéristiques thermodynamiques de liaison à CaM							Disponibilité		Induction de la mort cellulaire			
		Ki / S1 (μM)	Ki / S3 (μM)	ratio	nb sites	Ka <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> )	Ka <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> )	ΔH1 (kcal M <sup>-1</sup> )	ΔH2 (kcal M <sup>-1</sup> )	TΔS 1 (kcal M <sup>-1</sup> )	TΔS 2 (kcal M <sup>-1</sup> )	CHI	EC <sub>50</sub> HEK (μM)	nH HEK	EC <sub>50</sub> TG01 (μM)	nH TG01	
	<b>PCL 09G07 – 706</b> 	5,5	6,1	1,1	1	1,53E+06		2,6		11,1			45,8	2,3	72,1	2,3	
	<b>PCL 10G10 – 789</b> 	7,4 ± 0,1	7,3 ± 0,3	7,0									90,2	2,7	132,3	1,9	
	<b>PCL 10H04 – 793</b> ClH 	5,5 ± 0,7	4,9 ± 0,1	1,0									55,1	2,3	99,9	1,8	
	<b>PCL 11A08 – 807</b> ClH 	3,6 ± 0,01	3,6 ± 0,00	1,0	1	9,16E+04		-5		1,8							
Family IV: Alkylene bis-amidiniums. Biscations	<b>LPS 02-10-L-F11</b> 	4,5 ± 0,0	8,2 ± 0,5	1,8								27,7	1,8	52,1	2,2		
	<b>LPS 02-17-L-H11</b> 	1,10 ± 0,01	1,13 ± 0,04	1,1	1	3,77E+05		-6,1		1,5			5,1	4,1	4,2	2,6	
	<b>LPS 02-18-L-A02</b> 	1,06 ± 0,07	1,25 ± 0,23	1,2	1	2,10E+05		-5		2,2			3,6	4,7	3,4	4,6	

Famille chimique	Antagonistes	Compétition de liaison à CaM avec les sondes			Caractéristiques thermodynamiques de liaison à CaM							Disponibilité		Induction de la mort cellulaire			
		Ki / S1 (μM)	Ki / S3 (μM)	ratio	nb sites	Ka <sub>1</sub> (M <sup>-1</sup> )	Ka <sub>2</sub> (M <sup>-1</sup> )	ΔH1 (kcal M <sup>-1</sup> )	ΔH2 (kcal M <sup>-1</sup> )	TΔS 1 (kcal M <sup>-1</sup> )	TΔS 2 (kcal M <sup>-1</sup> )	CHI	EC <sub>50</sub> HEK (μM)	nH HEK	EC <sub>50</sub> TG01 (μM)	nH TG01	
Family V: Monocations (Quaternary ammoniums) and Nipecotates derivatives	<b>LPS 02-18-L-A06</b> 	69	46	0,7													
	<b>LPS 05-01-L-D06</b> 	0,22 ± 0,00	0,38 ± 0,01	1,7									29,9	2,5	19,7	1,9	
	<b>PCL 10F08 – 777</b> 	0,032 ± 0,003	0,16 ± 0,000	5,0	1	3,81E+05		-3,5		4,1			5,7	2,4	8,8	4,7	
	<b>PCL 09G06 – 705</b> 	0,64 ± 0,20	1,19 ± 0,02	1,9									8,4	6,4	5,6	3,2	
	<b>PCL 09G09 – 708</b> 	0,8 ± 0,5	1,1 ± 0,1	1,4	2	5,59E+06	1,96E+07	0,5	-0,5	9,7	9,5		14,1	2,5	11,6	2,9	
	<b>LPS 01-18-L-E03</b> 	1,18 ± 0,02	1,29 ± 0,01	1,1									35,3	2,2	22,6	6,1	
Family VI : 6-aryl-pyridazin-4-one	<b>LPS 01-18-L-E04</b> 	5,53 ± 0,03	10,65 ± 0,24	1,9								88,2	4,2	70,1	5,5		
	<b>LPS 01-08-L-C07</b> 	36 ± 1	39 ± 9	1,1	1	2,00E+05		3,6		10,8			1000,6	1,2	2295,1	0,9	
	<b>LPS 01-09-L-F11</b> 	4,8 ± 0,3	4,4 ± 0,1	0,9	1	7,95E+05		-4,6		3,4			34,5	4,9	21,8	1,7	

Famille chimique	Antagonistes	Compétition de liaison à CaM avec les sondes			Caractéristiques thermodynamiques de liaison à CaM						Disponibilité CHI	Induction de la mort cellulaire			
		Ki / S1 ( $\mu\text{M}$ )	Ki / S3 ( $\mu\text{M}$ )	ratio	no sites	Ka <sub>1</sub> ( $\text{M}^{-1}$ )	Ka <sub>2</sub> ( $\text{M}^{-1}$ )	$\Delta\text{H1}$ (kcal $\text{M}^{-1}$ )	$\Delta\text{H2}$ (kcal $\text{M}^{-1}$ )	TAS 1 (kcal $\text{M}^{-1}$ )		TAS 2 (kcal $\text{M}^{-1}$ )	EC <sub>50</sub> HEK ( $\mu\text{M}$ )	nH HEK	EC <sub>50</sub> TG01 ( $\mu\text{M}$ )
Family VII: Carboxylic acids	<b>LPS 01-08-L-G06</b>  <chem>COc1ccc(C=Cc2ccc(Cl)c2OCCN3CCOCC3)c(C)c1</chem>	106 ± 11	104 ± 0	1,0											
	<b>LPS 02-23-L-D05</b>  <chem>O=C(O)c1c2ccccc2[nH]1c3ccccc3</chem>	6,1 ± 0,2	6,3 ± 0,3	1,0											
Family IX: Unclassified	<b>LPS 01-02-L-H11</b>  <chem>Oc1ccc(C=Cc2cc(Cl)cc2)cc1C(=O)c3ccccc3</chem>	43 ± 3	30 ± 0	0,7											
	<b>LPS 01-12-L-E04</b>  <chem>CCCCCOC(=O)c1ccc(C=Cc2ccc(Cl)cc2)cc1C(=O)NCCOCC</chem>	3,7 ± 0,4	7,2 ± 0,2	1,9							157,0	4,1	146,2	4,1	
	<b>LPS 02-23-L-G10</b>  <chem>CC(C)(C)OC(=O)NCCc1c2ccccc2[nH]1C(=O)NCCc3ccccc3</chem>	5,9 ± 0,3	5,8 ± 0,2	1,0											
<b>PCL 11A11 – 810</b>  <chem>O=[N+]([O-])c1ccc(Cl)c1CSCc2ccc(Cl)cc2</chem>	6,5 ± 0,2	6,6 ± 0,4	1,0												

III. Peptides et constantes de dissociation à CaM en fonction de  $[Ca^{2+}]$ 

Lab number	Peptide	Sequence	CaM	A-1 ( $\mu M$ )	B-1 ( $\mu M$ )	C-1 ( $\mu M$ )	D-1 ( $\mu M$ )	E-1 ( $\mu M$ )	nb $Ca^{2+}$
<b>Pompes</b>									
1	Plasma membrane calcium pump (PMCA)	LRRGQILWFRGLNRIQTQIK	VU1 human	4,5E+01 1,0E+02	3,7E-03 6,1E-03	3,7E-03 6,1E-03	3,7E-03 6,1E-03	3,7E-03 6,1E-03	1 1
36	SERCA1	NELPAEEGKTLWELVIEQFEDLL	VU1 human	4,9E+02 1,8E+02	4,9E+02 1,8E+02	4,9E+02 1,8E+02	3,0E+02 1,8E+02	3,9E-02 8,2E-03	4 4
<b>Cannaux et Récepteurs</b>									
13	Cardiac Ca(v)1.2; alpha-1C	KFYATFLUQEYFRKFKRKEQ	VU1 human	2,6E+00 2,2E+00	2,6E+00 2,2E+00	3,3E-04 1,4E-04	3,3E-04 1,4E-04	3,3E-04 1,4E-04	2 2
18	potassium (K+) channel (SK1)	QRKFLQAIHQAKLRVSKIE	VU1 human	9,6E+01 7,6E+01	9,6E+01 7,6E+01	3,9E-02 1,0E-02	3,9E-02 1,0E-02	3,9E-02 1,0E-02	2 2
22	Serotonin 5-HT (1A) receptor -1	YGRIFRAARFRIKTVKVKVETG	VU1 human	8,3E+00 2,1E+00	8,3E+00 2,1E+00	8,3E+00 2,1E+00	4,4E-04 2,7E-04	4,4E-04 2,7E-04	3 3
30	Cav1.1 (a)	NEELRAIKKIWKRTSMKLL	VU1 human	1,0E+02 1,0E+02	1,1E-02 9,5E-03	1,1E-02 9,5E-03	1,1E-02 9,5E-03	1,1E-02 9,5E-03	1 1
31	Cav1.1 (b)	KFYATFLIQEHFRKFMKRQEE	VU1 human	6,3E+01 3,7E+01	6,3E+01 3,7E+01	6,3E+01 3,7E+01	2,2E-04 6,6E-05	2,2E-04 6,6E-05	3 3
32	Cav2.1 (a)	DAELRKEMMAIWPNSLQKTLDDL	VU1 human	3,7E+02 3,8E+02	3,7E+02 3,8E+02	3,2E-01 5,9E-01	3,2E-01 5,9E-01	3,2E-01 5,9E-01	2 2
33	Cav2.1 (b)	KIYAAMMI MEYRQSKAKKLQ	VU1 human	1,1E+01 1,6E+01	1,1E+01 1,6E+01	1,1E-03 9,4E-04	1,1E-03 9,4E-04	1,1E-03 9,4E-04	2 2
34	Cav2.1 (c)	LMAHESGLKESPSWVTQRAQEMF	VU1 human	3,4E+02 4,0E+02	3,4E+02 4,0E+02	3,4E+02 4,0E+02	3,4E+02 4,0E+02	3,7E-01 1,3E-01	4 4
35	Cav 3.1	RRRAPSSDSDPLASGPPDSMAASPSPKK	VU1 human	2,2E+02 1,2E+02	2,2E+02 1,2E+02	2,1E+00 2,0E+00	2,1E+00 2,0E+00	2,1E+00 2,0E+00	2 2
39	EGFR	RRRHIVRKRTLRRLLQ	VU1 human	3,3E+00 2,1E+00	3,3E+00 2,1E+00	3,3E+00 2,1E+00	3,3E+00 2,1E+00	1,1E-05 1,5E-05	4 4
<b>Kinases</b>									
4	Calmodulin-Dependent Protein Kinase I (CaMKI)	IKKNFAKSKWKQAFNATAVVRHMRK	VU1 human	6,5E+01 3,2E+00	1,7E-02 2,7E-02	1,7E-02 2,7E-02	1,7E-02 2,7E-02	1,7E-02 2,7E-02	1 1
8	Ca2+-calmodulin-dependent kinase kinase alpha (CaMKK)	VKLIPSWTTVILVKSMLRKRSGNPF	VU1 human	1,8E+01 3,2E+00	1,8E+01 3,2E+00	1,4E-03 2,1E-05	1,4E-03 2,1E-05	1,4E-03 2,1E-05	2 2
10	DAPK2	RRRWKLSFSIVSLCNHLTR	VU1 human	1,1E+02 5,1E-02	3,2E-03 6,2E-03	3,2E-03 6,2E-03	3,2E-03 6,2E-03	3,2E-03 6,2E-03	1 1
11	sk-Myosin light chain kinase (sk-MLCK)	KRRWKNFNIAVSAANRFKKI	VU1 human	4,7E+00 5,9E+00	4,7E+00 1,1E-02	2,5E-05 1,1E-02	2,5E-05 1,1E-02	2,5E-05 1,1E-02	2 2
12	sm-Myosin light chain kinase (sm-MLCK)	RRKWQKTGNVRAIRGLSSM	VU1 human	1,8E+01 2,8E+01	1,8E+01 2,8E+01	9,1E-04 2,7E-03	9,1E-04 2,7E-03	9,1E-04 2,7E-03	1 2
24	DAPK	RKKWKQSVRLISLCQRLSR	VU1 human	2,8E+01 6,1E+00	4,2E-01 1,2E+00	4,8E-04 7,3E-04	5,9E-04 7,3E-04	6,7E-04 7,3E-04	2 2
25	DAPK_Phos	RKKWKQEVRLISLCQRLSR	VU1 human	5,8E+01 2,0E+01	5,8E+01 2,0E+01	1,6E-02 2,3E+00	1,6E-02 2,3E+00	1,6E-02 2,4E-02	2 2
40	PHK5	LRRLIDAYAFRIYGHVWKKGQQQNR	VU1 human	1,7E+01 1,9E+01	1,7E+01 1,9E+01	6,5E+00 8,6E-04	7,2E-04 8,6E-04	7,2E-04 8,6E-04	2 2
41	PHK13	GKFKIVCLTVLASVRIYQYRRVKP	VU1 human	3,4E+02 3,6E+02	3,4E+02 3,6E+02	3,4E+02 3,6E+02	5,6E-04 6,8E-03	5,6E-04 6,8E-03	3 3
42	CaMKII alpha	IKKFNARRKLGAILTTLATRNFS	VU1 human	6,0E+00 2,4E+00	6,0E+00 2,4E+00	4,5E-03 3,6E-03	4,5E-03 3,6E-03	4,5E-03 3,6E-03	2 2
43	CaMKII gamma	LRKFNARRKLGAILTTLVSRNFS	VU1 human	5,4E+00 1,8E+00	5,4E+00 1,8E+00	2,3E-03 7,3E-04	2,3E-03 7,3E-04	2,3E-03 7,3E-04	2 2
<b>Phosphatases</b>									
3	calcineurin, alpha isoform	AAARKEVIRNKIRAIKGMARVFSVL	VU1 human	2,4E+01 6,6E-01	2,4E+01 6,6E-01	1,8E-03 1,7E-03	1,8E-03 1,7E-03	1,8E-03 1,7E-03	2 2
<b>NO signal</b>									
6	Nitric-oxide synthase, endothelial	RKKTKEVANAVKISASLMG	VU1 human	6,5E+01 3,2E+01	6,5E+01 3,3E+01	8,0E-03 9,4E-01	8,0E-03 4,9E-04	8,0E-03 5,7E-04	2 2
<b>cAMP signal</b>									
17	PDE1A	KPRFRSIVHVWQAGIFVERM	VU1 human	6,1E+01 2,1E+02	6,1E+01 2,1E+02	3,3E-03 4,7E-04	3,3E-03 4,7E-04	3,3E-03 4,7E-04	2 2
<b>Modulation du cytosquelette</b>									
5	MARCKS	KKRFSFKKSKLVSFGSFKK	VU1 human	6,1E+00 5,1E+00	6,1E+00 5,1E+00	6,1E+00 4,5E-01	1,2E-03 8,5E-03	1,2E-03 8,5E-03	3 3
7	alphaII-spectrin	SPWKSARLMVHTVATFNSI	VU1 human	9,5E-01 4,9E+01	9,5E-01 4,9E+01	3,2E-03 6,8E-04	3,2E-03 6,8E-04	3,2E-03 6,8E-04	2 2
14	CAP-23/NAP-22 (neuronal axonal membrane protein, brain acid soluble protein 1)	GGKLSKSKKGYNVNDEKAKE	VU1 human	1,8E+02 1,9E+02	1,8E+02 1,9E+02	1,8E+02 1,9E+02	2,0E-01 2,1E-01	2,0E-01 2,1E-01	3 3
23	MYOSIN-SA, human	CIRIQKTIKRWLLRKKYLRM	VU1 human	8,6E-01 1,6E-01	8,6E-01 1,6E-01	6,5E-04 2,1E-03	6,5E-04 2,1E-03	6,5E-04 2,1E-03	2 2
<b>Autres</b>									
20	Heat Shock Protein 90 - beta (Hsp84) (Hsp90). human	NSAFVERVRKRGFEV	VU1 human	3,0E+02 3,2E+02	3,0E+02 3,2E+02	3,0E+02 1,4E-01	6,8E-02 1,4E-01	6,8E-02 1,4E-01	3 2
21	Neuromodulin	TKIQASFRGHITRKKLKE	VU1 human	7,3E+01 7,0E+01	7,3E+01 7,0E+01	7,3E+01 7,0E+01	1,6E-02 1,8E-02	1,6E-02 1,8E-02	3 3
38	GAD (glutamate decarboxylase)	HKKTDSVQLMIAWKKFVEEKKK	VU1 human	1,8E+04 6,9E+02	1,9E-02 5,4E-02	1,9E-02 5,4E-02	1,9E-02 5,4E-02	1,9E-02 5,4E-02	1 1

La séquence peptidique du peptide 30, indiquée comme représentant le domaine PreIQ du canal  $Ca_v1.1$  représente également le domaine PreIQ du canal  $Ca_v1.2$ . La liaison de chaque peptide a été testée avec SynCaM (VU1) et la CaM humaine (human). Le nombre de  $Ca^{2+}$  nécessaires à l'interaction CaM – peptide déduit des valeurs A<sup>-1</sup>, B<sup>-1</sup>, C<sup>-1</sup>, D<sup>-1</sup>, E<sup>-1</sup> est indiqué dans la dernière colonne.

### IV. Déplacement des peptides liés à CaM par chaque molécule - IC<sub>50</sub>

IC50 (µM)	P1	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P10	P11	P12	P13	P14	P17	P18	P20	P21	P22	P23	P30	P31	P33
LPS 02-10-L-A02	718	1992	1602	81	138	122	506	862	3165	522	999	13	160	54	15	13	10	69	482	96	420
LPS 02-10-L-A07	188	316	48	24	28	31	135	183	1376	109	232	14	73	10	16	8	13	48	64	28	173
LPS 02-10-L-C08	767	2608	2131	100	204	170	598	1007	2474	536	1015	11	266	83	18	16	12	113	923	196	607
LPS 02-10-L-C09	248	262	417	20	34	39	156	294	676	132	329	4	52	14	6	4	3	16	258	44	177
LPS 02-10-L-D02	640	1154	1428	67	124	127	495	797	3635	581	948	16	97	80	23	23	5	23	595	74	284
LPS 02-20-L-B03	601	2063	3848	96	172	189	631	1419	3378	719	2023	4	654	60	8	3	10	186	608	332	1167
LPS 02-20-L-B05	181	221	302	21	38	30	117	204	349	113	233	8	32	13	11	6	3	13	266	33	158
LPS 02-20-L-C04	883	1923	2673	68	117	86	387	760	2141	354	826	7	112	37	9	7	45	570	111	510	111
LPS 01-02-L-D08	158869	2183	13684	6221	11130	2621	82149	74805	6325	11705	17735	55	4420	751	110	109	5425	6955	35573	6405	8512
LPS 01-05-L-B11	10211	1963	34508	10713	10899	7517	6124	5718	15894	8213	11192	21	9993	1810	55	77	6605	8821	16884	10046	15665
LPS 01-15-L-H06	6127	896	16250	178	303	708	2547	48653	2901	2639	7633	7	471	99	21	18	961	3240	1519	815	8175
LPS 01-18-L-B10	1146	896	2163	160	303	180	900	1167	870	1203	1723	8	317	100	15	15	294	548	843	281	555
LPS 02-03-L-A10	6378	3708	4099	1525	3052	3093	5874	20266	20266	6594	12054	36	5009	818	89	112	2499	17516	13000	15616	3479
LPS 02-03-L-D03	5470	1705	2072	380	782	711	1559	1864	4214	3266	5779	30	755	200	38	46	639	1303	10000	1984	2834
LPS 02-20-L-A02	6187	1277	1903	304	837	1209	2514	2464	5201	5547	5143	15	1418	194	32	27	447	906	4903	487	1702
LPS 02-20-L-C02	3622	2224	1869	341	636	1447	2098	1490	4180	2601	6234	17	406	188	38	36	396	978	3289	1141	2558
LPS 01-12-L-G09	488	135	281	30	65	64	252	217	1036	286	639	9	60	19	11	8	55	208	358	139	400
LPS 02-10-L-F11	447	201	269	52	130	98	238	249	1194	424	721	9	161	36	18	15	108	216	231	155	326
LPS 02-17-L-H11	3329	1010	64	50	391	5	4562	4327	48878	49075	9705	3	2548	16	4	3	143	15131	20000	1546	23182
LPS 02-18-L-A02	1752	479	2049	31	163	130	995	1988	2355	2308	10428	5	224	12	6	4	83	630	14783	281	7997
LPS 02-18-L-A06	2212	4496	7235	3711	10134	3196	9943	12231	11817	11842	12208	158	11412	796	272	409	8266	24277	8373	7911	37868
LPS 05-01-L-D06	65	17	40	4	6	3	40	40	81	47	121	4	9	3	5	2	7	39	29	15	288
LPS 01-02-L-H11	2382	8555	2015	1268	10327	6704	2090	2361	3255	3369	6398	14	13637	7061	43	48	516	2000	29894	6414	2600
LPS 01-08-L-C07	2394	3340	1461	819	10365	10928	2154	4378	4471	4331	7	58	2356	1400	111	68	884	666	23588	32	83
LPS 01-08-L-G06	2418	4194	9946	11044	10075	2606	10142	11806	11447	11291	12257	21	24480	9302	33	36	33971	18565	12222	8227	44062
LPS 01-09-L-F11	1412	524	1710	87	200	156	777	1279	1597	1622	10220	7	211	65	15	12	152	3316	2127	166	1263
LPS 01-12-L-E04	2154	662	1045	91	296	93	1037	1317	1952	1500	9997	10	276	36	15	19	304	6317	2086	175	2083
LPS 01-18-L-E04	189	125	129	35	50	66	158	463	447	284	439	22	82	34	35	12	45	252	19	14	31
LPS 01-18-L-E05	10428	8497	6048	182	5951	3085	4011	4345	4419	4434	10135	21	47	4267	24	23	1277	2307	14973	9948	5357
LPS 02-23-L-D05	10262	10112	10246	9704	10398	3632	50142	52693	50154	48711	10050	21	51	461	28	33	3838	907	5317	7707	11893
W7	751	519	578	94	133	106	394	856	790	430	614	11	192	76	14	18	157	1222	507	305	732
W13	1053	898	1036	224	314	226	885	834	1272	746	1476	12	366	129	13	18	347	1694	785	464	1030
Calmidazolium	8	12	12	11	5	4	8	10	11	42	49	7	7	5	9	5	7	11	25	22	26
Clorpromazine	251	436	323	60	87	97	266	318	1104	611	1061	9	183	43	19	17	102	226	213	177	189
Bifonazole	20374	10136	11337	21126	20076	2667	50091	82319	128604	45285	33986	57	67	106	86	75	32131	28912	50000	40000	14758
Fluphenazine	602	828	737	237	422	314	3293	1618	2445	2032	3088	17	325	81	34	31	224	826	529	397	295
Phenoxybenzamin	25846	21854	22733	21248	20763	1848	33535	49073	33760	23471	31692	40	41	150	16	14	1009	2382	176878	17763	7914
Compo und 48/80	508	22	16	7	10	14	19	29	21	158	143	11	21	8	13	5	10	27	12	8	16
TFF	95	187	137	29	53	36	152	258	496	220	354	6	49	13	10	7	39	114	1307	940	1349
PCL09E06	5410	3486	3639	446	941	2383	4806	6972	30941	3650	9417	8	3871	296	12	14	1052	2981	10135	1161	1118
PCL09F04	1002	1043	1146	216	488	344	1492	2002	5108	2849	2914	22	582	130	37	50	333	500	660	443	302
PCL09G06	25	19	24	10	13	8	19	24	78	41	40	4	11	4	4	4	9	19	14	10	19
PCL09G07	6178	654	1119	229	429	370	2048	1302	3093	3281	9870	20	396	131	28	35	339	858	2870	614	1146
PCL09G09	57	42	61	17	25	18	57	60	128	72	156	10	20	8	12	6	22	37	30	21	41
PCL10G10	29705	1560	1864	298	593	546	5040	2905	5302	4734	10130	31	519	163	44	52	475	1449	5850	848	2017
PCL10H04	10441	1163	1533	274	560	363	3777	2005	5155	4676	10119	19	518	148	24	30	497	3384	22861	964	2871
PCL10F08	10	6	9	4	5	3	7	10	26	14	19	4	4	2	6	2	4	6	N/A	N/A	N/A
PCL11A08	7619	4372	4982	979	2110	1690	10215	4999	5513	6023	10153	13	3884	561	17	39	1878	66078	773075	30998	9506
PCL11A10	7577	6299	7199	7053	9247	2642	10266	30008	30025	28984	10149	25	36	37	29	83	38795	8450	11615	6355	11615
PCL11H09	6935	10621	11641	30840	31310	53	158	120	370	266	400	6617	29911	12361	8351	8800	59747	59800	138931	15896	27032

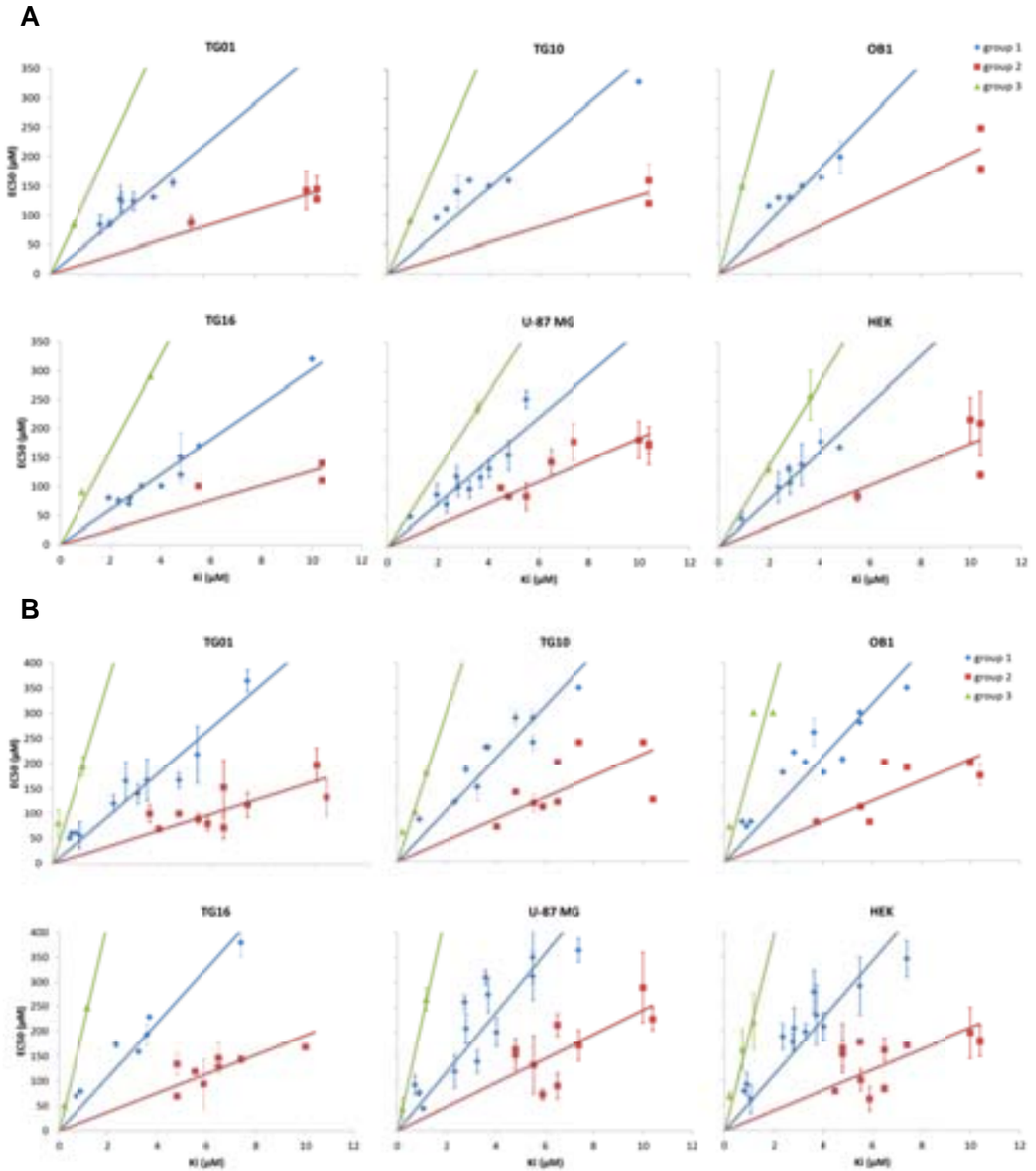
Les peptides sont désignés par la dénomination Px où x représente le numéro du peptide présenté dans l'Annexe III.

## V. Modification de l'homéostasie calcique par des antagonistes de la Calmoduline - EC<sub>50</sub>

Composés	K <sub>i</sub> (µM)	REPONSES TRANSITOIRES - EC <sub>50</sub> (µM)					REPONSES PERMANENTES - EC <sub>50</sub> (µM)						
		TG01	TG10	TG16	OB1	U87	HEK	TG01	TG10	TG16	OB1	U87	HEK
LPS 02-10-L-A02	2,34	85 ± 6	110	75 ± 7	130	71 ± 14	100 ± 26	120 ± 16	120	175 ± 7	180	120 ± 34	190 ± 26
LPS 02-10-L-A07	0,72							60 ± 0	100	70	80	93 ± 19	164 ± 41
LPS 02-10-L-C08	3,26	123 ± 15	160	100	150	98 ± 15	140 ± 36	140 ± 20	150 ± 28	160	200	140 ± 23	200 ± 16
LPS 02-10-L-C09	2,75	127 ± 23	140	70	130	120 ± 17	133 ± 6					260 ± 14	180 ± 17
LPS 02-10-L-D02	2,8	123 ± 15	140 ± 28	80	130	100 ± 14	108 ± 19	165 ± 37	185 ± 7		220	207 ± 31	207 ± 42
LPS 02-20-L-B03	1,27												
LPS 02-20-L-B05	0,901	85	90	90	150	50 ± 0	46 ± 12	60 ± 0	85	80	70	77 ± 6	93 ± 3
LPS 02-20-L-C04	4,04	130	150	100	165	133 ± 15	180 ± 22	70	70	120	180	200 ± 2	210 ± 28
LPS 01-05-L-B11	23,7	-											
LPS 01-15-L-H06	6,5					145 ± 21		153 ± 53	200	148 ± 32	200	214 ± 23	163 ± 23
LPS 01-18-L-B10	4,8			120		85		100	290 ± 14	70		165 ± 21	155 ± 26
LPS 02-03-L-D03	10	142 ± 33	330	320		183 ± 32	218 ± 38	198 ± 33	240	170	200	290 ± 71	196 ± 50
LPS 02-20-L-A02	7,4	144 ± 22	120	140	250	173 ± 32	123 ± 6	118 ± 25	240	145 ± 7	190	173 ± 31	17 ± 6
LPS 02-20-L-C02	10,4							133 ± 36	125		175 ± 21	227 ± 23	180 ± 30
LPS 02-10-L-F11	4,5					100							80
LPS 02-17-L-H11	1,1												
LPS 02-18-L-A02	1,06												
LPS 05-01-L-D06	0,22												
PCL 10F08 - 777	0,032												
PCL 09E06 - 685	1,96	84 ± 16	95	80	115	88 ± 19	134	58 ± 26	60	50	80	45	63 ± 29
PCL 09F04 - 693	10,4	127 ± 6	160 ± 28	110	180	176 ± 17	211 ± 55	80 ± 28			70	45 ± 21	70 ± 8
PCL 09G07 - 706	5,5	87 ± 12		100		85 ± 24	85 ± 9						
PCL 10G10 - 789	7,4					180 ± 32		365 ± 21	350	380 ± 28	300	313 ± 48	180 ± 0
PCL 10H04 - 793	5,5					253 ± 15		218 ± 57	240 ± 14		280	365 ± 24	347 ± 37
PCL 11A08 - 807	3,6			290 ± 14		240 ± 10	260 ± 42	167 ± 41	230 ± 0	195 ± 21	260 ± 28	310 ± 14	280 ± 44
LPS 01-12-L-G09	2,12												
LPS 01-18-L-E03	1,18							195 ± 19	180	250	300	266 ± 23	220 ± 57
LPS 01-18-L-E04	5,53			170				90 ± 10	118 ± 18	120	110	133 ± 59	102 ± 22
LPS 02-23-L-D05	6,1												
LPS 01-09-L-F11	4,8	155 ± 7	160	150 ± 42	200 ± 28	156 ± 26	170	167 ± 15	140	135 ± 21	205 ± 7	155 ± 31	167 ± 49
PCL 09G06 - 705	0,64							50					
PCL 09G09 - 708	0,8												80
LPS 01-12-L-E04	3,7					118 ± 18		100 ± 18	230	230	80	275 ± 35	233 ± 61
LPS 02-23-L-G10	5,9							80 ± 14	110	95 ± 49	80	73 ± 12	64 ± 24
PCL 11A11 - 810	6,5							73 ± 22	120	130		91 ± 26	85 ± 7
PCL 11H09 - 878	4,2												



## VI. Modification de l'homéostasie calcique par des antagonistes de la Calmoduline – Relations $EC_{50}$ / $K_i$



Représentation des valeurs  $EC_{50}$  obtenues sur les cellules pour les réponses transitoires (A) et permanentes (B) par rapport aux valeurs  $K_i$  de chaque molécule. Le rapport  $EC_{50} / K_i$  de chaque molécule permet de distinguer 3 différents groupes de molécules.

## VII. Éléments du calcium toolkit impliqués dans les mécanismes ON et OFF du signal calcium

Famille	Nom	Gene	Gene ID	Localisation principale	Fonctions biologiques principales	Maladies liées à une déficience / surexpression / épissage alternatif	Références
<b>MECANISMES ON</b>							
<b>Voltage operated calcium channels (VOCs)</b>							
L-type	CaV1.1	CACNA1S	779	muscles squelettiques	couplage excitation-contraction, régulation de l'expression génique	paralysie hypocalémique périodique	1, 2
	CaV1.2	CACNA1C	775	muscles cardiaques et lisses, cellules endocrines, neurones	couplage excitation-contraction, sécrétion endocrine, intégration synaptique, régulation de l'expression génique	syndrome de Timothy, arythmie cardiaque, hypertension, infarctus chronique du myocarde, autisme	1, 2
	CaV1.3	CACNA1D	776	cellules endocrines, neurones, myocytes cardiaques, cellules ciliées auditives, rétine	sécrétion endocrine, pacemaker cardiaque, régulation synaptique, régulation de l'expression génique		1, 2
	CaV1.4	CACNA1F	778	rétine, moelle épinière, glandes adrénaliennes, mastocytes	relâchement de neurotransmetteurs	perte de la vision nocturne	1, 2
P/Q-type	CaV2.1	CACNA1A	773	neurones, cellules neuroendocriniennes	relâchement de neurotransmetteurs et hormones, signaux calciques transitoires dendritiques	ataxie spino-cérébrale de type 6, ataxie épisodique de type 2, migraine hémiplégique familiale	1, 2
N-type	CaV2.2	CACNA1B	774	neurones, cellules neuroendocriniennes	relâchement de neurotransmetteurs et hormones, signaux calciques transitoires dendritiques	migraine hémiplégique familiale, ataxie cérébrale, douleur	1, 2
R-type	CaV2.3	CACNA1E	777	neurones	potentiels d'action, relâchement de neurotransmetteurs, signaux calciques transitoires des dendrites	douleur	1, 2
T-type	CaV3.1	CANCA1G	8913	neurones, muscles cardiaques et squelettiques	pacemaking, potentiels d'action répétitifs	épilepsie absences	1, 2
	CaV3.2	CACNA1H	8912	neurones, muscle cardiaques	pacemaking, potentiels d'action répétitifs	épilepsie absences	1, 2
	CaV3.3	CACNA1I	8911	neurones		épilepsie absences	1, 2
<b>Receptor operated calcium channels (ROCs)</b>							
Récepteurs NMDA, au glutamate	NR1	GRIN1	2902	cerveau (hippocampe, cortex cérébral, cervelet)	transmission synaptique, régulation de gènes, modulation de CREB, sensibilité à la douleur aiguë	retard mental (processus de mémoire verbale altérée, susceptibilité de schizophrénie)	3-9
	NR2A	GRIN2A	2903	cerveau	transmission synaptique, régulation de gènes, modulation de CREB, sensibilité à la douleur aiguë	épilepsie avec lésions du développement neural	5, 10-12
	NR2B	GRIN2B	2904	cerveau	plasticité synaptique, morphogenèse neuronale	retard mental	11-16
	NR2C	GRIN2C	2905	cerveau	transmission synaptique, régulation de gènes, modulation de CREB, sensibilité à la douleur aiguë		17
	NR2D	GRIN2D	2906	cerveau		animaux: réduction de l'activité spontanée dans un test "open field"	13, 18
	NR3A	GRIN3A	2906	cerveau	développement d'éléments synaptiques, canal imperméable à Ca <sup>2+</sup>		19, 20
	NR3B	GRIN3B	116 44 4	cerveau, neurones moteurs	diminution de l'amplitude du courant calcique et de la perméabilité du récepteur à Ca <sup>2+</sup>	pas de phénotype: absence compensée par d'autres protéines	19-21
Récepteurs ATP, purinergiques	P2X1	P2RX1	5023	plaquettes et cellules sanguines	différenciation des monocytes	maladies sanguines, modèles animaux: réduction de la fertilité chez les mâles	22-26
	P2X2	P2RX2	22 953	cœur, cerveau, pancréas	transmission synaptique	réduction / perte du goût	27, 28
	P2X3	P2RX3	5024	moelle osseuse, cœur	transmission synaptique	réduction / perte du goût, modèles animaux : perte de la sensation de douleur périphérique	28-31

## Annexes

Famille	Nom	Gene	Gene ID	Localisation principale	Fonctions biologiques principales	Maladies liées à une déficience / surexpression / épissage alternatif	Références
	P2X4	P2RX4	5025	monocytes, cellules endothéliales, neurones	différenciation des monocytes, allodynie tactile	perte de l'allodynie tactile, pas de vasoconstriction,- dilatation suite aux changements de pression sanguine (modèles animaux)	26, 32, 34
	P2X5	P2RX5	5026	cerveau, système immunitaire, muscles	différenciation des granulocytes, monocytes	leucémie	26, 35
	P2X6	P2RX6	9127				
	P2X7	P2RX7	5027	cerveau, système immunitaire, muscles		thrombose	36-38
	P2Y1	P2RY1	5028	ubiquitaire	différenciation des monocytes	pas d'agrégation des plaquettes	26, 38-41
	P2Y2	P2RY2	5029		développement et régénération neuronale, migration des neutrophiles et phagocytes	fibrose kystique	42, 43
Récepteur nAch	NACHR	CHRNA4	1137	synapses	transmission rapide du signal	épilepsie nocturne du lobe frontal	44
<b>Second messenger operated calcium channels (SMOCs)</b>							
	CNGA1	CNGA1	1259	bâtonnets visuels	phototransduction	dégénérescence des bâtonnets visuels, achromatie	45, 46
	CNGA2	CNGA2	1260	épithélium olfactif, aorte			47, 48
cyclic nucleotide gated channels	CNGA3	CNGA3	1261	photorécepteurs des cônes et des neurones olfactifs	transduction sensorielle des photorécepteurs et neurones olfactifs	vision monochromatique, achromatie	49-53
	CNGA4	CNGA4	1262		transduction des signaux odorants, adaptation aux signaux olfactifs		54-56
	CNGB1	CNGB1	1258		phototransduction	"retinitis pigmentosa"	57-59
	CNGB3	CNGB3	54 714		transduction sensorielle des photorécepteurs des cônes et des neurones olfactifs	achromatie	52, 60, 61
<b>Tyrosine kinase linked receptors (TRPs)</b>							
TRPA	TRPA1	ANKTM1		système nerveux, cœur, intestin, poumon, peau, rein, pancréas	sensation au froid, à un stimulus mécanique	douleur inflammatoire, hyperalgésie au froid, hypersensibilité mécanique	63, 65
TRPC	TRPC1	TRPC1	7220	système nerveux central, cellules de Purkinje	canal mécano-sensitif		66-69
	TRPC2	TRPC2	7221	Souris : organe voméronasal			69, 70
	TRPC3	TRPC3	7222	système nerveux central	vasorégulation (résistance artérielle)		69, 71-74
	TRPC4	TRPC4	7223	système nerveux central, cœur, pancréas, placenta, rein	vasorégulation, perméabilité microvasculaire? motilité gastro-intestinale		69, 75, 76
	TRPC5	TRPC5	7224	système nerveux central, muscles lisses gastriques	"growth cone morphology", extension des "neurites"		67, 69, 77
	TRPC6	TRPC6	7225	système nerveux central, muscle lisse? Dendrites de l'hippocampe, synapses	vasorégulation (résistance artérielle), "kidney podocyte regulation"	cardiomyopathie (hypertrophie)	69, 72, 78, 79
	TRPC7	TRPC7	57 113	rein, intestine, glande pituitaire, cerveau			69, 72, 80
TRPV	TRPV1	TRPV1	7442	ganglio trigeminal, rein, pancréas, placenta, testicules, utérus, rate, estomac, intestin grêle, poumon, foie	nociception induite par la chaleur, hyperalgésie d'inflammation thermique, toux chronique, sensibilisation bronchiale	défauts de nociception, maladie inflammatoire de bowel (surexpression), vulvodynie, ostéoarthrose	69, 81-85
	TRPV2	TRPV2	51 393	cerveau, ganglion trigeminal, corde spinale, poumon, rate, intestin	douleur thermique, dégénération de muscles cardiaque et squelettique, "osmo-sensing" dans les myocytes aortiques	dystrophie musculaire et cardiomyopathie (surexpression)	69, 86, 87

## Annexes

Famille	Nom	Gene	Gene ID	Localisation principale	Fonctions biologiques principales	Maladies liées à une déficience / surexpression / épissage alternatif	Références
	TRPV3	TRPV3	162 514	cerveau, peau, testicules, estomac, langue, trachée, intestin grêle, placenta, follicules pileux, adipocytes	sensation de chaleur, douleur	"mild temp-related pain deficit"	69, 88, 89
	TRPV4	TRPV4	59 341	cerveau, poumon, rate, rein, testicules, cœur, prostate, pancréas, placenta, glandes salivaires	"CNS osmotic sensing", hyperalgésie thermique	neuropathie motrice et sensorielle	69, 90-92
	TRPV5	TRPV5	56 302	rein, prostate, testicules, placenta, pancréas, cerveau	absorption du Ca <sup>2+</sup> dans le rein	diabète, hypercalcémie hypocalciurique, adénocarcinomes (surexpression)	69, 93-95
	TRPV6	TRPV6	55 503	intestins, estomac, rein, poumon, rate, foie, cerveau, placenta, prostate, pancréas, glandes adrénaliennes, peau	absorption du Ca <sup>2+</sup> dans le rein et l'intestin	alopécie, "dermatitis", adénocarcinomes (surexpression)	69, 96, 97
TRPM	TRPM1	TRPM1	4308	peau, mélanocytes, épithélium pigmenté de la rétine		invasivité des mélanomes	69, 98, 99
	TRPM2	TRPM2	7226	cellules gliales, immunitaires, cellules bêta du pancréas, cerveau, thymocytes, endothélium vasculaire	capteur de stress oxydatif dans les cellules immunitaires	troubles bipolaires, surdité héréditaire non syndromique	69, 100-102
	TRPM3	TRPM3	608 961	rein, endothélium pulmonaire, foie, pancréas, ovaires, testicules, corde spinale, cerveau, iris, cellules pigmentées de la rétine	sensation osmotique, homéostasie calcique rénale, mécanosenseur	gène candidat pour l'ALS avec démence fronto-temporelle, cataracte précoce	69, 103
	TRPM4	TRPM4	54 795	estomac, endothélium des artères, œsophage, pancréas, rein, cerveau	sensation du goût, oscillations de Ca dans les cellules T, effet bayles dans les muscles lisses, dépolarisation hypoxique	hypertrophie cardiaque, arythmie	69, 87, 104
	TRPM5	TRPM5	29 850	langue, estomac, intestins, utérus, testicules	sensation du goût	candidat pour le rhabdomyosarcome, tumeur de Wilms, Beckwith-Widemann	69, 105, 106
	TRPM6	TRPM6	140 803	intestin grêle, rein	absorption rénale et gastrointestinale de Mg <sup>2+</sup>	hypomagnesemia avec hypocalcémie secondaire	69, 107
	TRPM7	TRPM7	605 692	ubiquitaire	relâchement des neurotransmetteurs, mort cellulaire induite par l'anoxie	sclérose latérale amyotrophique guamanienne, démence de parkinson	69, 108-110
	TRPM8	TRPM8	79 054	ganglions trigem, testicules, prostate	sensation de froid, signalisation de la douleur	présent dans plusieurs carcinomes (prostate, sein, colon, poumon, peau)	69, 111, 112
TRPML, mucolipidin	TRPML1	MCOLN1	57 192	cerveau, muscle squelettique, colon, thymus, foie, poumon, leucocytes		mucopolidose de type IV	113, 114
	TRPML2	MCOLN2	255 231	lymphocytes B			115
	TRPML3	MCOLN3	55 283	cellules ciliées de l'oreille interne		perte de l'audition, anomalie de la pigmentation	116
<b>Ryanodine Récepteurs (RyR)</b>							
	RyR1	RYR1	6261	muscle squelettique, estomac, rein, thymus, glandes adrénaliennes, ovaire, testicule, lymphocytes B		hyperthermie, rhabdomyolyse induite par la chaleur et l'exercice, paralysie atypique périodique	117-120
	RyR2	RYR2	6262	muscle cardiaque, cellules de Purkinje du cervelet et du cortex		tachycardie catécholaminergique polymorphique du ventricule	118, 121
	RyR3	RYR3	6263	cerveau, muscles squelettiques, poumons, reins, ileum, jejunum, rate, estomac, aorte, utérus, urètre, vessie, œsophage		maladie d'Alzheimer	118, 122, 123
<b>Inositol triphosphate receptors (IP3R)</b>							
	IP3R1	ITPR1	3708	cerveau		ataxie, épilepsie absences, mortalité in utero	124-126

## Annexes

Famille	Nom	Gene	Gene ID	Localisation principale	Fonctions biologiques principales	Maladies liées à une déficience / surexpression / épissage alternatif	Références
	IP3R2	ITPR2	3709		migration cellulaire, métabolisme	croissance, métabolisme	126, 127
	IP3R3	ITPR3	3710	cellules hématopoïétiques		diabète de type I, lupus érythémateux systémique	126, 128
<b>Polycystins (PC)</b>							
	PC-1	PKD1	5310	ubiquitaire	structure, fonction de la tubulure rénale	polycystite rénale	129, 130
	PC-2	PKD2	5311	ubiquitaire	structure, fonction de la tubulure rénale	polycystite rénale	130, 131
	PC-3	PKD3	5312			polycystite rénale	132
<b>STIM</b>							
	STIM1	STIM1	6786	ubiquitaire		anémie hémolytique autoimmune, hypotone musculaire, thrombocytopénie	133, 134
	STIM2	STIM2	57 620	ubiquitaire			135
<b>Orai</b>							
	Orai1	ORAI1	84 876	Ubiquitaire		déficit immunitaire lié à l'inactivation des cellules T	136
	Orai2	ORAI2	80 228	Ubiquitaire			136
	Orai3	ORAI3	93 129	ubiquitaire			136
<b>MECANSIMES OFF</b>							
<b>Plasma membrane calcium ATPases (PMCA)</b>							
	PMCA1a			corde spinale, cerveau, muscles squelettique et cardiaque		mortalité embryonnaire (déletion homozygote)	137, 138
	PMCA1b			ubiquitaire		mortalité embryonnaire (déletion homozygote)	137, 138
	PMCA1c	ATP2B1	490	muscles squelettique, cardiaque, corde spinale, cerveau		mortalité embryonnaire (déletion homozygote)	137, 138
	PMCA1d			muscles squelettique, cardiaque		mortalité embryonnaire (déletion homozygote)	137, 138
	PMCA2a	ATP2B2	491	"auditory and vestibular hair cells"		surdité, ataxie	137- 139
	PMCA2b			"auditory and vestibular hair cells"		surdité, ataxie	137- 139
	PMCA3a			cerveau			140
	PMCA3b	ATP2B3	492	corde spinale, cerveau, glandes adrénaliennes			137, 140
	PMCA3f			muscles squelettiques			141
	PMCA4a			ubiquitaire		perte de mobilité des spermatozoïdes	137, 138
	PMCA4b	ATP2B4	493	muscles squelettique, cardiaque, intestin grêle, corde spinale, cerveau		perte de mobilité des spermatozoïdes	137, 138
<b>sarco(endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> -ATPases (SERCA)</b>							
	SERCA1a	ATP2A1	487	muscles squelettiques adultes		myopathie de Brody, détresse respiratoire	142, 145
	SERCA1b			muscles squelettiques fœtaux			142, 143

## Annexes

Famille	Nom	Gene	Gene ID	Localisation principale	Fonctions biologiques principales	Maladies liées à une déficience / surexpression / épissage alternatif	Références
	SERCA2a	ATP2A2	488	muscles cardiaque et squelettique, cellules de Purkinje		en association avec SERCA3: baisse de performance cardiaque, cellules tumorales squameuses, mauvaise relaxation des muscles lisses vasculaires et de la trachée	142, 146, 147
	SERCA2b			ubiquitaire		maladie de Darier-White (peau)	148
	SERCA3	ATP2A3	489	cellules épithéliales sécrétrices de l'intestin, trachée et glandes salivaires, cellules endocrines pancréatiques beta, cellules immunitaires, cœur, neurones de Purkinje	relaxation endothéliale-dépendante des muscles vasculaires lisses	tumorigenèse (colon, gastrique, leucémie), diabète de type II	149-151
	SERCA3a			cellules lymphoïdes, mastocytes, plaquettes, pancréas			152, 153
	SERCA3b			plaquettes, poumon, pancréas			153
	SERCA3c			plaquettes, poumon, pancréas			153
	SERCA3d			ubiquitaire			146
	SERCA3e			plaquettes, poumon, pancréas			146
	SERCA3f						154
	<b>Golgi pumps (SPCA)</b>						
	SPCA1a	ATP2C1	27 032	kératinocytes de l'épiderme		maladie de Hailey - Hailey (peau)	155, 156
	SPCA1b			kératinocytes de l'épiderme		maladie de Hailey - Hailey (peau)	155, 156
	SPCA2a	ATP2C2	9914				
	SPCA2b			rein, cerveau, poumon, pancréas, testicules, ovaires, rate	surexpression associée à la prolifération cellulaire et la tumorigenèse	155	
<b>Echangeur Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX)</b>							
3 Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchangers (NCX)	NCX1	SLC8A1	6546	cœur, cerveau, rein, ubiquitaire	couplage de l'excitation - contraction du cœur, signalisation neuronale, réabsorption du Ca <sup>2+</sup> dans le rein, hypertension induite par le sel	apoptose des myocytes cardiaques	157
	NCX2	SLC8A2	6543	cerveau	signalisation neuronale		158
	NCX3	SLC8A3	6547	cerveau, muscle squelettique	signalisation neuronale	nécrose des fibres des muscles squelettiques, transmission neuromusculaire défectueuse (anormalités électromyographiques), augmentation des lésions neuronales après une occlusion moyenne de l'artère cérébrale	159-161
	NCKX1	SLC24A1	9187	bâtonnets photorécepteurs de la rétine		"stationary night blindness"	162, 163
	NCKX2	SLC24A2	25 769	cônes photorécepteurs, cerveau	diminution du Ca <sup>2+</sup> cytosolique suite à un stimulus lumineux		164
4 Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> K <sup>+</sup> exchangers (NCKX)	NCKX3	SLC24A3	57 419	cerveau, ubiquitaire			165
	NCKX4	SLC24A4	123 041	cerveau, ubiquitaire	pigmentation des yeux, cheveux		165-167
	NCKX5	SLC24A5	283 652	peau, épithélium rétinien, cerveau	pigmentation de la peau		168
Ca <sup>2+</sup> /2 cations exchanger	NCLX	SLC24A6	80 024	ubiquitaire			169

1. Catterall, 2011. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**, a003947.
2. Liao *et al.*, 2009. *Arch Toxicol* **83**, 61.
3. Moriyoshi *et al.*, 1991. *Nature* **354**, 31.
4. Grunwald *et al.*, 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 12085.
5. Hardingham *et al.*, 2002. *Biochim Biophys Acta* **1600**, 148.
6. Salter *et al.*, 2005. *Nature* **438**, 1167.
7. Hamdan *et al.*, 2011. *Am J Hum Genet* **88**, 306.
8. Begni *et al.*, 2003. *Biol Psychiatry* **53**, 617.
9. Zhao *et al.*, 2006. *Biol Psychiatry* **59**, 747.
10. Takano *et al.*, 1993. *Biochem Biophys Res Commun* **197**, 922.
11. Liu *et al.*, 2004. *Science* **304**, 1021.
12. Endele *et al.*, 2010. *Nature genetics* **42**, 1021.
13. Hess *et al.*, 1996. *J Pharmacol Exp Ther* **278**, 808.
14. Setou *et al.*, 2000. *Science* **288**, 1796.
15. Kawakami *et al.*, 2003. *Science* **300**, 990.
16. Matta *et al.*, 2011. *Neuron* **70**, 339.
17. Lin *et al.*, 1996. *Brain Res Mol Brain Res* **43**, 57.
18. Ikeda *et al.*, 1995. *Brain Res Mol Brain Res* **33**, 61.
19. Andersson *et al.*, 2001. *Genomics* **78**, 178.
20. Chatterton *et al.*, 2002. *Nature* **415**, 793.
21. Niemann *et al.*, 2008. *Neurology* **70**, 666.
22. Valera *et al.*, 1995. *Receptors Channels* **3**, 283.
23. Clifford *et al.*, 1998. *Blood* **91**, 3172.
24. Oury *et al.*, 2000. *J Biol Chem* **275**, 22611.
25. Mulryan *et al.*, 2000. *Nature* **403**, 86.
26. Adrian *et al.*, 2000. *Biochim Biophys Acta* **1492**, 127.
27. Lynch *et al.*, 1999. *Mol Pharmacol* **56**, 1171.
28. Finger *et al.*, 2005. *Science* **310**, 1495.
29. Garcia-Guzman *et al.*, 1997. *Brain Res Mol Brain Res* **47**, 59.
30. Cockayne *et al.*, 2000. *Nature* **407**, 1011.
31. Souslova *et al.*, 2000. *Nature* **407**, 1015.
32. Garcia-Guzman *et al.*, 1997. *Mol Pharmacol* **51**, 109.
33. Tsuda *et al.*, 2003. *Nature* **424**, 778.
34. Yamamoto *et al.*, 2006. *Nat Med* **12**, 133.
35. Le *et al.*, 1997. *FEBS letters* **418**, 195.
36. Rassendren *et al.*, 1997. *J Biol Chem* **272**, 5482.
37. Wiley *et al.*, 2002. *Lancet* **359**, 1114.
38. Leon *et al.*, 1999. *Thromb Haemost* **81**, 775.
39. Ayyanathan *et al.*, 1996. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 783.
40. Leon *et al.*, 1996. *Gene* **171**, 295.
41. Arthur *et al.*, 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 19138.
42. Parr *et al.*, 1994. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 13067.
43. Elliott *et al.*, 2009. *Nature* **461**, 282.
44. Steinlein *et al.*, 1996. *Genomics* **32**, 289.
45. Dryja *et al.*, 1995. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10177.
46. Kaupp *et al.*, 1989. *Nature* **342**, 762.
47. Dhallan *et al.*, 1990. *Nature* **347**, 184.
48. Biel *et al.*, 1993. *FEBS letters* **329**, 134.
99. Miller *et al.*, 2004. *Cancer research* **64**, 509.
100. Uemura *et al.*, 2005. *Biochem Biophys Res Commun* **328**, 1232.
101. McNulty *et al.*, 2005. *Pflugers Arch* **451**, 235.
102. Wilcox *et al.*, 2001. *Cell* **104**, 165.
103. Lee *et al.*, 2003. *J Biol Chem* **278**, 20890.
104. Launay *et al.*, 2004. *Science* **306**, 1374.
105. Prawitt *et al.*, 2000. *Hum Mol Genet* **9**, 203.
106. Perez *et al.*, 2002. *Nat Neurosci* **5**, 1169.
107. Schlingmann *et al.*, 2002. *Nature genetics* **31**, 166.
108. Fonfria *et al.*, 2006. *J Recept Signal Transduct Res* **26**, 159.
109. Hermosura *et al.*, 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11510.
110. Aarts *et al.*, 2003. *Cell* **115**, 863.
111. Tsavaler *et al.*, 2001. *Cancer research* **61**, 3760.
112. Peier *et al.*, 2002. *Cell* **108**, 705.
49. Bonigk *et al.*, 1993. *Neuron* **10**, 865.
50. Weyand *et al.*, 1994. *Nature* **368**, 859.
51. Biel *et al.*, 1994. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 3505.
52. Kohl *et al.*, 1998. *Nature genetics* **19**, 257.
53. Wissinger *et al.*, 1998. *Genomics* **51**, 325.
54. Liman *et al.*, 1994. *Neuron* **13**, 611.
55. Bradley *et al.*, 1994. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8890.
56. Munger *et al.*, 2001. *Science* **294**, 2172.
57. Kondo *et al.*, 2004. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**, 4433.
58. Korschen *et al.*, 1995. *Neuron* **15**, 627.
59. Chen *et al.*, 1994. *Nature* **368**, 545.
60. Gerstner *et al.*, 2000. *J Neurosci* **20**, 1324.
61. Sundin *et al.*, 2000. *Nature genetics* **25**, 289.
62. Mignen *et al.*, 2000. *J Biol Chem* **275**, 9114.
63. Jaquemar *et al.*, 1999. *J Biol Chem* **274**, 7325.
64. Stokes *et al.*, 2006. *Cellular signalling* **18**, 1584.
65. Obata *et al.*, 2005. *J Clin Invest* **115**, 2393.
66. Zitt *et al.*, 1996. *Neuron* **16**, 1189.
67. Strubing *et al.*, 2001. *Neuron* **29**, 645.
68. Kim *et al.*, 2003. *Nature* **426**, 285.
69. Dadon *et al.*, 2010. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 1430.
70. Vannier *et al.*, 1999. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2060.
71. Zhu *et al.*, 1996. *Cell* **85**, 661.
72. Riccio *et al.*, 2002. *Brain Res Mol Brain Res* **109**, 95.
73. Li *et al.*, 2005. *Nature* **434**, 894.
74. Balzer *et al.*, 1999. *Cardiovasc Res* **42**, 543.
75. McKay *et al.*, 2000. *Biochem J* **351 Pt 3**, 735.
76. Freichel *et al.*, 2001. *Nat Cell Biol* **3**, 121.
77. Greka *et al.*, 2003. *Nat Neurosci* **6**, 837.
78. Hofmann *et al.*, 1999. *Nature* **397**, 259.
79. Winn *et al.*, 2005. *Science* **308**, 1801.
80. Riccio *et al.*, 2002. *J Biol Chem* **277**, 12302.
81. Hayes *et al.*, 2000. *Pain* **88**, 205.
82. Caterina *et al.*, 1997. *Nature* **389**, 816.
83. Fernihough *et al.*, 2005. *Neurosci Lett* **388**, 75.
84. Geppetti *et al.*, 2004. *Br J Pharmacol* **141**, 1313.
85. Yiangou *et al.*, 2001. *Lancet* **357**, 1338.
86. Caterina *et al.*, 1999. *Nature* **398**, 436.
87. Iwata *et al.*, 2003. *J Cell Biol* **161**, 957.
88. Smith *et al.*, 2002. *Nature* **418**, 186.
89. Xu *et al.*, 2002. *Nature* **418**, 181.
90. Liedtke *et al.*, 2000. *Cell* **103**, 525.
91. Delany *et al.*, 2001. *Physiol Genomics* **4**, 165.
92. Todaka *et al.*, 2004. *J Biol Chem* **279**, 35133.
93. Muller *et al.*, 2000. *Genomics* **67**, 48.
94. Janssen *et al.*, 2002. *J Histochem Cytochem* **50**, 789.
95. Hoenderop *et al.*, 2003. *J Clin Invest* **112**, 1906.
96. Peng *et al.*, 2000. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 326.
97. Bianco *et al.*, 2007. *J Bone Miner Res* **22**, 274.
98. Duncan *et al.*, 1998. *Cancer research* **58**, 1515.
113. Bargal *et al.*, 2000. *Nature genetics* **26**, 118.
114. Bargal *et al.*, 1997. *J Inherit Metab Dis* **20**, 625.
115. Lindvall *et al.*, 2005. *Cell Immunol* **235**, 46.
116. Di Palma *et al.*, 2002. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14994.
117. Takeshima *et al.*, 1989. *Nature* **339**, 439.
118. Lanner *et al.*, 2010. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a003996.
119. Capacchione *et al.*, 2010. *Anesthesiology* **112**, 239.
120. Zhou *et al.*, 2010. *Neuromuscul Disord* **20**, 166.
121. Nakai *et al.*, 1990. *FEBS Lett* **271**, 169.
122. Hakamata *et al.*, 1992. *FEBS letters* **312**, 229.
123. Supnet *et al.*, 2010. *J Neurochem* **112**, 356.
124. Matsumoto *et al.*, 1996. *Nature* **379**, 168.
125. Supattapone *et al.*, 1988. *J Biol Chem* **263**, 1530.
126. Taylor *et al.*, 1999. *Cell calcium* **26**, 237.
127. Futatsugi *et al.*, 2005. *Science* **309**, 2232.



128. Roach *et al.*, 2006. *Am J Hum Genet* **79**, 614.
129. Hughes *et al.*, 1995. *Nature genetics* **10**, 151.
130. Song *et al.*, 2009. *Hum Mol Genet* **18**, 2328.
131. Mochizuki *et al.*, 1996. *Science* **272**, 1339.
132. McConnell *et al.*, 2001. *J Med Genet* **38**, 238.
133. Parker *et al.*, 1996. *Genomics* **37**, 253.
134. Picard *et al.*, 2009. *N Engl J Med* **360**, 1971.
135. Williams *et al.*, 2001. *The Biochemical journal* **357**, 673.
136. Feske *et al.*, 2006. *Nature* **441**, 179.
137. Brandt *et al.*, 1992. *J Biol Chem* **267**, 4376.
138. Okunade *et al.*, 2004. *J Biol Chem* **279**, 33742.
139. Bortolozzi *et al.*, 2010. *J Biol Chem* **285**, 37693.
140. Brown *et al.*, 1996. *Biochim Biophys Acta* **1283**, 10.
141. Filoteo *et al.*, 2000. *J Biol Chem* **275**, 4323.
142. Brandl *et al.*, 1986. *Cell* **44**, 597.
143. Chami *et al.*, 2001. *J Cell Biol* **153**, 1301.
144. Zhang *et al.*, 1995. *Genomics* **30**, 415.
145. Odermatt *et al.*, 1996. *Nature genetics* **14**, 191.
146. Martin *et al.*, 2002. *J Biol Chem* **277**, 24442.
147. Periasamy *et al.*, 1999. *J Biol Chem* **274**, 2556.
148. Sakuntabhai *et al.*, 1999. *Nature genetics* **21**, 271.
149. Dode *et al.*, 1996. *Biochem J* **318 ( Pt 2)**, 689.
150. Brouland *et al.*, 2005. *Am J Pathol* **167**, 233.
151. Varadi *et al.*, 1999. *Diabetologia* **42**, 1240.
152. Wuytack *et al.*, 1994. *J Biol Chem* **269**, 1410.
153. Dode *et al.*, 1998. *J Biol Chem* **273**, 13982.
154. Bobe *et al.*, 2004. *J Biol Chem* **279**, 24297.
155. Wuytack *et al.*, 2002. *Cell calcium* **32**, 279.
156. Hu *et al.*, 2000. *Nature genetics* **24**, 61.
157. Komuro *et al.*, 1992. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 4769.
158. Li *et al.*, 1994. *J Biol Chem* **269**, 17434.
159. Nicoll *et al.*, 1996. *J Biol Chem* **271**, 24914.
160. Sokolow *et al.*, 2004. *J Clin Invest* **113**, 265.
161. Molinaro *et al.*, 2008. *J Neurosci* **28**, 1179.
162. Tucker *et al.*, 1998. *Hum Genet* **103**, 411.
163. Riazuddin *et al.*, 2010. *Am J Hum Genet* **87**, 523.
164. Prinsen *et al.*, 2000. *J Neurosci* **20**, 1424.
165. Kraev *et al.*, 2001. *J Biol Chem* **276**, 23161.
166. Li *et al.*, 2002. *J Biol Chem* **277**, 48410.
167. Sulem *et al.*, 2007. *Nature genetics* **39**, 1443.
168. Lamason *et al.*, 2005. *Science* **310**, 1782.
169. Cai *et al.*, 2004. *J Biol Chem* **279**, 5867.



## VIII. « EF-handome » : protéines possédant au moins un motif EF-hand

Protéine	Gene	Gene ID	Chromosome	Chromosome locus
actinin, alpha 1	ACTN1	87	chr14	14q22-q24
actinin, alpha 2	ACTN2	88	chr1	1q42-q43
actinin, alpha 3	ACTN3	89	chr11	11q13.1
actinin, alpha 4	ACTN4	81	chr19	19q13
Aftiphilin	AFTPH	54 812	chr2	2p14
Allograft inflammatory factor 1	AIF1	199	chr6	6p21.3
Allograft inflammatory factor 1-like	AIF1L	83 543	chr9	9q34.13-q34.3
A kinase anchor protein 13	AKAP13	11 214	chr15	15q24-q25
Ankryrin repeat domain 5	ANKRD5	63 926	chr20	20p12.2
N-terminal EF-hand calcium binding protein 3	APBA2BP	63 941	chr20	20q11.22
Chromosome 17 open reading frame 57	C17orf57	124 989	chr17	17q21.32
Stromal derived factor 4	Cab45	51 150	chr1	1p36.33
Calcium binding protein 1	CABP1	9478	chr12	12q24.31
Calcium binding protein 2	CABP2	51 475	chr11	11q13.1
Calcium binding protein 4	CABP4	57 010	chr11	11q13.2
Calcium binding protein 5	CABP5	56 344	chr19	19q13.33
Calcium binding protein 7	CABP7	164 633	chr22	22q12.2
Calbindin D28	CALB1	793	chr8	8q21.3-q22.1
Calbindin D29K	CALB2	794	chr16	16q22.2
Calbindin 3 / S100 calcium binding protein G	CALB3	795	chrX	Xp22.2
Calmodulin 1	CALM1	801	chr14	14q24-q31
Calmodulin 2	CALM2	805	chr2	2p21
Calmodulin 3	CALM3	808	chr19	19q13.2-q13.3
Calmodulin-like 3	CALML3	810	chr10	10pter-p13
Calmodulin-like 4	CALML4	91 860	chr15	15q23
Calmodulin-like 5	CALML5	51 806	chr10	10p15.1
Calmodulin-like 6	CALML6	163 688	chr1	1p36.33
Calneuron 1	CALN1	83 698	chr7	7q11
Calumenin	CALU	813	chr7	7q32.1
Calpain 1	CAPN1	823	chr11	11q13
Calpain 11	CAPN11	11 131	chr6	6p12
Calpain 12	CAPN12	147 968	chr19	19q13.2
Calpain 13	CAPN13	92 291	chr2	2p22-p21
Calpain 2	CAPN2	824	chr1	1q41-q42
Calpain 3	CAPN3	825	chr15	15q15.1
Calpain 8	CAPN8	388 743	chr1	1q41
Calpain 9	CAPN9	10 753	chr1	1q42.11-q42.3
Calpain, small subunit 1	CAPNS1	826	chr19	19q13.12
Calpain, small subunit 2	CAPNS2	84 290	chr16	16q12.2
Calcyphosine	CAPS	828	chr19	19p13.3
Calcyphosine 2	CAPS2	84 698	chr12	12q14.1
Calcyphosine-like	CAPSL	133 690	chr5	5p13.2
MICU1 (mitochondrial calcium uptake 1)	CBARA1	10 367	chr10	10q22.1
Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase	CBL	867	chr11	11q23.3
Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase B	CBLB	868	chr3	3q13.11
Cbl proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase C	CBLC	23 624	chr19	19q13.2
Centrin 1	CETN1	1068	chr18	18p11.32
Centrin 2	CETN2	1069	chrX	Xq28
Centrin 3	CETN3	1070	chr5	5q14.3
	CFD2	90 411	chr2	
Cell growth regulator with Ef-hand domain 1	CGREF1	10 669	chr2	2p23.3

Protéine	Gene	Gene ID	Chromosome	Chromosome locus
<b>Calcium binding protein P22, Calcineurin B homologous protein</b>	CHP	11 261	chr15	15q13.3
<b>Calcineurin B homologous protein 2</b>	CHP2	63 928	chr16	16q12.2
<b>Calcium and integrin binding 1</b>	CIB1	10 519	chr15	15q25.3-q26
<b>Calcium and integrin binding 2</b>	CIB2	10 518	chr15	15q24-q25
<b>Calcium and integrin binding 3</b>	CIB3	117 286	chr19	19p13.12
<b>Calcium and integrin binding 4</b>	CIB4	130 106	chr2	2p23.3
<b>Cornulin</b>	CRNN	49 860	chr1	1q21
<b>Kv channel interacting protein 3, Calsenilin</b>	CSEN	30 818	chr2	2q21.1
<b>IRF4-binding protein, Differentially expressed in FDCP6 homolog</b>	DEF6	50 619	chr6	6p21.33-p21.1
<b>DAG kinase alpha 80 kDa</b>	DGKA	1606	chr12	12q13.3
<b>DAG kinase beta 90 kDa</b>	DGKB	1607	chr7	7p21.2
<b>DAG kinase gamma 90 kDa</b>	DGKG	1608	chr3	3q27.2-q37.3
<b>Dystrophin</b>	DMD	1756	chrX	Xp21.2
<b>Dystrophin related protein 2</b>	DRP2	1821	chrX	Xq22
<b>Dystrobrevin alpha</b>	DTNA	1837	chr18	18q12
<b>Dystrobrevin beta</b>	DTNB	1838	chr2	2p24
<b>Dual oxidase 1</b>	DUOX1	53 905	chr15	15q15.3
<b>Dual oxidase 2</b>	DUOX2	50 506	chr15	15q15.3
<b>Dystonin</b>	DST	667	Chr6	6p12.1
<b>Dystrotelin</b>	DYTN	391 475	chr2	2q33.3
<b>DAZ interacting protein 3, zinc finger</b>	DZIP3	9666	chr3	3q13.13
<b>EF-hand calcium binding domain 1</b>	EFCAB1	79 645	chr8	8q11.21
<b>EF-hand calcium binding domain 11</b>	EFCAB11	90 141	chr14	14q32.11
<b>EF-hand calcium binding domain 2</b>	EFCAB2	84 288	chr1	1q44
<b>EF-hand calcium binding domain 3</b>	EFCAB3	146 779	chr17	17q23.2
<b>EF-hand calcium binding domain 4A</b>	EFCAB4A	283 229	chr11	11p15.5
<b>EF-hand calcium binding domain 4B</b>	EFCAB4B	84 766	chr12	12p13.32
<b>EF-hand calcium binding domain 6</b>	EFCAB6	64 800	chr22	22q13.2
<b>EF-hand calcium binding domain 7</b>	EFCAB7	84 455	chr1	1p31.3
<b>EF-hand calcium binding domain 8</b>	EFCAB8	388 795	chr20	20q11.21
<b>EF-hand calcium binding domain 9</b>	EFCAB9	285 588	chr5	5q35.1
<b>N-terminal EF-hand calcium binding protein 2</b>	EFCBP2	54 550	chr16	16q23.3
<b>EF-hand domain family, member A1</b>	EFHA1	221 154	chr13	13q12.11
<b>EF-hand domain family, member A2</b>	EFHA2	286 097	chr8	8p22
<b>EF-hand domain family, member B</b>	EFHB	151 651	chr3	3p24.3
<b>EF-hand domain (C-terminal) containing 1</b>	EFHC1	114 327	chr6	6p12.3
<b>EF-hand domain (C-terminal) containing 2</b>	EFHC2	80 258	chrX	Xp11.3
<b>EF-hand domain family, member D1</b>	EFHD1	80 303	chr2	2q37.1
<b>EF-hand domain family, member D2</b>	EFHD2	79 180	chr1	1p36.21
<b>EH-domain containing 1, PAST homolog 1, Testilin</b>	EHD1	10 938	chr11	11q13
<b>EH-domain containing 2, PAST homolog 2</b>	EHD2	30 846	chr19	19q13.33
<b>EH-domain containing 3, PAST homolog 3</b>	EHD3	30 845	chr2	2p21
<b>EH-domain containing 4, PAST homolog 4</b>	EHD4	30 844	chr15	15q11.1
<b>EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1</b>	ELTD1	64 123	chr1	1p33-p32
<b>Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15</b>	EPS15	2060	chr1	1p32
<b>Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15</b>	EPS15L1	58 513	chr19	19p13.11
<b>ERO1-like protein alpha</b>	ERO1L	30 001	chr14	14q22.1
<b>Family with sequence similarity 188, member A</b>	FAM188A	80 013	chr10	10p13
<b>FK506 binding protein 10, 65 kDa</b>	FKBP10	60 681	chr17	17q21.2
<b>FK506 binding protein 14, 22 kDa</b>	FKBP14	55 033	chr7	7p14.3

Protéine	Gene	Gene ID	Chromosome	Chromosome locus
<b>FK506 binding protein 14, 22 kDa</b>	FKBP7	51 661	chr2	2q31.2
<b>FK506 binding protein 9, 63 kDa</b>	FKBP9	11 328	chr7	7p11.1
<b>Filaggrin</b>	FLG	2312	chr1	1q21.3
<b>Filaggrin family member 2</b>	FLG2	388 698	chr1	1q21.3
<b>neuronal calcium sensor 1</b>	NCS1	23 413	chr9	9q34
<b>Follistatin-like 1</b>	FSTL1	11 167	chr3	3q13.33
<b>Follistatin-like 4</b>	FSTL4	23 105	chr5	5q31.1
<b>Follistatin-like 5</b>	FSTL5	56 884	chr4	4q32.3
<b>Grancalcin</b>	GCA	25 801	chr2	2q24.2
<b>N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits</b>	GNPTAB	79 158	chr12	12q23.2
<b>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2 (mitochondrial)</b>	GPD2	2820	chr2	2q24.1
<b>Guanylate cyclase activator 1A (retina)</b>	GUCA1A	2978	chr6	6p21.1
<b>Guanylate cyclase activator 1B (retina)</b>	GUCA1B	2979	chr6	6p21.1
<b>Guanylate cyclase activator 1C</b>	GUCA1C	9626	chr3	3q13.1
<b>Hornerin</b>	HRNR	388 697	chr1	1q21.3
<b>Hippocalcin</b>	HPCA	3208	chr1	1p35-p34.2
<b>Hippocalcin-like 1</b>	HPCAL1	3241	chr2	2p25.1
<b>Hippocalcin-like 4</b>	HPCAL4	51 440	chr1	1p34.2
<b>Myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle</b>	MYLPF	29 895	chr16	16p11.2
<b>Integrin, alpha V</b>	ITGAV	3685	chr2	2q31-q32
<b>Intersectin 1</b>	ITSN1	6453	chr21	21q22.1-q22.2
<b>Intersectin 2</b>	ITSN2	50 618	chr2	2pter-p25.1
<b>Kv channel interacting protein 1</b>	KCNIP1	30 820	chr5	5q35.1
<b>Kv channel interacting protein 2</b>	KCNIP2	30 819	chr10	10q24
<b>Kv channel interacting protein 4</b>	KCNIP4	80 333	chr4	4p15.32
<b>KIAA0494</b>	KIAA0494	9813	chr1	1pter-p22.1
<b>Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)</b>	LCP1	3936	chr13	13q14.3
<b>Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1</b>	LETM1	3954	chr4	4p16.3
<b>uncharacterized LOC100653115</b>	LOC100653115	100 653 115	chr6	6
<b>uncharacterized LOC391722</b>	LOC391722	391 722	chr4	4q35.1
<b>Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1</b>	LPCAT1	79 888	chr5	5p15.33
<b>Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2</b>	LPCAT2	54 947	chr16	16q12.2
<b>Microtubule-actin crosslinking factor 1</b>	MACF1	23 499	chr1	1p32-p31
<b>Mesoderm induction early response 1 homolog (Xenopus laevis)</b>	MI-ER1	57 708	chr1	1p31.3
<b>Myosin, light chain 6B, alkali, smooth muscle and non-muscle</b>	MYL6B	140 465	chr12	12q13.13
<b>Myosin, light chain 12A, regulatory, non-sarcomeric</b>	MYL12A	10 627	chr18	18p11.31
<b>Myosin, light chain 12B, regulatory</b>	MYL12B	103 910	chr18	18p11.31
<b>Myosin, light chain 1</b>	MYL1	4632	chr2	2q33-q34
<b>Myosin, light chain 2</b>	MYL2	4633	chr12	12q24.11
<b>Myosin, light chain 3</b>	MYL3	4634	chr3	3p21.3-p21.2
<b>Myosin, light chain 4</b>	MYL4	4635	chr17	17q21-qter
<b>Myosin, light chain 5</b>	MYL5	4636	chr4	4p16.3
<b>Myosin, light chain 6</b>	MYL6	4637	chr12	12q13.2
<b>Myosin, light chain 7</b>	MYL7	58 498	chr7	7p21-p11.2
<b>Myosin, light chain 9</b>	MYL9	10 398	chr20	20q11.23
<b>Myosin, light chain 10</b>	MYL10	93 408	chr7	7q22.1

Protéine	Gene	Gene ID	Chromosome	Chromosome locus
<b>Myelin transcription factor 1-like</b>	MYT1L	23 040	chr2	2p25.3
<b>Neurocalcin delta</b>	NCALD	83 988	chr8	8q22.2
<b>N-terminal EF-hand calcium binding protein 1</b>	NECAB1	64 168	chr8	8q21.3
<b>Ninein (GSK3B interacting protein)</b>	NIN	51 199	chr14	14q22.1
<b>Ninein-like</b>	NINL	22 981	chr20	20p11.22-p11.1
<b>NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5</b>	NOX5	79 400	chr15	15q23
<b>Nucleobindin 1</b>	NUCB1	4924	chr19	19q13.33
<b>Nucleobindin 2</b>	NUCB2	4925	chr11	11p15.1
<b>Oncomodulin 2</b>	OCM2	4951	chr7	7q21.2
<b>Oncomodulin</b>	OCM	654 231	chr7	7p22.1
<b>Prolyl 4-hydroxylase, transmembrane (endoplasmic reticulum)</b>	P4HTM	54 681	chr3	3p21.3-p21.2
<b>Programmed cell death 6</b>	PDCD6	10 016	chr5	5p15.33
<b>penta-EF-hand domain containing 1</b>	PEF1	553 115	chr1	1p34
<b>Polycystic kidney disease 2 (autosomal dominant)</b>	PKD2	5311	chr4	4q22.1
<b>Phospholipase C, delta 1</b>	PLCD1	5333	chr3	3p22-p21.3
<b>Phospholipase C, delta 3</b>	PLCD3	113 026	chr17	17q21.31
<b>Phospholipase C, delta 4</b>	PLCD4	84 812	chr2	2q35
<b>Phospholipase C, gamma 1</b>	PLCG1	5335	chr20	20q12-q13.1
<b>Phospholipase C, eta 1</b>	PLCH1	23 007	chr3	3q25.31
<b>Phospholipase C, eta 2</b>	PLCH2	9651	chr1	1p36.32
<b>Plastin 1</b>	PLS1	5357	chr3	3q23
<b>Plastin 3</b>	PLS3	5358	chrX	Xq23
<b>Protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 1</b>	PPEF1	5475	chrX	Xp22
<b>Protein phosphatase, EF-hand calcium binding domain 2</b>	PPEF2	5470	chr4	4q21.1
<b>Protein phosphatase 2, regulatory subunit B'', alpha</b>	PPP2R3A	5523	chr3	3q22.1
<b>Protein phosphatase 2, regulatory subunit B'', gamma</b>	PPP2R3C	55 012	chr14	14q13.2
<b>Protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha</b>	PPP3R1	5534	chr2	2p15
<b>Protein phosphatase 3, regulatory subunit B, beta</b>	PPP3R2	5535	chr9	9q31.1
<b>Protein phosphatase 2, regulatory subunit B'', beta</b>	PR48	28 227	chrY	Xp22.33; Yp11.3
<b>Protein kinase C substrate 80K-H</b>	PRKCSH	5589	chr19	19p13.2
<b>Parvalbumin</b>	PVALB	5816	chr22	22q13.1
<b>RAB11 family interacting protein 3 (class II)</b>	RAB11FIP3	9727	chr16	16q13.3
<b>RAB11 family interacting protein 4 (class II)</b>	RAB11FIP4	84 440	chr17	17q11.2
<b>RAS and EF-hand domain containing</b>	RASEF	158 158	chr9	9q21.32
<b>RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)</b>	RASGRP1	10 125	chr15	15q14
<b>RAS guanyl releasing protein 2 (calcium and DAG-regulated)</b>	RASGRP2	10 235	chr11	11q13
<b>RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)</b>	RASGRP3	25 780	chr2	2p25.1-p24.1
<b>Reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain</b>	RCN1	5954	chr11	11p13
<b>Reticulocalbin 2, EF-hand calcium binding domain</b>	RCN2	5955	chr15	15q23
<b>Reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain</b>	RCN3	57 333	chr19	19q13.33
<b>Recoverin</b>	RCVRN	5957	chr17	17p13.1
<b>Repetin</b>	RPTN	126 638	chr1	1q21.3
<b>RALBP1 associated Eps domain containing 1</b>	REPS1	85 021	chr6	6q24.1
<b>RALBP1 associated Eps domain containing 2</b>	REPS2	9185	chrX	Xp22.2
<b>Rhomboid, veinlet-like 1 (Drosophila)</b>	RHBDL1	9028	chr16	16p13.3

Protéine	Gene	Gene ID	Chromosome	Chromosome locus
Rhomboid, veinlet-like 3 ( <i>Drosophila</i> )	RHBDL3	162 494	chr17	17q11.2
Ras homolog family member T1	RHOT1	55 288	chr17	17q11.2
Ras homolog family member T2	RHOT2	89 941	chr16	16p13.3
Ryanodine receptor 1 (skeletal)	RYR1	6261	chr19	19q13.1
Ryanodine receptor 2 (cardiac)	RYR2	6262	chr1	1q43
Ryanodine receptor 3	RYR3	6263	chr15	15q14-q15
S100 calcium binding protein A1	S100A1	6271	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A10	S100A10	6281	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A11	S100A11	6282	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A11 pseudogene 1	S100A11P1	729 659	chr7	7q22.1
S100 calcium binding protein A11 pseudogene 2	S100A11P2	347 701	chr7	7q14.2
S100 calcium binding protein A12	S100A12	6283	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A13	S100A13	6284	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A14	S100A14	57 402	chr1	1q21.3
S100 calcium binding protein A7A	S100A15	338 324	chr1	1q21.3
S100 calcium binding protein A16	S100A16	140 576	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A2	S100A2	6273	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A3	S100A3	6274	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A4	S100A4	6275	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A5	S100A5	6276	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A6	S100A6	6277	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A7	S100A7	6278	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A7-like 2	S100A7L2	645 922	chr1	1q21.3
S100 calcium binding protein A8	S100A8	6279	chr1	1q21
S100 calcium binding protein A9	S100A9	6280	chr1	1q21
S100 calcium binding protein B	S100B	6285	chr21	21q22.3
S100 calcium binding protein P	S100P	6286	chr4	4p16
S100 calcium binding protein Z	S100Z	170 591	chr5	5q13.3
Secretagoin	SCGN	10 590	chr6	6p22.3-p22.1
Selenoprotein N, 1	SEPN1	57 190	chr1	1p36.13
Solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier), member 12	SLC25A12	8604	chr2	2q24
Solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier), member 13	SLC25A13	10 165	chr7	7q21.3
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23	SLC25A23	79 085	chr19	19p13.3
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 24	SLC25A24	29 957	chr1	1p13.3
solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 25	SLC25A25	114 789	chr9	9q34.11
SPARC related modular calcium binding 1	SMOC1	64 093	chr14	14q24.2
SPARC related modular calcium binding 2	SMOC2	64 094	chr6	6q27
Sentan, cilia apical structure protein	SNTN	132 203	chr3	3p14.2
Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	SPARC	6678	chr5	5q31.3-q32
SPARC-like 1 (hevin)	SPARCL1	8404	chr4	4q22.1
Spermatogenesis associated 21	SPATA21	374 955	chr1	1p36.13
Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1	SPOCK1	6695	chr5	5q31.2
Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3	SPOCK3	50 859	chr4	4q32.3
Spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2)	SPTA1	6708	chr1	1q21
Spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	SPTAN1	6709	chr9	9q34.11
Sorcin	SRI	6717	chr7	7q21.1

## Annexes

Protéine	Gene	Gene ID	Chromosome	Chromosome locus
<b>SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit</b>	SWAP70	23 075	chr11	11p15
<b>Synergin, gamma</b>	SYNRG	11 276	chr17	17q12
<b>TBC1 domain family, member 8B (with GRAM domain)</b>	TBC1D8B	54 885	chrX	Xq22.3
<b>TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)</b>	TBC1D9	23 158	chr4	4q31.21
<b>TBC1 domain family, member 9B (with GRAM domain)</b>	TBC1D9B	23 061	chr5	5q35.3
<b>Trichohyalin-like 1</b>	TCHHL1	126 637	chr1	1q21.3
<b>Trichohyalin</b>	THH	7062	chr1	1q21.3
<b>Troponin C type 1 (slow)</b>	TNNC1	7134	chr3	3p21.1
<b>Troponin C type 2 (fast)</b>	TNNC2	7125	chr20	20q12-q13.11
<b>Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1</b>	TRPA1	8989	chr8	8q13
	TSC	54 997	chr12	
<b>Ubiquitin specific peptidase 13 (isopeptidase T-3)</b>	USP13	8975	chr3	3q26.2-q26.3
<b>Ubiquitin specific peptidase 32</b>	USP32	84 669	chr17	17q23.3
<b>Utrophin</b>	UTRN	7402	chr6	6q24.1
<b>Visinin-like 1</b>	VSNL1	7447	chr2	2p24.3
<b>WD repeat domain 66</b>	WDR66	144 406	chr12	12q24.31
<b>Zinc finger, ZZ-type with EF-hand domain 1</b>	ZZEF1	23 140	chr17	17p13.2

## IX. Identification des protéines membranaires – comparaison bibliographique

	Ratio	Protéine – nom complet	Gene_id	HEK	NSC	TG01	U87
<b>Récepteurs</b>							
BCAP31	2	B-cell receptor-associated protein 31	10 134	11	11	12	11
CD163	3,8	CD163 antigen isoform b		0	0	0	0
CD44	4,4	CD44 antigen	960	0	2	7	9
CD74	4,4	HLA class II histocompatibility antigen gamma chain	972	0	0	0	9
EGFR	3,3	Epidermal growth factor receptor	1956	4	12	0	12
FCER1G	6,4	Fc fragment of IgE, high affinity, receptor for, gamma polypeptide precursor		0	0	0	0
FCGR3A	5	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor (CD16a) isoform d precursor		0	0	0	0
HLA-A	3	HLA class I histocompatibility antigen, A-2 alpha chain		0	0	0	17
HLA-C	3,9	HLA class I histocompatibility antigen, Cw-12 alpha chain		0	0	7	0
HLA-DRA	4,4	HLA class II histocompatibility antigen, DR alpha chain	3122	0	0	0	8
ICAM1	3,4	Intercellular adhesion molecule 1 precursor		0	0	0	0
ITGA5	2,2	Integrin alpha-5	3678	0	0	13	22
ITGB1	2,6	Integrin beta-1	3688	11	12	23	21
ITGB2	3,1	Integrin, beta 2 precursor		0	0	0	0
MRC2	7,6	C-type mannose receptor 2	9902	0	22	14	14
MSR1	4	Macrophage scavenger receptor 1 isoform type 1		0	0	0	0
PTPRC	2,6	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C isoform 2 precursor		0	0	0	0
SCARB2	2,7	Lysosome membrane protein 2	950	5	17	12	5
<b>Protéines de liaison au calcium</b>							
ANXA1	4,8	Annexin A1	301	0	14	7	10
ANXA2	3,8	Annexin A2	302	18	9	24	30
ANXA4	2,7	Annexin A4		0	0	0	0
ANXA5	5,3	Annexin A5	308	3	17	8	1
ASPH	2,2	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	444	3	25	15	0
ATP2B2	0,5	Plasma membrane calcium ATPase 2 isoform 2		0	0	0	0
CADM3	0,4	Cell adhesion molecule 3 isoform 2		0	0	0	0
CALR	2	Calreticulin	811	18	19	19	18
CALU	3,2	Calnexin	821	22	34	34	35
CAMK2G	0,4	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma isoform 4		0	0	0	0
CANX		Calnexin	821	22	34	34	35
CAPN5	2,1	Calpain-5	726	0	5	5	0
CCDC47	2,2	Coiled-coil domain-containing protein 47	57 003	5	14	12	17
F2	2,3	Coagulation factor II preproteine		0	0	0	0
FGG	2,8	Fibrinogen, gamma chain isoform gamma-A precursor		0	0	0	0
HSP90B1	2,4	Endoplasmic	7184	50	40	46	46
ITGA5	2,6	Integrin beta-1	3688	11	12	23	21
ITGAM	3,5	Integrin alpha M isoform 2 precursor		0	0	0	0
ITGB1	2,6	Integrin beta-1	3688	11	12	23	21
ITGB2	3,1	Integrin, beta 2 precursor		0	0	0	0
ITPR2	2,4	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	3709	13	57	9	0
ITSN1	0,4	Intersectin 1 isoform ITSN-s		0	0	0	0
LMAN2	2,1	Vesicular integral-membrane protein VIP36	10 960	13	9	13	14
LPCAT1	2,2	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1	79 888	0	4	6	2
MPO	3,3	Myeloperoxidase		0	0	0	0
MRC2	7,6	C-type mannose receptor 2	9902	0	22	14	14
MYL6	2,2	Myosin light chain 6B	140 465	0	4	6	0
PLG	10,2	Plasminogen		0	0	0	0
PON2	3	Serum paraoxonase/arylesterase 2	5445	4	11	4	5

## Annexes

	Ratio	Protéine – nom complet	Gene_id	HEK	NSC	TG01	U87
PPP3CA	0,4	Protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform isoform 3		0	0	0	0
PPP3R1	0,3	Protein phosphatase 3, regulatory subunit B, alpha isoform 1		0	0	0	0
RCN1	2,4	Reticulocalbin-1	5954	7	8	8	4
S100A10	6	Protein S100-A10	6281	0	0	7	6
S100A4	2,2	S100 calcium binding protein A4		0	0	0	0
S100A8	5,6	Protein S100-A8	6279	2	2	3	0
S100A9	6,2	Protein S100-A9	6280	3	0	7	2
SCG2	0,4	Secretogranin-2	7857	0	0	2	0
SLC8A2	0,4	Solute carrier family 8 member 2 precursor		0	0	0	0
SPARC	3,5	Spectrin non erythrocytic	6678	0	2	9	0
SRI	2,1	Sorcin	6717	0	4	6	0
SSR1	2,4	Translocon-associated protein subunit alpha	6745	4	5	4	4
SYP	0,4	Synaptophysin		0	0	0	0
SYT1	0,3	Synaptotagmin-1	6857	0	0	4	0
SYT5	0,4	Synaptogamin V		0	0	0	0
TPM4	25	Tropomyosin alpha-4 chain	7171	0	0	0	2
VSNL1	0,4	Visinin-like 1		0	0	0	0

Comparaison des protéines identifiées dans notre analyse avec celles de (Polisetty et al., 2012a). Le ratio désigne le taux d'expression des protéines dans des cellules de glioblastome par rapport à celui de cellules de tissu épileptique d'après (Polisetty et al., 2012a). Les 4 dernières colonnes correspondent aux protéines (nombre de peptides) identifiés dans notre analyse dans chacun des 4 types cellulaires testés.



## **Références Bibliographiques**

- Aarhus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F., and Lee, H. C. (1995). ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *The Journal of biological chemistry* *270*, 30327-30333.
- Abdouh, M., Facchino, S., Chatoou, W., Balasingam, V., Ferreira, J., and Bernier, G. (2009). BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *29*, 8884-8896.
- Ahram, M., Litou, Z. I., Fang, R., and Al-Tawallbeh, G. (2006). Estimation of membrane proteins in the human proteome. *In Silico Biol* *6*, 379-386.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 3983-3988.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* *10*, 619-624.
- Al-Nedawi, K., Meehan, B., and Rak, J. (2009). Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle* *8*, 2014-2018.
- al-Tubuly, A. A., Luqmani, Y. A., Shousha, S., Melcher, D., and Ritter, M. A. (1996). Differential expression of gp200-MR6 molecule in benign hyperplasia and down-regulation in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* *74*, 1005-1011.
- Albesiano, E., Han, J. E., and Lim, M. (2010). Mechanisms of local immunoresistance in glioma. *Neurosurgery clinics of North America* *21*, 17-29.
- Alley, S. C., Okeley, N. M., and Senter, P. D. (2010). Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr Opin Chem Biol* *14*, 529-537.
- Alonso, M. M., Diez-Valle, R., Manterola, L., Rubio, A., Liu, D., Cortes-Santiago, N., Urquiza, L., Jauregi, P., Lopez de Munain, A., Sampron, N., *et al.* (2011). Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PloS one* *6*, e26740.
- Aloy, M. T., Hadchity, E., Bionda, C., Diaz-Latoud, C., Claude, L., Rousson, R., Arrigo, A. P., and Rodriguez-Lafresse, C. (2008). Protective role of Hsp27 protein against gamma radiation-induced apoptosis and radiosensitization effects of Hsp27 gene silencing in different human tumor cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics* *70*, 543-553.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* *431*, 350-355.
- Anderson, M. E. (2002). Calmodulin and the philosopher's stone: Changing Ca<sup>2+</sup> into arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* *13*, 195-197.
- Anliker, B., and Chun, J. (2004). Cell surface receptors in lysophospholipid signaling. *Seminars in cell & developmental biology* *15*, 457-465.
- Ansieau, S., Morel, A. P., Hinkal, G., Bastid, J., and Puisieux, A. (2010). TWISTing an embryonic transcription factor into an oncoprotein. *Oncogene* *29*, 3173-3184.
- Arbajian, A., Brouland, J. P., Gelebart, P., Kovacs, T., Bobe, R., Enouf, J., and Papp, B. (2011). Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer. *Biofactors* *37*, 139-149.
- Arko, L., Katsyv, I., Park, G. E., Luan, W. P., and Park, J. K. (2010). Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacol Ther* *128*, 1-36.

- Armstrong, T. S., Prabhu, S., Aldape, K., Hossan, B., Kang, S., Childress, A., Tolentino, L., and Gilbert, M. R. (2011). A case of soft tissue metastasis from glioblastoma and review of the literature. *Journal of neuro-oncology* *103*, 167-172.
- Arredouani, A., Guiot, Y., Jonas, J. C., Liu, L. H., Nenquin, M., Pertusa, J. A., Rahier, J., Rolland, J. F., Shull, G. E., Stevens, M., *et al.* (2002). SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum Ca(2+) pumps for Ca(2+) homeostasis in pancreatic beta-cells. *Diabetes* *51*, 3245-3253.
- Balaj, L., Lessard, R., Dai, L., Cho, Y. J., Pomeroy, S. L., Breakefield, X. O., and Skog, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun* *2*, 180.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R. E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A. B., Dewhirst, M. W., Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006a). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* *444*, 756-760.
- Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A. B., Shi, Q., McLendon, R. E., Bigner, D. D., and Rich, J. N. (2006 b). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer research* *66*, 7843-7848.
- Barabasi, A. L., and Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* *5*, 101-113.
- Barabe, F., Kennedy, J. A., Hope, K. J., and Dick, J. E. (2007). Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* *316*, 600-604.
- Barbato, G., Ikura, M., Kay, L. E., Pastor, R. W., and Bax, A. (1992). Backbone dynamics of calmodulin studied by <sup>15</sup>N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible. *Biochemistry* *31*, 5269-5278.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
- Batada, N. N., Hurst, L. D., and Tyers, M. (2006). Evolutionary and physiological importance of hub proteins. *PLoS computational biology* *2*, e88.
- Bauer, C. S., Nieto-Rostro, M., Rahman, W., Tran-Van-Minh, A., Ferron, L., Douglas, L., Kadurin, I., Sri Ranjan, Y., Fernandez-Alacid, L., Millar, N. S., *et al.* (2009). The increased trafficking of the calcium channel subunit alpha2delta-1 to presynaptic terminals in neuropathic pain is inhibited by the alpha2delta ligand pregabalin. *J Neurosci* *29*, 4076-4088.
- Bayani, J., Selvarajah, S., Maire, G., Vukovic, B., Al-Romaih, K., Zielenska, M., and Squire, J. A. (2007). Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol* *17*, 5-18.
- Bayani, J., and Squire, J. A. (2007). Application and interpretation of FISH in biomarker studies. *Cancer letters* *249*, 97-109.
- Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2000). DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* *16*, 168-174.
- Bebawy, M., Combes, V., Lee, E., Jaiswal, R., Gong, J., Bonhoure, A., and Grau, G. E. (2009). Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* *23*, 1643-1649.
- Beier, D., Hau, P., Proescholdt, M., Lohmeier, A., Wischhusen, J., Oefner, P. J., Aigner, L., Brawanski, A., Bogdahn, U., and Beier, C. P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res* *67*, 4010-4015.

- Beier, D., Rohrl, S., Pillai, D. R., Schwarz, S., Kunz-Schughart, L. A., Leukel, P., Proescholdt, M., Brawanski, A., Bogdahn, U., Trampe-Kieslich, A., *et al.* (2008). Temozolomide preferentially depletes cancer stem cells in glioblastoma. *Cancer Res* 68, 5706-5715.
- Belot, N., Rorive, S., Doyen, I., Lefranc, F., Bruyneel, E., Dedecker, R., Micik, S., Brotchi, J., Decaestecker, C., Salmon, I., *et al.* (2001). Molecular characterization of cell substratum attachments in human glial tumors relates to prognostic features. *Glia* 36, 375-390.
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., and Weinberg, R. A. (2008a). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics* 40, 499-507.
- Ben-Porath, I., Thomson, M. W., Carey, V. J., Ge, R., Bell, G. W., Regev, A., and Weinberg, R. A. (2008 b). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics* 40, 499-507.
- Berkelman, T., Garret-Engle, P., and Hoffman, N. E. (1994). The *pacL* gene of *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 encodes a Ca(2+)-transporting ATPase. *J Bacteriol* 176, 4430-4436.
- Berridge, M., Lipp, P., and Bootman, M. (1999). Calcium signalling. *Curr Biol* 9, R157-159.
- Berridge, M. J. (2006). Calcium microdomains: organization and function. *Cell Calcium* 40, 405-412.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature* 395, 645-648.
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-529.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000a). Signal transduction. The calcium entry pas de deux. *Science* 287, 1604-1605.
- Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000b). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.
- Bhattacharya, S., Bunick, C. G., and Chazin, W. J. (2004). Target selectivity in EF-hand calcium binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1742, 69-79.
- Bierie, B., and Moses, H. L. (2006). Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nature reviews Cancer* 6, 506-520.
- Biernat, W., Huang, H., Yokoo, H., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2004). Predominant expression of mutant EGFR (EGFRvIII) is rare in primary glioblastomas. *Brain Pathol* 14, 131-136.
- Bilir, A., Erguven, M., Oktem, G., Ozdemir, A., Uslu, A., Aktas, E., and Bonavida, B. (2008). Potentiation of cytotoxicity by combination of imatinib and chlorimipramine in glioma. *International journal of oncology* 32, 829-839.
- Bindreither, D., and Lackner, P. (2009). Structural diversity of calcium binding sites. *General physiology and biophysics* 28 *Spec No Focus*, F82-88.
- Binello, E., and Germano, I. M. (2011). Targeting glioma stem cells: a novel framework for brain tumors. *Cancer Sci* 102, 1958-1966.
- Bizet, A. A., Liu, K., Tran-Khanh, N., Saksena, A., Vorstenbosch, J., Finnson, K. W., Buschmann, M. D., and Philip, A. (2011). The TGF-beta co-receptor, CD109, promotes internalization and degradation of TGF-beta receptors. *Biochim Biophys Acta* 1813, 742-753.

- Blackmore, P. F., El-Refai, M. F., Dehaye, J. P., Strickland, W. G., Hughes, B. P., and Exton, J. H. (1981). Blockade of hepatic alpha-adrenergic receptors and responses by chlorpromazine and trifluoperazine. *FEBS letters* *123*, 245-248.
- Blaustein, M. P., and Lederer, W. J. (1999). Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological reviews* *79*, 763-854.
- Blazek, E. R., Foutch, J. L., and Maki, G. (2007). Daoy medulloblastoma cells that express CD133 are radioresistant relative to CD133- cells, and the CD133+ sector is enlarged by hypoxia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* *67*, 1-5.
- Bledi, Y., Inberg, A., and Linial, M. (2003). PROCEED: A proteomic method for analysing plasma membrane proteins in living mammalian cells. *Brief Funct Genomic Proteomic* *2*, 254-265.
- Bodine, P. V., and Tupper, J. T. (1984). Calmodulin antagonists decrease the binding of epidermal growth factor to transformed, but not to normal, human fibroblasts. *Biochem J* *218*, 629-632.
- Boitano, S., Dirksen, E. R., and Sanderson, M. J. (1992). Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* *258*, 292-295.
- Boland, M. J., Hazen, J. L., Nazor, K. L., Rodriguez, A. R., Gifford, W., Martin, G., Kupriyanov, S., and Baldwin, K. K. (2009). Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* *461*, 91-94.
- Bonavia, R., Inda, M. M., Cavenee, W. K., and Furnari, F. B. (2011). Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer research* *71*, 4055-4060.
- Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* *3*, 730-737.
- Bootman, M. D., and Berridge, M. J. (1995). The elemental principles of calcium signaling. *Cell* *83*, 675-678.
- Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M., Prothero, L. S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S. C., Seo, J. T., Berridge, M. J., *et al.* (2001). Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* *12*, 3-10.
- Borota, O. C., Scheie, D., Bjerkhagen, B., Jacobsen, E. A., and Skullerud, K. (2006). Gliosarcoma with liposarcomatous component, bone infiltration and extracranial growth. *Clin Neuropathol* *25*, 200-203.
- Boschek, C. B., Sun, H., Bigelow, D. J., and Squier, T. C. (2008). Different conformational switches underlie the calmodulin-dependent modulation of calcium pumps and channels. *Biochemistry* *47*, 1640-1651.
- Bradley, J., Frings, S., Yau, K. W., and Reed, R. (2001). Nomenclature for ion channel subunits. *Science* *294*, 2095-2096.
- Bradley, J., Reisert, J., and Frings, S. (2005). Regulation of cyclic nucleotide-gated channels. *Curr Opin Neurobiol* *15*, 343-349.
- Brandt, P., Neve, R. L., Kammesheidt, A., Rhoads, R. E., and Vanaman, T. C. (1992). Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels. *The Journal of biological chemistry* *267*, 4376-4385.
- Braschi, S., and Wilson, R. A. (2006). Proteins exposed at the adult schistosome surface revealed by biotinylation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *5*, 347-356.
- Bruce, W. R., and Van Der Gaag, H. (1963). A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature* *199*, 79-80.

- Bruggeman, S. W., Hulsman, D., Tanger, E., Buckle, T., Blom, M., Zevenhoven, J., van Tellingen, O., and van Lohuizen, M. (2007). Bmi1 controls tumor development in an Ink4a/Arf-independent manner in a mouse model for glioma. *Cancer cell* *12*, 328-341.
- Cadieux, B., Ching, T. T., VandenBerg, S. R., and Costello, J. F. (2006). Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer research* *66*, 8469-8476.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T. L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E. Y., Gaber, M. W., Finklestein, D., Allen, M., *et al.* (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer cell* *11*, 69-82.
- Camacho, P., and Lechleiter, J. D. (1993). Increased frequency of calcium waves in *Xenopus laevis* oocytes that express a calcium-ATPase. *Science* *260*, 226-229.
- Camacho, P., and Lechleiter, J. D. (1995). Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca<sup>2+</sup> waves. *Cell* *82*, 765-771.
- Camby, I., Nagy, N., Lopes, M. B., Schafer, B. W., Maurage, C. A., Ruchoux, M. M., Murmann, P., Pochet, R., Heizmann, C. W., Brotchi, J., *et al.* (1999). Supratentorial pilocytic astrocytomas, astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastomas are characterized by a differential expression of S100 proteins. *Brain Pathol* *9*, 1-19.
- Capdevila, J., Elez, E., Macarulla, T., Ramos, F. J., Ruiz-Echarri, M., and Tabernero, J. (2009). Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer treatment reviews* *35*, 354-363.
- Capela, A., and Temple, S. (2002). LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* *35*, 865-875.
- Capper, D., Gaiser, T., Hartmann, C., Habel, A., Mueller, W., Herold-Mende, C., von Deimling, A., and Siegelin, M. D. (2009). Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation. *Acta Neuropathol* *117*, 445-456.
- Carafoli, E. (1992). The Ca<sup>2+</sup> pump of the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* *267*, 2115-2118.
- Carafoli, E. (1997). Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic Res Cardiol* *92 Suppl 1*, 59-61.
- Carafoli, E., Tiozzo, R., Lugli, G., Crovetti, F., and Kratzing, C. (1974). The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J Mol Cell Cardiol* *6*, 361-371.
- Cardy, T. J., Traynor, D., and Taylor, C. W. (1997). Differential regulation of types-1 and -3 inositol trisphosphate receptors by cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *The Biochemical journal* *328 ( Pt 3)*, 785-793.
- Caride, A. J., Filoteo, A. G., Penheiter, A. R., Paszty, K., Enyedi, A., and Penniston, J. T. (2001). Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca<sup>2+</sup>: fast pumps reside in fast cells. *Cell calcium* *30*, 49-57.
- Carracedo, A., and Pandolfi, P. P. (2008). The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* *27*, 5527-5541.
- CBTRUS (2010). CBTRUS Statistical Report - Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2006.
- Cervetto, L., Lagnado, L., Perry, R. J., Robinson, D. W., and McNaughton, P. A. (1989). Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature* *337*, 740-743.
- Chambers, A. F., Groom, A. C., and MacDonald, I. C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature reviews Cancer* *2*, 563-572.

- Chambers, A. F., and Matrisian, L. M. (1997). Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *Journal of the National Cancer Institute* 89, 1260-1270.
- Chan, K. S., Espinosa, I., Chao, M., Wong, D., Ailles, L., Diehn, M., Gill, H., Presti, J., Jr., Chang, H. Y., van de Rijn, M., *et al.* (2009). Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14016-14021.
- Chang, P. S., Absood, A., Linderman, J. J., and Omann, G. M. (2004). Magnetic bead isolation of neutrophil plasma membranes and quantification of membrane-associated guanine nucleotide binding proteins. *Analytical biochemistry* 325, 175-184.
- Charles, N. A., Holland, E. C., Gilbertson, R., Glass, R., and Kettenmann, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia* 59, 1169-1180.
- Checovich, W. J., Bolger, R. E., and Burke, T. (1995). Fluorescence polarization--a new tool for cell and molecular biology. *Nature* 375, 254-256.
- Chen, R., Yi, E. C., Donohoe, S., Pan, S., Eng, J., Cooke, K., Crispin, D. A., Lane, Z., Goodlett, D. R., Bronner, M. P., *et al.* (2005). Pancreatic cancer proteome: the proteins that underlie invasion, metastasis, and immunologic escape. *Gastroenterology* 129, 1187-1197.
- Cheng, W. Y., Kandel, J. J., Yamashiro, D. J., Canoll, P., and Anastassiou, D. (2012). A multi-cancer mesenchymal transition gene expression signature is associated with prolonged time to recurrence in glioblastoma. *PloS one* 7, e34705.
- Cheung, W. Y. (1970). Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator. *Biochem Biophys Res Commun* 38, 533-538.
- Chiche, J., Ilc, K., Laferriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N. M., Brahimi-Horn, M. C., and Pouyssegur, J. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer research* 69, 358-368.
- Chin, D., and Means, A. R. (2000). Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10, 322-328.
- Chin, D., Winkler, K. E., and Means, A. R. (1997). Characterization of substrate phosphorylation and use of calmodulin mutants to address implications from the enzyme crystal structure of calmodulin-dependent protein kinase I. *The Journal of biological chemistry* 272, 31235-31240.
- Chinot, O. (2005). [New place of the chemotherapy in gliomas]. *Bull Cancer* 92, 343-354.
- Chiou, S. H., Wang, M. L., Chou, Y. T., Chen, C. J., Hong, C. F., Hsieh, W. J., Chang, H. T., Chen, Y. S., Lin, T. W., Hsu, H. S., and Wu, C. W. (2010). Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer research* 70, 10433-10444.
- Choe, G., Horvath, S., Cloughesy, T. F., Crosby, K., Seligson, D., Palotie, A., Inge, L., Smith, B. L., Sawyers, C. L., and Mischel, P. S. (2003). Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer research* 63, 2742-2746.
- Chong, H., Vodovotz, Y., Cox, G. W., and Barcellos-Hoff, M. H. (1999). Immunocytochemical localization of latent transforming growth factor-beta1 activation by stimulated macrophages. *Journal of cellular physiology* 178, 275-283.
- Chumbalkar, V. C., Subhashini, C., Dhople, V. M., Sundaram, C. S., Jagannadham, M. V., Kumar, K. N., Srinivas, P. N., Mythili, R., Rao, M. K., Kulkarni, M. J., *et al.* (2005). Differential protein expression in human gliomas and molecular insights. *Proteomics* 5, 1167-1177.



- Clapham, D. E. (1995). Calcium signaling. *Cell* *80*, 259-268.
- Clapper, D. L., Walseth, T. F., Dargie, P. J., and Lee, H. C. (1987). Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *The Journal of biological chemistry* *262*, 9561-9568.
- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., and Ruiz i Altaba, A. (2007). HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol* *17*, 165-172.
- Coffelt, S. B., Hughes, R., and Lewis, C. E. (2009). Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. *Biochim Biophys Acta* *1796*, 11-18.
- Cohen, M. H., Shen, Y. L., Keegan, P., and Pazdur, R. (2009). FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *Oncologist* *14*, 1131-1138.
- Cohnheim, J. (1875). Congenitales, quergestreiftes Muskelsarkom der Nieren. *Virchows Archiv fur Pathologische and Physiologie and fur Klinische Medizin* *65*, 64-69.
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., and Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer research* *65*, 10946-10951.
- Colomer, J., Schmitt, A. A., Toone, E. J., and Means, A. R. (2007). Identification and inhibitory properties of a novel Ca(2+)/calmodulin antagonist. *Biochemistry* *49*, 4244-4254.
- Coluccia, A. M., Cirulli, T., Neri, P., Mangieri, D., Colanardi, M. C., Gnoni, A., Di Renzo, N., Dammacco, F., Tassone, P., Ribatti, D., *et al.* (2008). Validation of PDGFRbeta and c-Src tyrosine kinases as tumor/vessel targets in patients with multiple myeloma: preclinical efficacy of the novel, orally available inhibitor dasatinib. *Blood* *112*, 1346-1356.
- Condeelis, J., and Pollard, J. W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* *124*, 263-266.
- Cooper, L. A., Kong, J., Gutman, D. A., Wang, F., Gao, J., Appin, C., Cholleti, S., Pan, T., Sharma, A., Scarpace, L., *et al.* (2012). Integrated morphologic analysis for the identification and characterization of disease subtypes. *J Am Med Inform Assoc* *19*, 317-323.
- Copley, R. R., Schultz, J., Ponting, C. P., and Bork, P. (1999). Protein families in multicellular organisms. *Current opinion in structural biology* *9*, 408-415.
- Covello, K. L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J. D., Arsham, A. M., Hu, C. J., Labosky, P. A., Simon, M. C., and Keith, B. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development* *20*, 557-570.
- Craig, T. A., Watterson, D. M., Prendergast, F. G., Haiech, J., and Roberts, D. M. (1987). Site-specific mutagenesis of the alpha-helices of calmodulin. Effects of altering a charge cluster in the helix that links the two halves of calmodulin. *The Journal of biological chemistry* *262*, 3278-3284.
- Crouch, T. H., and Klee, C. B. (1980). Positive cooperative binding of calcium to bovine brain calmodulin. *Biochemistry* *19*, 3692-3698.
- Curry, M. C., Luk, N. A., Kenny, P. A., Roberts-Thomson, S. J., and Monteith, G. R. (2012). Distinct regulation of cytoplasmic calcium signals and cell death pathways by different plasma membrane calcium ATPase isoforms in MDA-MB-231 breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*.
- Dagher, R., Briere, C., Feve, M., Zeniou, M., Pigault, C., Mazars, C., Chneiweiss, H., Ranjeva, R., Kilhoffer, M. C., and Haiech, J. (2009). Calcium fingerprints induced by calmodulin interactors in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* *1793*, 1068-1077.



- Dagher, R., Peng, S., Gioria, S., Feve, M., Zeniou, M., Zimmermann, M., Pigault, C., Haiech, J., and Kilhoffer, M. C. (2010). A general strategy to characterize calmodulin-calcium complexes involved in CaM-target recognition: DAPK and EGFR calmodulin binding domains interact with different calmodulin-calcium complexes. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1059-1067.
- Dagher, R., Pigault, C., Bonnet, D., Boeglin, D., Pourbaix, C., Kilhoffer, M. C., Villa, P., Wermuth, C. G., Hibert, M., and Haiech, J. (2006). Use of a fluorescent polarization based high throughput assay to identify new calmodulin ligands. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1250-1255.
- Dalton, W. S. (1999). The tumor microenvironment as a determinant of drug response and resistance. *Drug Resist Updat* 2, 285-288.
- Dargan, S. L., Schwaller, B., and Parker, I. (2004). Spatiotemporal patterning of IP3-mediated Ca<sup>2+</sup> signals in *Xenopus* oocytes by Ca<sup>2+</sup>-binding proteins. *The Journal of physiology* 556, 447-461.
- Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., and Fallet-Bianco, C. (2000). [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann Pathol* 20, 413-428.
- Davies, A., Hendrich, J., Van Minh, A. T., Wratten, J., Douglas, L., and Dolphin, A. C. (2007). Functional biology of the alpha(2)delta subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 28, 220-228.
- De Filippis, L., and Delia, D. (2011). Hypoxia in the regulation of neural stem cells. *Cell Mol Life Sci* 68, 2831-2844.
- Dean, M., Fojo, T., and Bates, S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5, 275-284.
- Deighton, R. F., McGregor, R., Kemp, J., McCulloch, J., and Whittle, I. R. (2010). Glioma pathophysiology: insights emerging from proteomics. *Brain Pathol* 20, 691-703.
- Dell'Albani, P. (2008). Stem cell markers in gliomas. *Neurochem Res* 33, 2407-2415.
- Denny, B. J., Wheelhouse, R. T., Stevens, M. F., Tsang, L. L., and Slack, J. A. (1994). NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 33, 9045-9051.
- Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 112, 4793-4807.
- Dick, J. E., and Lapidot, T. (2005). Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells. *Int J Hematol* 82, 389-396.
- Dillman, R. O., Duma, C. M., Ellis, R. A., Cornforth, A. N., Schiltz, P. M., Sharp, S. L., and DePriest, M. C. (2009). Intralesional lymphokine-activated killer cells as adjuvant therapy for primary glioblastoma. *Journal of immunotherapy* 32, 914-919.
- Dimov, I., Tasic-Dimov, D., Conic, I., and Stefanovic, V. (2011). Glioblastoma multiforme stem cells. *ScientificWorldJournal* 11, 930-958.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Dong, H., Luo, L., Hong, S., Siu, H., Xiao, Y., Jin, L., Chen, R., and Xiong, M. (2010). Integrated analysis of mutations, miRNA and mRNA expression in glioblastoma. *BMC Syst Biol* 4, 163.
- Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., Roche, P. C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8, 793-800.

- Dorsam, R. T., and Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature reviews Cancer* 7, 79-94.
- Doxsey, S. (2002). Duplicating dangerously: linking centrosome duplication and aneuploidy. *Mol Cell* 10, 439-440.
- Drum, C. L., Yan, S. Z., Bard, J., Shen, Y. Q., Lu, D., Soelaiman, S., Grabarek, Z., Bohm, A., and Tang, W. J. (2002). Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* 415, 396-402.
- Du, L., Wang, H., He, L., Zhang, J., Ni, B., Wang, X., Jin, H., Cahuzac, N., Mehrpour, M., Lu, Y., and Chen, Q. (2008a). CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 6751-6760.
- Du, R., Lu, K. V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegue, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R. S., Werb, Z., and Bergers, G. (2008 b). HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer cell* 13, 206-220.
- Duchen, M. R. (1999). Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *The Journal of physiology* 516 ( Pt 1), 1-17.
- Dufour, C., Cadusseau, J., Varlet, P., Surena, A. L., de Faria, G. P., Dias-Morais, A., Auger, N., Leonard, N., Daudigeos, E., Dantas-Barbosa, C., *et al.* (2009). Astrocytes reverted to a neural progenitor-like state with transforming growth factor alpha are sensitized to cancerous transformation. *Stem Cells* 27, 2373-2382.
- Duijvesz, D., Luider, T., Bangma, C. H., and Jenster, G. (2011). Exosomes as biomarker treasure chests for prostate cancer. *Eur Urol* 59, 823-831.
- Durante, F. (1874). Nesso fisio-pathologico tra la struttura dei nei materni e la genesi di alcuni tumori maligni. *Arch Memor Observ Chir Pract* 11, 217-226.
- Easwaran, H., Johnstone, S. E., Van Neste, L., Ohm, J., Mosbrugger, T., Wang, Q., Aryee, M. J., Joyce, P., Ahuja, N., Weisenberger, D., *et al.* (2012). A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. *Genome Res* 22, 837-849.
- Eden, A., Gaudet, F., Waghmare, A., and Jaenisch, R. (2003). Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 300, 455.
- Ehtesham, M., Winston, J. A., Kabos, P., and Thompson, R. C. (2006). CXCR4 expression mediates glioma cell invasiveness. *Oncogene* 25, 2801-2806.
- Ejendal, K. F., and Hrycyna, C. A. (2002). Multidrug resistance and cancer: the role of the human ABC transporter ABCG2. *Curr Protein Pept Sci* 3, 503-511.
- El Andaloussi, A., and Lesniak, M. S. (2007). CD4+ CD25+ FoxP3+ T-cell infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with tumor grade in human gliomas. *Journal of neuro-oncology* 83, 145-152.
- Elias, M. C., Tozer, K. R., Silber, J. R., Mikheeva, S., Deng, M., Morrison, R. S., Manning, T. C., Silbergeld, D. L., Glackin, C. A., Reh, T. A., and Rostomily, R. C. (2005). TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia* 7, 824-837.
- Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Park, J. O., Lindeman, N., Gale, C. M., Zhao, X., Christensen, J., *et al.* (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043.
- Erickson, M. G., Alseikhan, B. A., Peterson, B. Z., and Yue, D. T. (2001). Preassociation of calmodulin with voltage-gated Ca(2+) channels revealed by FRET in single living cells. *Neuron* 31, 973-985.

- Erickson, M. G., Liang, H., Mori, M. X., and Yue, D. T. (2003). FRET two-hybrid mapping reveals function and location of L-type Ca<sup>2+</sup> channel CaM preassociation. *Neuron* *39*, 97-107.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature medicine* *4*, 1313-1317.
- Escriba, P. V., Gonzalez-Ros, J. M., Goni, F. M., Kinnunen, P. K., Vigh, L., Sanchez-Magraner, L., Fernandez, A. M., Busquets, X., Horvath, I., and Barcelo-Coblijn, G. (2008). Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med* *12*, 829-875.
- Esquela-Kerscher, A., and Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews Cancer* *6*, 259-269.
- Facchino, S., Abdouh, M., Chato, W., and Bernier, G. (2010). BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *30*, 10096-10111.
- Fadul, C. E., Fisher, J. L., Hampton, T. H., Lallana, E. C., Li, Z., Gui, J., Szczepiorkowski, Z. M., Tosteson, T. D., Rhodes, C. H., Wishart, H. A., *et al.* (2011). Immune response in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with intranodal autologous tumor lysate-dendritic cell vaccination after radiation chemotherapy. *Journal of immunotherapy* *34*, 382-389.
- Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J., and Carafoli, E. (1991). The plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J Biol Chem* *266*, 2930-2936.
- Fan, X., Khaki, L., Zhu, T. S., Soules, M. E., Talsma, C. E., Gul, N., Koh, C., Zhang, J., Li, Y. M., Maciaczyk, J., *et al.* (2010). NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* *28*, 5-16.
- Fanelli, M., Caprodossi, S., Ricci-Vitiani, L., Porcellini, A., Tomassoni-Ardori, F., Amatori, S., Andreoni, F., Magnani, M., De Maria, R., Santoni, A., *et al.* (2008). Loss of pericentromeric DNA methylation pattern in human glioblastoma is associated with altered DNA methyltransferases expression and involves the stem cell compartment. *Oncogene* *27*, 358-365.
- Fareh, M., Turchi, L., Virolle, V., Debruyne, D., Almairac, F., de-la-Forest Divonne, S., Paquis, P., Preynat-Seauve, O., Krause, K. H., Chneiweiss, H., and Virolle, T. (2012). The miR 302-367 cluster drastically affects self-renewal and infiltration properties of glioma-initiating cells through CXCR4 repression and consequent disruption of the SHH-GLI-NANOG network. *Cell death and differentiation* *19*, 232-244.
- Feng, M., Grice, D. M., Faddy, H. M., Nguyen, N., Leitch, S., Wang, Y., Muend, S., Kenny, P. A., Sukumar, S., Roberts-Thomson, S. J., *et al.* (2010). Store-independent activation of Orai1 by SPCA2 in mammary tumors. *Cell* *143*, 84-98.
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S. H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* *441*, 179-185.
- Fidler, I. J. (1991). Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Rev* *10*, 229-243.
- Filoteo, A. G., Elwess, N. L., Enyedi, A., Caride, A., Aung, H. H., and Penniston, J. T. (1997). Plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump in rat brain. Patterns of alternative splices seen by isoform-specific antibodies. *The Journal of biological chemistry* *272*, 23741-23747.
- Finn, B. E., Evenas, J., Drakenberg, T., Waltho, J. P., Thulin, E., and Forsen, S. (1995). Calcium-induced structural changes and domain autonomy in calmodulin. *Nature structural biology* *2*, 777-783.

- Fioravante, D., and Regehr, W. G. (2011). Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* *21*, 269-274.
- Folkerth, R. D. (2004). Histologic measures of angiogenesis in human primary brain tumors. *Cancer Treat Res* *117*, 79-95.
- Folkens, C., Shaked, Y., Man, S., Tang, T., Lee, C. R., Zhu, Z., Hoffman, R. M., and Kerbel, R. S. (2009). Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer research* *69*, 7243-7251.
- Förster, T. (1946). *Naturwissenschaften* *6*, 166-175.
- Franciolini, F., and Petris, A. (1989). Evolution of ionic channels of biological membranes. *Mol Biol Evol* *6*, 503-513.
- Frankfurt, O. S., Sugarbaker, E. V., Robb, J. A., and Villa, L. (1995). Synergistic induction of apoptosis in breast cancer cells by tamoxifen and calmodulin inhibitors. *Cancer Lett* *97*, 149-154.
- Friedberg, F., and Rhoads, A. R. (2001). Evolutionary aspects of calmodulin. *IUBMB Life* *51*, 215-221.
- Friedberg, F., and Taliaferro, L. (2005). Calmodulin genes in zebrafish (revisited). *Mol Biol Rep* *32*, 55-60.
- Friedman, H. S., Kerby, T., and Calvert, H. (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *6*, 2585-2597.
- Fujisaki, J., Wu, J., Carlson, A. L., Silberstein, L., Putheti, P., Larocca, R., Gao, W., Saito, T. I., Lo Celso, C., Tsuyuzaki, H., *et al.* (2011). In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* *474*, 216-219.
- Furth, J., and Kahn, M. (1937). The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Ann J Cancer* *31*, 216-282.
- Gal, H., Pandi, G., Kanner, A. A., Ram, Z., Lithwick-Yanai, G., Amariglio, N., Rechavi, G., and Givol, D. (2008). MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* *376*, 86-90.
- Galli, R., Binda, E., Orfanelli, U., Cipelletti, B., Gritti, A., De Vitis, S., Fiocco, R., Foroni, C., Dimeco, F., and Vescovi, A. (2004). Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res* *64*, 7011-7021.
- Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., and Kolesnick, R. (2003). Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science* *300*, 1155-1159.
- Garcia, K., Nabhani, T., and Garcia, J. (2008). The calcium channel alpha2/delta1 subunit is involved in extracellular signalling. *J Physiol* *586*, 727-738.
- Gassmann, P., Haier, J., Schluter, K., Domikowsky, B., Wendel, C., Wiesner, U., Kubitzka, R., Engers, R., Schneider, S. W., Homey, B., and Muller, A. (2009). CXCR4 regulates the early extravasation of metastatic tumor cells in vivo. *Neoplasia* *11*, 651-661.
- Gautier, I., Tramier, M., Durieux, C., Coppey, J., Pansu, R. B., Nicolas, J. C., Kemnitz, K., and Coppey-Moisan, M. (2001). Homo-FRET microscopy in living cells to measure monomer-dimer transition of GFP-tagged proteins. *Biophysical journal* *80*, 3000-3008.
- Gellman, S. H. (1991). On the role of methionine residues in the sequence-independent recognition of nonpolar protein surfaces. *Biochemistry* *30*, 6633-6636.

- Genazzani, A. A., and Galione, A. (1997). A Ca<sup>2+</sup> release mechanism gated by the novel pyridine nucleotide, NAADP. *Trends in pharmacological sciences* *18*, 108-110.
- Giancotti, F. G. (2007). Targeting integrin beta4 for cancer and anti-angiogenic therapy. *Trends Pharmacol Sci* *28*, 506-511.
- Gietzen, K., Adamczyk-Engelmann, P., Wuthrich, A., Konstantinova, A., and Bader, H. (1983). Compound 48/80 is a selective and powerful inhibitor of calmodulin-regulated functions. *Biochimica et biophysica acta* *736*, 109-118.
- Gietzen, K., Wuthrich, A., and Bader, H. (1981). R 24571: a new powerful inhibitor of red blood cell Ca<sup>++</sup>-transport ATPase and of calmodulin-regulated functions. *Biochemical and biophysical research communications* *101*, 418-425.
- Gifford, J. L., Walsh, M. P., and Vogel, H. J. (2007). Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs. *Biochem J* *405*, 199-221.
- Gil-Perotin, S., Marin-Husstege, M., Li, J., Soriano-Navarro, M., Zindy, F., Roussel, M. F., Garcia-Verdugo, J. M., and Casaccia-Bonnel, P. (2006). Loss of p53 induces changes in the behavior of subventricular zone cells: implication for the genesis of glial tumors. *J Neurosci* *26*, 1107-1116.
- Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* *7*, 667-677.
- Gilli, R., Lafitte, D., Lopez, C., Kilhoffer, M., Makarov, A., Briand, C., and Haiech, J. (1998). Thermodynamic analysis of calcium and magnesium binding to calmodulin. *Biochemistry* *37*, 5450-5456.
- Ginestra, A., La Placa, M. D., Saladino, F., Cassara, D., Nagase, H., and Vittorelli, M. L. (1998). The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res* *18*, 3433-3437.
- Ginestra, A., Miceli, D., Dolo, V., Romano, F. M., and Vittorelli, M. L. (1999). Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res* *19*, 3439-3445.
- Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodriguez-Piza, I., Vassena, R., Raya, A., Boue, S., Barrero, M. J., Corbella, B. A., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell stem cell* *5*, 353-357.
- Giridhar, P. V., Funk, H. M., Gallo, C. A., Porollo, A., Mercer, C. A., Plas, D. R., and Drew, A. F. (2011). Interleukin-6 receptor enhances early colonization of the murine omentum by upregulation of a mannose family receptor, LY75, in ovarian tumor cells. *Clinical & experimental metastasis* *28*, 887-897.
- Godlewski, J., Nowicki, M. O., Bronisz, A., Nuovo, G., Palatini, J., De Lay, M., Van Brocklyn, J., Ostrowski, M. C., Chiocca, E. A., and Lawler, S. E. (2010). MicroRNA-451 regulates LKB1/AMPK signaling and allows adaptation to metabolic stress in glioma cells. *Mol Cell* *37*, 620-632.
- Godlewski, J., Nowicki, M. O., Bronisz, A., Williams, S., Otsuki, A., Nuovo, G., Raychaudhury, A., Newton, H. B., Chiocca, E. A., and Lawler, S. (2008). Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer research* *68*, 9125-9130.
- Gonzalez-Gomez, P., Sanchez, P., and Mira, H. (2011). MicroRNAs as regulators of neural stem cell-related pathways in glioblastoma multiforme. *Mol Neurobiol* *44*, 235-249.
- Gottesman, M. M., Ludwig, J., Xia, D., and Szakacs, G. (2006). Defeating drug resistance in cancer. *Discov Med* *6*, 18-23.

- Grabarek, Z. (2006). Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *J Mol Biol* 359, 509-525.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P., and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749-765.
- Grauer, O. M., Nierkens, S., Bennink, E., Toonen, L. W., Boon, L., Wesseling, P., Suttmuller, R. P., and Adema, G. J. (2007). CD4+FoxP3+ regulatory T cells gradually accumulate in gliomas during tumor growth and efficiently suppress antiglioma immune responses in vivo. *International journal of cancer Journal international du cancer* 121, 95-105.
- Grigorian, M., Andresen, S., Tulchinsky, E., Kriajevska, M., Carlberg, C., Kruse, C., Cohn, M., Ambartsumian, N., Christensen, A., Selivanova, G., and Lukanidin, E. (2001). Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *The Journal of biological chemistry* 276, 22699-22708.
- Griguer, C. E., Oliva, C. R., Gobin, E., Marcorelles, P., Benos, D. J., Lancaster, J. R., Jr., and Gillespie, G. Y. (2008). CD133 is a marker of bioenergetic stress in human glioma. *PloS one* 3, e3655.
- Gschwind, A., Fischer, O. M., and Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 4, 361-370.
- Gunther, H. S., Schmidt, N. O., Phillips, H. S., Kemming, D., Kharbanda, S., Soriano, R., Modrusan, Z., Meissner, H., Westphal, M., and Lamszus, K. (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* 27, 2897-2909.
- Guo, P., Hu, B., Gu, W., Xu, L., Wang, D., Huang, H. J., Cavenee, W. K., and Cheng, S. Y. (2003). Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol* 162, 1083-1093.
- Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J. L., Poellinger, L., Lendahl, U., and Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 9, 617-628.
- Hahn, K., DeBiasio, R., and Taylor, D. L. (1992). Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells. *Nature* 359, 736-738.
- Haiech, J., Audran, E., Feve, M., Ranjeva, R., and Kilhoffer, M. C. (2011). Revisiting intracellular calcium signaling semantics. *Biochimie* 93, 2029-2037.
- Haiech, J., and Demaille, J. G. (1981). Supramolecular organization of regulatory proteins into calcisomes: a model of the concerted regulation by calcium ions and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in eukaryotic cells. In *Metabolic Interconversion of Enzymes*, pp. 303-313.
- Haiech, J., Klee, C. B., and Demaille, J. G. (1981). Effects of cations on affinity of calmodulin for calcium: ordered binding of calcium ions allows the specific activation of calmodulin-stimulated enzymes. *Biochemistry* 20, 3890-3897.
- Haiech, J., Moulhaye, S. B., and Kilhoffer, M. C. (2004). The EF-Handome: combining comparative genomic study using FamDBtool, a new bioinformatics tool, and the network of expertise of the European Calcium Society. *Biochim Biophys Acta* 1742, 179-183.
- Hait, W. N., and Lazo, J. S. (1986). Calmodulin: a potential target for cancer chemotherapeutic agents. *J Clin Oncol* 4, 994-1012.
- Hamburger, A. W., and Salmon, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463.



- Hanash, S. M., Pitteri, S. J., and Faca, V. M. (2008). Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature* 452, 571-579.
- Hao, J., Wang, K., Yue, Y., Tian, T., Xu, A., Xiao, X., and He, D. (2012). Selective expression of S100A11 in lung cancer and its role in regulating proliferation of adenocarcinomas cells. *Molecular and cellular biochemistry* 359, 323-332.
- Harris, M. A., Yang, H., Low, B. E., Mukherjee, J., Guha, A., Bronson, R. T., Shultz, L. D., Israel, M. A., and Yun, K. (2008). Cancer stem cells are enriched in the side population cells in a mouse model of glioma. *Cancer research* 68, 10051-10059.
- Hashimoto, M., Ichihara, M., Watanabe, T., Kawai, K., Koshikawa, K., Yuasa, N., Takahashi, T., Yatabe, Y., Murakumo, Y., Zhang, J. M., *et al.* (2004). Expression of CD109 in human cancer. *Oncogene* 23, 3716-3720.
- Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J. W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R. K., and McDonald, D. M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *The American journal of pathology* 156, 1363-1380.
- Haura, E. B., Turkson, J., and Jove, R. (2005). Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2, 315-324.
- Heddleston, J. M., Li, Z., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2009). The hypoxic microenvironment maintains glioblastoma stem cells and promotes reprogramming towards a cancer stem cell phenotype. *Cell Cycle* 8, 3274-3284.
- Hegemann, L., Toso, S. M., Lahijani, K. I., Webster, G. F., and Uitto, J. (1993). Direct interaction of antifungal azole-derivatives with calmodulin: a possible mechanism for their therapeutic activity. *J Invest Dermatol* 100, 343-346.
- Hegi, M. E., Diserens, A. C., Gorlia, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., Mariani, L., *et al.* (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003.
- Hemmati, H. D., Nakano, I., Lazareff, J. A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D. H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H. I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15178-15183.
- Herzberg, O., Moulton, J., and James, M. N. (1986). A model for the Ca<sup>2+</sup>-induced conformational transition of troponin C. A trigger for muscle contraction. *The Journal of biological chemistry* 261, 2638-2644.
- Hidaka, H., Asano, M., Iwadare, S., Matsumoto, I., Totsuka, T., and Aoki, N. (1978). A novel vascular relaxing agent, N-(6--aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalensulfonamide which affects vascular smooth muscle actomyosin. *J Pharmacol Exp Ther* 207, 8-15.
- Hidaka, H., Asano, M., and Tanaka, T. (1981). Activity-structure relationship of calmodulin antagonists, Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol* 20, 571-578.
- Himpens, B., and Vereecke, J. (2000). [Intra- and intercellular Ca<sup>2+</sup>]-signal transduction]. *Verh K Acad Geneesk Belg* 62, 501-563.
- Hinkovska-Galcheva, V., VanWay, S. M., Shanley, T. P., and Kunkel, R. G. (2008). The role of sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate in calcium homeostasis. *Curr Opin Investig Drugs* 9, 1192-1205.
- Hirose, Y., Berger, M. S., and Pieper, R. O. (2001). p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer research* 61, 1957-1963.

- Hjelmeland, A. B., Wu, Q., Heddlestone, J. M., Choudhary, G. S., MacSwords, J., Lathia, J. D., McLendon, R., Lindner, D., Sloan, A., and Rich, J. N. (2011). Acidic stress promotes a glioma stem cell phenotype. *Cell death and differentiation* *18*, 829-840.
- Hjelmeland, A. B., Wu, Q., Wickman, S., Eyler, C., Heddlestone, J., Shi, Q., Lathia, J. D., Macswords, J., Lee, J., McLendon, R. E., and Rich, J. N. (2010). Targeting A20 decreases glioma stem cell survival and tumor growth. *PLoS Biol* *8*, e1000319.
- Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* *136*, 509-523.
- Hoeflich, K. P., and Ikura, M. (2002). Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* *108*, 739-742.
- Hoelzinger, D. B., Demuth, T., and Berens, M. E. (2007). Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment. *J Natl Cancer Inst* *99*, 1583-1593.
- Hofer, A. M., Curci, S., Doble, M. A., Brown, E. M., and Soybel, D. I. (2000). Intercellular communication mediated by the extracellular calcium-sensing receptor. *Nat Cell Biol* *2*, 392-398.
- Hofmann, T., Obukhov, A. G., Schaefer, M., Harteneck, C., Gudermann, T., and Schultz, G. (1999). Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature* *397*, 259-263.
- Holland, E. C. (2001). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* *2*, 120-129.
- Holland, E. C., Celestino, J., Dai, C., Schaefer, L., Sawaya, R. E., and Fuller, G. N. (2000). Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* *25*, 55-57.
- Holm, T. M., Jackson-Grusby, L., Brambrink, T., Yamada, Y., Rideout, W. M., 3rd, and Jaenisch, R. (2005). Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer cell* *8*, 275-285.
- Holmgren, L., O'Reilly, M. S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature medicine* *1*, 149-153.
- Hood, J. D., and Cheresch, D. A. (2002). Role of integrins in cell invasion and migration. *Nature reviews Cancer* *2*, 91-100.
- Hope, K. J., Jin, L., and Dick, J. E. (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol* *5*, 738-743.
- Hopson, K. P., Truelove, J., Chun, J., Wang, Y., and Waeber, C. (2011). S1P activates store-operated calcium entry via receptor- and non-receptor-mediated pathways in vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology Cell physiology* *300*, C919-926.
- Hsu, S. S., Chen, C. H., Liu, G. S., Tai, M. H., Wang, J. S., Wu, J. C., Kung, M. L., Chan, E. C., and Liu, L. F. (2012). Tumorigenesis and prognostic role of hepatoma-derived growth factor in human gliomas. *Journal of neuro-oncology* *107*, 101-109.
- Hu, Y., Ylivinkka, I., Chen, P., Li, L., Hautaniemi, S., Nyman, T. A., Keski-Oja, J., and Hyytiainen, M. (2012). Netrin-4 promotes glioblastoma cell proliferation through integrin beta4 signaling. *Neoplasia* *14*, 219-227.
- Huang, D. C., Hahne, M., Schroeter, M., Frei, K., Fontana, A., Villunger, A., Newton, K., Tschopp, J., and Strasser, A. (1999). Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *96*, 14871-14876.
- Hunter, D. R., Haworth, R. A., and Southard, J. H. (1976). Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *The Journal of biological chemistry* *251*, 5069-5077.



- Ichas, F., Jouaville, L. S., and Mazat, J. P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* *89*, 1145-1153.
- Ichas, F., and Mazat, J. P. (1998). From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochimica et biophysica acta* *1366*, 33-50.
- Ignatova, T. N., Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O. N., Vrionis, F. D., and Steindler, D. A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* *39*, 193-206.
- Iino, M. (1990). Biphasic Ca<sup>2+</sup> dependence of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca release in smooth muscle cells of the guinea pig taenia caeci. *The Journal of general physiology* *95*, 1103-1122.
- Ikura, M. (1996). Calcium binding and conformational response in EF-hand proteins. *Trends Biochem Sci* *21*, 14-17.
- Ikura, M., and Ames, J. B. (2006). Genetic polymorphism and protein conformational plasticity in the calmodulin superfamily: two ways to promote multifunctionality. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 1159-1164.
- Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C. B., and Bax, A. (1992). Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* *256*, 632-638.
- Inda, M. M., Bonavia, R., Mukasa, A., Narita, Y., Sah, D. W., Vandenberg, S., Brennan, C., Johns, T. G., Bachoo, R., Hadwiger, P., *et al.* (2010). Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes & development* *24*, 1731-1745.
- Iwadata, Y., Sakaida, T., Hiwasa, T., Nagai, Y., Ishikura, H., Takiguchi, M., and Yamaura, A. (2004). Molecular classification and survival prediction in human gliomas based on proteome analysis. *Cancer research* *64*, 2496-2501.
- Jackson, E. B., and Brues, A. M. (1941). Studies on a transplantable embryoma of the mouse. *Cancer Research* *1*, 494-498.
- Jacques, T. S., Swales, A., Brzozowski, M. J., Henriquez, N. V., Linehan, J. M., Mirzadeh, Z., C, O. M., Naumann, H., Alvarez-Buylla, A., and Brandner, S. (2010). Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. *Embo J* *29*, 222-235.
- Janouskova, H., Maglott, A., Leger, D. Y., Bossert, C., Noulet, F., Guerin, E., Guenot, D., Pinel, S., Chastagner, P., Plenat, F., *et al.* (2012). Integrin alpha5beta1 plays a critical role in resistance to temozolomide by interfering with the p53 pathway in high grade glioma. *Cancer research*.
- Jiang, Z., Pore, N., Cerniglia, G. J., Mick, R., Georgescu, M. M., Bernhard, E. J., Hahn, S. M., Gupta, A. K., and Maity, A. (2007). Phosphatase and tensin homologue deficiency in glioblastoma confers resistance to radiation and temozolomide that is reversed by the protease inhibitor nelfinavir. *Cancer research* *67*, 4467-4473.
- Jin, X., Jeon, H. Y., Joo, K. M., Kim, J. K., Jin, J., Kim, S. H., Kang, B. G., Beck, S., Lee, S. J., Park, A. K., *et al.* (2011). Frizzled 4 regulates stemness and invasiveness of migrating glioma cells established by serial intracranial transplantation. *Cancer Res* *71*, 3066-3075.
- Jopling, C., Boue, S., and Izpisua Belmonte, J. C. (2011). Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* *12*, 79-89.
- Jordan, J. T., Sun, W., Hussain, S. F., DeAngulo, G., Prabhu, S. S., and Heimberger, A. B. (2008). Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* *57*, 123-131.

- Josic, D., and Clifton, J. G. (2007). Mammalian plasma membrane proteomics. *Proteomics* 7, 3010-3029.
- Jurado, L. A., Chockalingam, P. S., and Jarrett, H. W. (1999). Apocalmodulin. *Physiological reviews* 79, 661-682.
- Kahl, C. R., and Means, A. R. (2003). Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev* 24, 719-736.
- Kahlert, U., Maciaczyk, D., Doostkam, S., Orr, B. A., Simons, B., Bogiel, T., Reithmeier, T., Prinz, M., Schubert, J., Niedermann, G., *et al.* (2012). Activation of canonical WNT/beta-catenin signaling enhances in vitro motility of glioblastoma cells by activation of ZEB1 and other activators of epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer letters*.
- Kakiuchi, S., and Yamazaki, R. (1970). Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (3). *Biochem Biophys Res Commun* 41, 1104-1110.
- Kalluri, R., and Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428.
- Kanamaru, K., Kashiwagi, S., and Mizuno, T. (1993). The cyanobacterium, *Synechococcus* sp. PCC7942, possesses two distinct genes encoding cation-transporting P-type ATPases. *FEBS letters* 330, 99-104.
- Kanamori, M., Kawaguchi, T., Berger, M. S., and Pieper, R. O. (2006). Intracranial microenvironment reveals independent opposing functions of host alphaVbeta3 expression on glioma growth and angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* 281, 37256-37264.
- Kanamori, M., Kawaguchi, T., Nigro, J. M., Feuerstein, B. G., Berger, M. S., Miele, L., and Pieper, R. O. (2007). Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 106, 417-427.
- Kang, L., Wu, T., Tao, Y., Yuan, Y., He, J., Zhang, Y., Luo, T., Kou, Z., and Gao, S. (2011). Viable mice produced from three-factor induced pluripotent stem (iPS) cells through tetraploid complementation. *Cell Res* 21, 546-549.
- Kania, G., Corbeil, D., Fuchs, J., Tarasov, K. V., Blyszczuk, P., Huttner, W. B., Boheler, K. R., and Wobus, A. M. (2005). Somatic stem cell marker prominin-1/CD133 is expressed in embryonic stem cell-derived progenitors. *Stem cells* 23, 791-804.
- Kaplan, C. D., Kruger, J. A., Zhou, H., Luo, Y., Xiang, R., and Reisfeld, R. A. (2006). A novel DNA vaccine encoding PDGFRbeta suppresses growth and dissemination of murine colon, lung and breast carcinoma. *Vaccine* 24, 6994-7002.
- Kar, G., Gursoy, A., and Keskin, O. (2009). Human cancer protein-protein interaction network: a structural perspective. *PLoS Comput Biol* 5, e1000601.
- Karran, P., Macpherson, P., Ceccotti, S., Dogliotti, E., Griffin, S., and Bignami, M. (1993). O6-methylguanine residues elicit DNA repair synthesis by human cell extracts. *The Journal of biological chemistry* 268, 15878-15886.
- Karrison, T. G., Ferguson, D. J., and Meier, P. (1999). Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *Journal of the National Cancer Institute* 91, 80-85.
- Katakowski, M., Buller, B., Wang, X., Rogers, T., and Chopp, M. (2010). Functional microRNA is transferred between glioma cells. *Cancer research* 70, 8259-8263.
- Katoh, M. (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13, 4042-4045.

- Kaupp, U. B., and Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological reviews* 82, 769-824.
- Keeton, T. P., Burk, S. E., and Shull, G. E. (1993). Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4. *The Journal of biological chemistry* 268, 2740-2748.
- Kefas, B., Godlewski, J., Comeau, L., Li, Y., Abounader, R., Hawkinson, M., Lee, J., Fine, H., Chiocca, E. A., Lawler, S., and Purow, B. (2008). microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer research* 68, 3566-3572.
- Keith, B., and Simon, M. C. (2007). Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 129, 465-472.
- Khan, M. Z., Brandimarti, R., Musser, B. J., Resue, D. M., Fatatis, A., and Meucci, O. (2003). The chemokine receptor CXCR4 regulates cell-cycle proteins in neurons. *J Neurovirol* 9, 300-314.
- Khan, O., and La Thangue, N. B. (2012). HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol* 90, 85-94.
- Khoshyomn, S., Penar, P. L., Wadsworth, M. P., and Taatjes, D. J. (1997). Localization of CD44 at the invasive margin of glioblastomas by immunoelectron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 21, 517-525.
- Kilhoffer, M. C., Kubina, M., Travers, F., and Haiech, J. (1992). Use of engineered proteins with internal tryptophan reporter groups and perturbation techniques to probe the mechanism of ligand-protein interactions: investigation of the mechanism of calcium binding to calmodulin. *Biochemistry* 31, 8098-8106.
- Kilhoffer, M. C., Roberts, D. M., Adibi, A. O., Watterson, D. M., and Haiech, J. (1988). Investigation of the mechanism of calcium binding to calmodulin. Use of an isofunctional mutant with a tryptophan introduced by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 263, 17023-17029.
- Kim, D., Jun, K. S., Lee, S. B., Kang, N. G., Min, D. S., Kim, Y. H., Ryu, S. H., Suh, P. G., and Shin, H. S. (1997). Phospholipase C isozymes selectively couple to specific neurotransmitter receptors. *Nature* 389, 290-293.
- Kim, H., Huang, W., Jiang, X., Pennicooke, B., Park, P. J., and Johnson, M. D. (2011a). Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kim, J. B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M. J., Meyer, J., Park, K. I., Zaehres, H., and Scholer, H. R. (2009). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649-643.
- Kim, T. M., Huang, W., Park, R., Park, P. J., and Johnson, M. D. (2011b). A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by MicroRNAs. *Cancer research* 71, 3387-3399.
- Kim, Y., Kim, K. H., Lee, J., Lee, Y. A., Kim, M., Lee, S. J., Park, K., Yang, H., Jin, J., Joo, K. M., and Nam, D. H. (2012). Wnt activation is implicated in glioblastoma radioresistance. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92, 466-473.
- King, C. E., Wang, L., Winograd, R., Madison, B. B., Mongroo, P. S., Johnstone, C. N., and Rustgi, A. K. (2011). LIN28B fosters colon cancer migration, invasion and transformation through let-7-dependent and -independent mechanisms. *Oncogene* 30, 4185-4193.
- Kippert, F. (1987). Endocytobiotic coordination, intracellular calcium signaling, and the origin of endogenous rhythms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 503, 476-495.
- Kleinsmith, L. J., and Pierce, G. B., Jr. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer research* 24, 1544-1551.

- Knoop, A. S., Bentzen, S. M., Nielsen, M. M., Rasmussen, B. B., and Rose, C. (2001). Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 19, 3376-3384.
- Kobe, B., Heierhorst, J., and Kemp, B. E. (1997). Intracellular regulation of protein kinases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31, 29-40.
- Kops, G. J., Weaver, B. A., and Cleveland, D. W. (2005). On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature reviews Cancer* 5, 773-785.
- Kotake, Y., Cao, R., Viatour, P., Sage, J., Zhang, Y., and Xiong, Y. (2007). pRB family proteins are required for H3K27 trimethylation and Polycomb repression complexes binding to and silencing p16INK4alpha tumor suppressor gene. *Genes & development* 21, 49-54.
- Kretsinger, R. H., and Nockolds, C. E. (1973). Carp muscle calcium-binding protein. II. Structure determination and general description. *The Journal of biological chemistry* 248, 3313-3326.
- Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci* 32, 149-184.
- Krivtsov, A. V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M. C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J. E., Wang, J., Hahn, W. C., Gilliland, D. G., *et al.* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 818-822.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305, 567-580.
- Ku, B. M., Lee, Y. K., Ryu, J., Jeong, J. Y., Choi, J., Eun, K. M., Shin, H. Y., Kim, D. G., Hwang, E. M., Yoo, J. C., *et al.* (2011). CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 128, 1316-1326.
- Kucharczak, J., Pannequin, J., Camby, I., Decaestecker, C., Kiss, R., and Martinez, J. (2001). Gastrin induces over-expression of genes involved in human U373 glioblastoma cell migration. *Oncogene* 20, 7021-7028.
- Landriscina, M., Schinzari, G., Di Leonardo, G., Quirino, M., Cassano, A., D'Argento, E., Lauriola, L., Scerrati, M., Prudovsky, I., and Barone, C. (2006). S100A13, a new marker of angiogenesis in human astrocytic gliomas. *J Neurooncol* 80, 251-259.
- Lang, M. F., Yang, S., Zhao, C., Sun, G., Murai, K., Wu, X., Wang, J., Gao, H., Brown, C. E., Liu, X., *et al.* (2012). Genome-Wide Profiling Identified a Set of miRNAs that Are Differentially Expressed in Glioblastoma Stem Cells and Normal Neural Stem Cells. *PloS one* 7, e36248.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M. A., and Dick, J. E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- Lathia, J. D., Gallagher, J., Heddleston, J. M., Wang, J., Eyler, C. E., Macsworlds, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R. E., Hjelmeland, A. B., and Rich, J. N. (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421-432.
- Lathia, J. D., Mattson, M. P., and Cheng, A. (2008). Notch: from neural development to neurological disorders. *J Neurochem* 107, 1471-1481.
- Le, D. M., Besson, A., Fogg, D. K., Choi, K. S., Waisman, D. M., Goodyer, C. G., Rewcastle, B., and Yong, V. W. (2003). Exploitation of astrocytes by glioma cells to facilitate invasiveness: a mechanism involving matrix metalloproteinase-2 and the urokinase-type plasminogen activator-plasmin cascade. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 4034-4043.

- Lee, A., Wong, S. T., Gallagher, D., Li, B., Storm, D. R., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1999). Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binds to and modulates P/Q-type calcium channels. *Nature* *399*, 155-159.
- Lee, H. C. (1997). Mechanisms of calcium signaling by cyclic ADP-ribose and NAADP. *Physiological reviews* *77*, 1133-1164.
- Lee, J., Kotliarova, S., Kotliarov, Y., Li, A., Su, Q., Donin, N. M., Pastorino, S., Purow, B. W., Christopher, N., Zhang, W., *et al.* (2006a). Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* *9*, 391-403.
- Lee, S. H., Schwaller, B., and Neher, E. (2000). Kinetics of Ca<sup>2+</sup> binding to parvalbumin in bovine chromaffin cells: implications for [Ca<sup>2+</sup>] transients of neuronal dendrites. *The Journal of physiology* *525 Pt 2*, 419-432.
- Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K., *et al.* (2006b). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* *125*, 301-313.
- Lee, Y. C., Block, G., Chen, H., Folch-Puy, E., Foronjy, R., Jalili, R., Jendresen, C. B., Kimura, M., Kraft, E., Lindemose, S., *et al.* (2008). One-step isolation of plasma membrane proteins using magnetic beads with immobilized concanavalin A. *Protein Expr Purif* *62*, 223-229.
- Leek, R. D., Lewis, C. E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J., and Harris, A. L. (1996). Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer research* *56*, 4625-4629.
- Leth-Larsen, R., Lund, R. R., and Ditzel, H. J. (2010). Plasma membrane proteomics and its application in clinical cancer biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* *9*, 1369-1382.
- Levan, A., Nichols, W. W., and Norden, A. (1963). A case of chronic myeloid leukemia with two leukemic stemlines in the blood. *Hereditas* *49*, 434-441.
- Levchenko, A., Mehta, B. M., Niu, X., Kang, G., Villafania, L., Way, D., Polycarpe, D., Sadelain, M., and Larson, S. M. (2005). Intercellular transfer of P-glycoprotein mediates acquired multidrug resistance in tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 1933-1938.
- Levin, R. M., and Weiss, B. (1977). Binding of trifluoperazine to the calcium-dependent activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Mol Pharmacol* *13*, 690-697.
- Li, C., Heidt, D. G., Dalerba, P., Burant, C. F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M. F., and Simeone, D. M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* *67*, 1030-1037.
- Li, C. J., Heim, R., Lu, P., Pu, Y., Tsien, R. Y., and Chang, D. C. (1999). Dynamic redistribution of calmodulin in HeLa cells during cell division as revealed by a GFP-calmodulin fusion protein technique. *J Cell Sci* *112 ( Pt 10)*, 1567-1577.
- Li, H., Ruano, M. J., and Villalobo, A. (2004a). Endogenous calmodulin interacts with the epidermal growth factor receptor in living cells. *FEBS Lett* *559*, 175-180.
- Li, H., Sanchez-Torres, J., Del Carpio, A., Salas, V., and Villalobo, A. (2004 b). The ErbB2/Neu/HER2 receptor is a new calmodulin-binding protein. *Biochem J* *381*, 257-266.
- Li, H. F., Kim, J. S., and Waldman, T. (2009a). Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiat Oncol* *4*, 43.
- Li, W., Halling, D. B., Hall, A. W., and Aldrich, R. W. (2009 b). EF hands at the N-lobe of calmodulin are required for both SK channel gating and stable SK-calmodulin interaction. *J Gen Physiol* *134*, 281-293.

- Li, Y., and Lathera, J. (2012). Cancer stem cells: distinct entities or dynamically regulated phenotypes? *Cancer research* 72, 576-580.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R. E., *et al.* (2009c). Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer cell* 15, 501-513.
- Liau, L. M., Prins, R. M., Kiertscher, S. M., Odesa, S. K., Kremen, T. J., Giovannone, A. J., Lin, J. W., Chute, D. J., Mischel, P. S., Cloughesy, T. F., and Roth, M. D. (2005). Dendritic cell vaccination in glioblastoma patients induces systemic and intracranial T-cell responses modulated by the local central nervous system tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 11, 5515-5525.
- Ligon, K. L., Huillard, E., Mehta, S., Kesari, S., Liu, H., Alberta, J. A., Bachoo, R. M., Kane, M., Louis, D. N., Depinho, R. A., *et al.* (2007). Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* 53, 503-517.
- Lin, S. L., Chang, D. C., Chang-Lin, S., Lin, C. H., Wu, D. T., Chen, D. T., and Ying, S. Y. (2008). Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *Rna* 14, 2115-2124.
- Linse, S., Helmersson, A., and Forsen, S. (1991). Calcium binding to calmodulin and its globular domains. *The Journal of biological chemistry* 266, 8050-8054.
- Liou, J., Kim, M. L., Heo, W. D., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., Jr., and Meyer, T. (2005). STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *Current biology : CB* 15, 1235-1241.
- Lipp, P., and Niggli, E. (1994). Sodium current-induced calcium signals in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *The Journal of physiology* 474, 439-446.
- Lipp, P., Thomas, D., Berridge, M. J., and Bootman, M. D. (1997). Nuclear calcium signalling by individual cytoplasmic calcium puffs. *The EMBO journal* 16, 7166-7173.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L., and Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 5, 67.
- Liu, R., Zhang, Y., Chen, Y., Qi, J., Ren, S., Xushi, M. Y., Yang, C., Zhu, H., and Xiong, D. (2010a). A novel calmodulin antagonist O-(4-ethoxyl-butyl)-berbamine overcomes multidrug resistance in drug-resistant MCF-7/ADR breast carcinoma cells. *J Pharm Sci* 99, 3266-3275.
- Liu, W., Fu, Y., Xu, S., Ding, F., Zhao, G., Zhang, K., Du, C., Pang, B., and Pang, Q. (2011). c-Met expression is associated with time to recurrence in patients with glioblastoma multiforme. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 18, 119-121.
- Liu, X. G., Wang, X. P., Li, W. F., Yang, S., Zhou, X., Li, S. J., Li, X. J., Hao, D. Y., and Fan, Z. M. (2010 b). Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100A11: a novel diagnostic marker for breast carcinoma. *Oncology reports* 23, 1301-1308.
- Lottaz, C., Beier, D., Meyer, K., Kumar, P., Hermann, A., Schwarz, J., Junker, M., Oefner, P. J., Bogdahn, U., Wischhusen, J., *et al.* (2010). Transcriptional profiles of CD133+ and CD133- glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res* 70, 2030-2040.
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Cavenee, W. K., Burger, P. C., Jouvett, A., Scheithauer, B. W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114, 97-109.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., *et al.* (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.



- Luby-Phelps, K., Hori, M., Phelps, J. M., and Won, D. (1995). Ca<sup>2+</sup>-regulated dynamic compartmentalization of calmodulin in living smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 21532-21538.
- Lucio-Eterovic, A. K., Cortez, M. A., Valera, E. T., Motta, F. J., Queiroz, R. G., Machado, H. R., Carlotti, C. G., Jr., Neder, L., Scrideli, C. A., and Tone, L. G. (2008). Differential expression of 12 histone deacetylase (HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoxexpressed in glioblastomas. *BMC cancer* 8, 243.
- Luik, R. M., Wu, M. M., Buchanan, J., and Lewis, R. S. (2006). The elementary unit of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions. *J Cell Biol* 174, 815-825.
- Lund, R., Leth-Larsen, R., Jensen, O. N., and Ditzel, H. J. (2009). Efficient isolation and quantitative proteomic analysis of cancer cell plasma membrane proteins for identification of metastasis-associated cell surface markers. *Journal of proteome research* 8, 3078-3090.
- Lytton, J. (2007). Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers: three mammalian gene families control Ca<sup>2+</sup> transport. *The Biochemical journal* 406, 365-382.
- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., and Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry* 272, 25417-25420.
- Maderna, E., Salmaggi, A., Calatuzzolo, C., Limido, L., and Pollo, B. (2007). Nestin, PDGFRbeta, CXCL12 and VEGF in glioma patients: different profiles of (pro-angiogenic) molecule expression are related with tumor grade and may provide prognostic information. *Cancer biology & therapy* 6, 1018-1024.
- Maler, L., Blankenship, J., Rance, M., and Chazin, W. J. (2000). Site-site communication in the EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding protein calbindin D9k. *Nature structural biology* 7, 245-250.
- Mallanna, S. K., and Rizzino, A. (2010). Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Dev Biol* 344, 16-25.
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., *et al.* (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704-715.
- Manna, B., Bhattacharya, T., Kahali, B., and Ghosh, T. C. (2009). Evolutionary constraints on hub and non-hub proteins in human protein interaction network: insight from protein connectivity and intrinsic disorder. *Gene* 434, 50-55.
- Mao, C., Kim, S. H., Almenoff, J. S., Rudner, X. L., Kearney, D. M., and Kindman, L. A. (1996). Molecular cloning and characterization of SCAMPER, a sphingolipid Ca<sup>2+</sup> release-mediating protein from endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1993-1996.
- Marchant, J. S., and Taylor, C. W. (1997). Cooperative activation of IP<sub>3</sub> receptors by sequential binding of IP<sub>3</sub> and Ca<sup>2+</sup> safeguards against spontaneous activity. *Current biology : CB* 7, 510-518.
- Marchion, D. C., Bicaku, E., Turner, J. G., Schmitt, M. L., Morelli, D. R., and Munster, P. N. (2009). HDAC2 regulates chromatin plasticity and enhances DNA vulnerability. *Molecular cancer therapeutics* 8, 794-801.
- Martin, V., Bredoux, R., Corvazier, E., Van Gorp, R., Kovacs, T., Gelebart, P., and Enouf, J. (2002). Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family. *The Journal of biological chemistry* 277, 24442-24452.
- Martinez-Outschoorn, U. E., Lin, Z., Trimmer, C., Flomenberg, N., Wang, C., Pavlides, S., Pestell, R. G., Howell, A., Sotgia, F., and Lisanti, M. P. (2011a). Cancer cells metabolically "fertilize" the tumor

microenvironment with hydrogen peroxide, driving the Warburg effect: implications for PET imaging of human tumors. *Cell Cycle* 10, 2504-2520.

Martinez-Outschoorn, U. E., Pestell, R. G., Howell, A., Tykocinski, M. L., Nagajyothi, F., Machado, F. S., Tanowitz, H. B., Sotgia, F., and Lisanti, M. P. (2011 b). Energy transfer in "parasitic" cancer metabolism: mitochondria are the powerhouse and Achilles' heel of tumor cells. *Cell Cycle* 10, 4208-4216.

Maximciuc, A. A., Putkey, J. A., Shamoo, Y., and Mackenzie, K. R. (2006). Complex of calmodulin with a ryanodine receptor target reveals a novel, flexible binding mode. *Structure* 14, 1547-1556.

Mayer, S., zur Hausen, A., Watermann, D. O., Stamm, S., Jager, M., Gitsch, G., and Stickeler, E. (2008). Increased soluble CD44 concentrations are associated with larger tumor size and lymph node metastasis in breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 134, 1229-1235.

Mayur, Y. C., Jagadeesh, S., and Thimmaiah, K. N. (2006a). Targeting calmodulin in reversing multi drug resistance in cancer cells. *Mini Rev Med Chem* 6, 1383-1389.

Mayur, Y. C., Jagadeesh, S., and Thimmaiah, K. N. (2006b). Targeting calmodulin in reversing multi drug resistance in cancer cells. *Mini Rev Med Chem* 6, 1383-1389.

McCord, A. M., Jamal, M., Shankavaram, U. T., Lang, F. F., Camphausen, K., and Tofilon, P. J. (2009). Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Molecular cancer research : MCR* 7, 489-497.

McCormack, E., Tsai, Y. C., and Braam, J. (2005). Handling calcium signaling: Arabidopsis CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci* 10, 383-389.

McKiernan, E., McDermott, E. W., Evoy, D., Crown, J., and Duffy, M. J. (2011). The role of S100 genes in breast cancer progression. *Tumour Biol* 32, 441-450.

McLaughlin, S., Mulrine, N., Gresalfi, T., Vaio, G., and McLaughlin, A. (1981). Adsorption of divalent cations to bilayer membranes containing phosphatidylserine. *The Journal of general physiology* 77, 445-473.

McNally, B. A., Somasundaram, A., Yamashita, M., and Prakriya, M. (2012). Gated regulation of CRAC channel ion selectivity by STIM1. *Nature* 482, 241-245.

Meador, W. E., Means, A. R., and Quijcho, F. A. (1992). Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* 257, 1251-1255.

Meissner, G. (1986). Ryanodine activation and inhibition of the Ca<sup>2+</sup> release channel of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* 261, 6300-6306.

Meissner, G., Darling, E., and Eveleth, J. (1986). Kinetics of rapid Ca<sup>2+</sup> release by sarcoplasmic reticulum. Effects of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and adenine nucleotides. *Biochemistry* 25, 236-244.

Melchior, K., Tholey, A., Heisel, S., Keller, A., Lenhof, H. P., Meese, E., and Huber, C. G. (2009). Proteomic study of human glioblastoma multiforme tissue employing complementary two-dimensional liquid chromatography- and mass spectrometry-based approaches. *Journal of proteome research* 8, 4604-4614.

Meshorer, E., and Misteli, T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 540-546.

Messam, C. A., Hou, J., and Major, E. O. (2000). Coexpression of nestin in neural and glial cells in the developing human CNS defined by a human-specific anti-nestin antibody. *Exp Neurol* 161, 585-596.

Meyer zu Heringdorf, D., Liliom, K., Schaefer, M., Danneberg, K., Jaggar, J. H., Tigyi, G., and Jakobs, K. H. (2003). Photolysis of intracellular caged sphingosine-1-phosphate causes Ca<sup>2+</sup> mobilization independently of G-protein-coupled receptors. *FEBS letters* 554, 443-449.



- Michikawa, T., Hirota, J., Kawano, S., Hiraoka, M., Yamada, M., Furuichi, T., and Mikoshiba, K. (1999). Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of the cerebellar type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 23, 799-808.
- Mignen, O., and Shuttleworth, T. J. (2000). I(ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca<sup>2+</sup> entry channel. *The Journal of biological chemistry* 275, 9114-9119.
- Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2007). STIM1 regulates Ca<sup>2+</sup> entry via arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *The Journal of physiology* 579, 703-715.
- Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2009). The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca<sup>2+</sup>-selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. *The Journal of physiology* 587, 4181-4197.
- Miguet, L., Pacaud, K., Felden, C., Hugel, B., Martinez, M. C., Freyssinet, J. M., Herbrecht, R., Potier, N., van Dorsselaer, A., and Mauvieux, L. (2006). Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics* 6, 153-171.
- Miguet, L., Sanglier, S., Schaeffer, C., Potier, N., Mauvieux, L., and Van Dorsselaer, A. (2007). Microparticles: a new tool for plasma membrane sub-cellular proteomic. *Subcell Biochem* 43, 21-34.
- Miller, K. M., Tjeertes, J. V., Coates, J., Legube, G., Polo, S. E., Britton, S., and Jackson, S. P. (2010). Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining. *Nat Struct Mol Biol* 17, 1144-1151.
- Ming, G. L., and Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28, 223-250.
- Mintz, B., and Illmensee, K. (1975). Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 3585-3589.
- Miyake, K., Kimura, S., Nakanishi, M., Hisada, A., Hasegawa, M., Nagao, S., and Abe, Y. (2000). Transforming growth factor-beta1 stimulates contraction of human glioblastoma cell-mediated collagen lattice through enhanced alpha2 integrin expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 18-28.
- Monteith, G. R., McAndrew, D., Faddy, H. M., and Roberts-Thomson, S. J. (2007). Calcium and cancer: targeting Ca<sup>2+</sup> transport. *Nat Rev Cancer* 7, 519-530.
- Montero, M., Alonso, M. T., Carnicero, E., Cuchillo-Ibanez, I., Albillos, A., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J., and Alvarez, J. (2000). Chromaffin-cell stimulation triggers fast millimolar mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transients that modulate secretion. *Nat Cell Biol* 2, 57-61.
- Morel, A. P., Hinkal, G. W., Thomas, C., Fauvet, F., Courtois-Cox, S., Wierinckx, A., Devouassoux-Shisheboran, M., Treilleux, I., Tissier, A., Gras, B., *et al.* (2012). EMT Inducers Catalyze Malignant Transformation of Mammary Epithelial Cells and Drive Tumorigenesis towards Claudin-Low Tumors in Transgenic Mice. *PLoS Genet* 8, e1002723.
- Morel, A. P., Lievre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS one* 3, e2888.
- Morgan, A. J., and Jacob, R. (1998). Differential modulation of the phases of a Ca<sup>2+</sup> spike by the store Ca<sup>2+</sup>-ATPase in human umbilical vein endothelial cells. *The Journal of physiology* 513 ( Pt 1), 83-101.
- Muik, M., Frischauf, I., Derler, I., Fahrner, M., Bergsmann, J., Eder, P., Schindl, R., Hesch, C., Polzinger, B., Fritsch, R., *et al.* (2008). Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation. *The Journal of biological chemistry* 283, 8014-8022.

- Muller, M., Felmy, F., Schwaller, B., and Schneggenburger, R. (2007). Parvalbumin is a mobile presynaptic Ca<sup>2+</sup> buffer in the calyx of held that accelerates the decay of Ca<sup>2+</sup> and short-term facilitation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27, 2261-2271.
- Murat, A., Migliavacca, E., Gorlia, T., Lambiv, W. L., Shay, T., Hamou, M. F., de Tribolet, N., Regli, L., Wick, W., Kouwenhoven, M. C., *et al.* (2008). Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol* 26, 3015-3024.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry* 273, 2926-2930.
- Nagpal, S., Harsh, G., and Recht, L. (2011). Bevacizumab improves quality of life in patients with recurrent glioblastoma. *Chemother Res Pract* 2011, 602812.
- Nakada, M., Nakamura, H., Ikeda, E., Fujimoto, N., Yamashita, J., Sato, H., Seiki, M., and Okada, Y. (1999). Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors. *The American journal of pathology* 154, 417-428.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101-106.
- Nakamura, M., Yang, F., Fujisawa, H., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2000). Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 59, 539-543.
- Narayana, A., Gruber, D., Kunnakkat, S., Golfinos, J. G., Parker, E., Raza, S., Zagzag, D., Eagan, P., and Gruber, M. L. (2012). A clinical trial of bevacizumab, temozolomide, and radiation for newly diagnosed glioblastoma. *Journal of neurosurgery* 116, 341-345.
- Naumov, G. N., MacDonald, I. C., Weinmeister, P. M., Kerkvliet, N., Nadkarni, K. V., Wilson, S. M., Morris, V. L., Groom, A. C., and Chambers, A. F. (2002). Persistence of solitary mammary carcinoma cells in a secondary site: a possible contributor to dormancy. *Cancer research* 62, 2162-2168.
- Nelson, M. R., and Chazin, W. J. (1998). An interaction-based analysis of calcium-induced conformational changes in Ca<sup>2+</sup> sensor proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society* 7, 270-282.
- Newlands, E. S., Stevens, M. F., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T., and Brock, C. (1997). Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev* 23, 35-61.
- Nicholls, D. G. (2005). Mitochondria and calcium signaling. *Cell calcium* 38, 311-317.
- Nigg, E. A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature reviews Cancer* 2, 815-825.
- Nilsson, C. L., Dillon, R., Devakumar, A., Shi, S. D., Greig, M., Rogers, J. C., Krastins, B., Rosenblatt, M., Kilmer, G., Major, M., *et al.* (2010). Quantitative phosphoproteomic analysis of the STAT3/IL-6/HIF1alpha signaling network: an initial study in GSC11 glioblastoma stem cells. *Journal of proteome research* 9, 430-443.
- Noble, M., Proschel, C., and Mayer-Proschel, M. (2004). Getting a GR(i)P on oligodendrocyte development. *Dev Biol* 265, 33-52.
- Noel, G., Schott, R., Froelich, S., Gaub, M. P., Boyer, P., Fischer-Lokou, D., Dufour, P., Kehrl, P., and Maitrot, D. (2012). Retrospective comparison of chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy, with or without prior gliadel implantation (carmustine) after initial surgery in patients with newly diagnosed high-grade gliomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 82, 749-755.

- Norman, J. A., Drummond, A. H., and Moser, P. (1979). Inhibition of calcium-dependent regulator-stimulated phosphodiesterase activity by neuroleptic drugs is unrelated to their clinical efficacy. *Mol Pharmacol* 16, 1089-1094.
- Nottebohm, F. (1989). From bird song to neurogenesis. *Sci Am* 260, 74-79.
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 445, 106-110.
- O'Reilly, K. E., Rojo, F., She, Q. B., Solit, D., Mills, G. B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D. J., Ludwig, D. L., *et al.* (2006). mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research* 66, 1500-1508.
- Obukhov, A. G., Harteneck, C., Zobel, A., Harhammer, R., Kalkbrenner, F., Leopoldt, D., Luckhoff, A., Nurnberg, B., and Schultz, G. (1996). Direct activation of trpl cation channels by G alpha11 subunits. *The EMBO journal* 15, 5833-5838.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., *et al.* (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research* 64, 6892-6899.
- Ohya, Y., and Botstein, D. (1994). Diverse essential functions revealed by complementing yeast calmodulin mutants. *Science* 263, 963-966.
- Okada, A., Bellocq, J. P., Rouyer, N., Chenard, M. P., Rio, M. C., Chambon, P., and Basset, P. (1995). Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2730-2734.
- Okada, M., Saio, M., Kito, Y., Ohe, N., Yano, H., Yoshimura, S., Iwama, T., and Takami, T. (2009). Tumor-associated macrophage/microglia infiltration in human gliomas is correlated with MCP-3, but not MCP-1. *Int J Oncol* 34, 1621-1627.
- Olsson, M., and Lindahl, T. (1980). Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue. *J Biol Chem* 255, 10569-10571.
- Ong, H. L., Cheng, K. T., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Paria, B. C., Soboloff, J., Pani, B., Gwack, Y., Srikanth, S., Singh, B. B., *et al.* (2007). Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *The Journal of biological chemistry* 282, 9105-9116.
- Onishi, H., and Katano, M. (2011). Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in various types of cancer. *Cancer Sci* 102, 1756-1760.
- Osawa, M., Swindells, M. B., Tanikawa, J., Tanaka, T., Mase, T., Furuya, T., and Ikura, M. (1998). Solution structure of calmodulin-W-7 complex: the basis of diversity in molecular recognition. *Journal of molecular biology* 276, 165-176.
- Pae, H. O., Oh, G. S., Choi, B. M., Chae, S. C., Kim, Y. M., Chung, K. R., and Chung, H. T. (2004). Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production. *J Immunol* 172, 4744-4751.
- Pan, Y., Bai, C. B., Joyner, A. L., and Wang, B. (2006). Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol* 26, 3365-3377.

- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., *et al.* (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* *321*, 1807-1812.
- Patru, C., Romao, L., Varlet, P., Coulombel, L., Raponi, E., Cadusseau, J., Renault-Mihara, F., Thirant, C., Leonard, N., Berhneim, A., *et al.* (2010). CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer* *10*, 66.
- Peersen, O. B., Madsen, T. S., and Falke, J. J. (1997). Intermolecular tuning of calmodulin by target peptides and proteins: differential effects on Ca<sup>2+</sup> binding and implications for kinase activation. *Protein science : a publication of the Protein Society* *6*, 794-807.
- Peinado, H., Olmeda, D., and Cano, A. (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature reviews Cancer* *7*, 415-428.
- Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 10625-10629.
- Peng, W., Wang, H. Y., Miyahara, Y., Peng, G., and Wang, R. F. (2008). Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer research* *68*, 7228-7236.
- Penna, A., Demuro, A., Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Safrina, O., Parker, I., and Cahalan, M. D. (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature* *456*, 116-120.
- Penniston, J. T., and Enyedi, A. (1998). Modulation of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump. *J Membr Biol* *165*, 101-109.
- Phi, J. H., Park, S. H., Kim, S. K., Paek, S. H., Kim, J. H., Lee, Y. J., Cho, B. K., Park, C. K., Lee, D. H., and Wang, K. C. (2008). Sox2 expression in brain tumors: a reflection of the neuroglial differentiation pathway. *Am J Surg Pathol* *32*, 103-112.
- Phillips, H. S., Kharbanda, S., Chen, R., Forrest, W. F., Soriano, R. H., Wu, T. D., Misra, A., Nigro, J. M., Colman, H., Soroceanu, L., *et al.* (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* *9*, 157-173.
- Phipps, K. D., Surette, A. P., O'Connell, P. A., and Waisman, D. M. (2011). Plasminogen receptor S100A10 is essential for the migration of tumor-promoting macrophages into tumor sites. *Cancer research* *71*, 6676-6683.
- Pierce, G. B. (1967). Teratocarcinoma: model for a developmental concept of cancer. *Curr Top Dev Biol* *2*, 223-246.
- Pierce, G. B., Jr., Dixon, F. J., Jr., and Verney, E. L. (1960). Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* *9*, 583-602.
- Pierce, G. B., and Speers, W. C. (1988). Tumors as caricatures of the process of tissue renewal: prospects for therapy by directing differentiation. *Cancer research* *48*, 1996-2004.
- Pierce, G. B., and Wallace, C. (1971). Differentiation of malignant to benign cells. *Cancer Res* *31*, 127-134.
- Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A., and Risau, W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* *359*, 845-848.
- Polisetty, R. V., Gautam, P., Sharma, R., Harsha, H. C., Nair, S. C., Gupta, M. K., Uppin, M. S., Challa, S., Puligopu, A. K., Ankathi, P., *et al.* (2012a). LC-MS/MS Analysis of Differentially Expressed Glioblastoma Membrane Proteome Reveals Altered Calcium Signaling and Other Protein Groups of Regulatory Functions. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *11*, M111 013565.

- Polisetty, R. V., Gautam, P., Sharma, R., Harsha, H. C., Nair, S. C., Gupta, M. K., Uppin, M. S., Challa, S., Puligopu, A. K., Ankathi, P., *et al.* (2012b). LC-MS/MS analysis of differentially expressed glioblastoma membrane proteome reveals altered calcium signalling and other protein groups of regulatory functions. *Mol Cell Proteomics*.
- Pollard, J. W. (2004). Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nature reviews Cancer* 4, 71-78.
- Potter, J. D., and Gergely, J. (1975). The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *The Journal of biological chemistry* 250, 4628-4633.
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443, 230-233.
- Previtali, S., Quattrini, A., Nemni, R., Truci, G., Ducati, A., Wrabetz, L., and Canal, N. (1996). Alpha6 beta4 and alpha6 beta1 integrins in astrocytomas and other CNS tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 456-465.
- Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Clarke, M. F., and Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 973-978.
- Pulvirenti, T., Van Der Heijden, M., Droms, L. A., Huse, J. T., Tabar, V., and Hall, A. (2011). Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas. *Cancer research* 71, 7280-7290.
- Putkey, J. A., Draetta, G. F., Slaughter, G. R., Klee, C. B., Cohen, P., Stull, J. T., and Means, A. R. (1986). Genetically engineered calmodulins differentially activate target enzymes. *The Journal of biological chemistry* 261, 9896-9903.
- Putney, J. W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell calcium* 7, 1-12.
- Quednau, B. D., Nicoll, D. A., and Philipson, K. D. (2004). The sodium/calcium exchanger family-SLC8. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 447, 543-548.
- Quinn, J. A., Desjardins, A., Weingart, J., Brem, H., Dolan, M. E., Delaney, S. M., Vredenburg, J., Rich, J., Friedman, A. H., Reardon, D. A., *et al.* (2005). Phase I trial of temozolomide plus O6-benzylguanine for patients with recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 23, 7178-7187.
- Quinn, J. A., Pluda, J., Dolan, M. E., Delaney, S., Kaplan, R., Rich, J. N., Friedman, A. H., Reardon, D. A., Sampson, J. H., Colvin, O. M., *et al.* (2002). Phase II trial of carmustine plus O(6)-benzylguanine for patients with nitrosourea-resistant recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 20, 2277-2283.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M. S., Fullen, D. R., Johnson, T. M., and Morrison, S. J. (2008). Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456, 593-598.
- Radinsky, R., Risin, S., Fan, D., Dong, Z., Bielenberg, D., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. (1995). Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 1, 19-31.
- Rajcevic, U., Petersen, K., Knol, J. C., Loos, M., Bougnaud, S., Klychnikov, O., Li, K. W., Pham, T. V., Wang, J., Miletic, H., *et al.* (2009). iTRAQ-based proteomics profiling reveals increased metabolic activity and cellular cross-talk in angiogenic compared with invasive glioblastoma phenotype. *Mol Cell Proteomics* 8, 2595-2612.
- Ramos, T. C., Figueredo, J., Catala, M., Gonzalez, S., Selva, J. C., Cruz, T. M., Toledo, C., Silva, S., Pestano, Y., Ramos, M., *et al.* (2006). Treatment of high-grade glioma patients with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody h-R3: report from a phase I/II trial. *Cancer Biol Ther* 5, 375-379.

- Ranuncolo, S. M., Ladeda, V., Specterman, S., Varela, M., Lastiri, J., Morandi, A., Matos, E., Bal de Kier Joffe, E., Puricelli, L., and Pallotta, M. G. (2002). CD44 expression in human gliomas. *J Surg Oncol* 79, 30-35; discussion 35-36.
- Rasheed, B. K., McLendon, R. E., Friedman, H. S., Friedman, A. H., Fuchs, H. E., Bigner, D. D., and Bigner, S. H. (1995). Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: a common deletion region in 10q25. *Oncogene* 10, 2243-2246.
- Reinmuth, N., Liersch, R., Raedel, M., Fehrmann, F., Fehrmann, N., Bayer, M., Schwoeppe, C., Kessler, T., Berdel, W., Thomas, M., and Mesters, R. M. (2009). Combined anti-PDGFRalpha and PDGFRbeta targeting in non-small cell lung cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 124, 1535-1544.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., and Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Larocca, L. M., Lombardi, D. G., Signore, M., Pierconti, F., Petrucci, G., Montano, N., Maira, G., and De Maria, R. (2008). Mesenchymal differentiation of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ* 15, 1491-1498.
- Rich, J. N. (2007). Cancer stem cells in radiation resistance. *Cancer Res* 67, 8980-8984.
- Richly, H., Aloia, L., and Di Croce, L. (2011). Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer. *Cell Death Dis* 2, e204.
- Rigden, D. J., and Galperin, M. Y. (2004). The Dx[Dx]DG motif for calcium binding: multiple structural contexts and implications for evolution. *Journal of molecular biology* 343, 971-984.
- Rigden, D. J., Woodhead, D. D., Wong, P. W., and Galperin, M. Y. (2011). New structural and functional contexts of the Dx[DN]xDG linear motif: insights into evolution of calcium-binding proteins. *PLoS one* 6, e21507.
- Roberts-Thomson, S. J., Curry, M. C., and Monteith, G. R. (2010). Plasma membrane calcium pumps and their emerging roles in cancer. *World J Biol Chem* 1, 248-253.
- Roberts, D. M., Crea, R., Malecha, M., Alvarado-Urbina, G., Chiarello, R. H., and Watterson, D. M. (1985). Chemical synthesis and expression of a calmodulin gene designed for site-specific mutagenesis. *Biochemistry* 24, 5090-5098.
- Robey, I. F., Baggett, B. K., Kirkpatrick, N. D., Roe, D. J., Dosesco, J., Sloane, B. F., Hashim, A. I., Morse, D. L., Raghunand, N., Gatenby, R. A., and Gillies, R. J. (2009). Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer research* 69, 2260-2268.
- Roehrl, M. H., Wang, J. Y., and Wagner, G. (2004). A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein-protein interactions by fluorescence polarization. *Biochemistry* 43, 16056-16066.
- Rollins, R. A., Haghghi, F., Edwards, J. R., Das, R., Zhang, M. Q., Ju, J., and Bestor, T. H. (2006). Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome Res* 16, 157-163.
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J. A., Wagner, S. L., Cahalan, M. D., *et al.* (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca<sup>2+</sup> channel function. *J Cell Biol* 169, 435-445.
- Ropero, S., and Esteller, M. (2007). The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 1, 19-25.



- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., and Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* *459*, 356-363.
- Rosenfeld, N., Aharonov, R., Meiri, E., Rosenwald, S., Spector, Y., Zepeniuk, M., Benjamin, H., Shabes, N., Tabak, S., Levy, A., *et al.* (2008). MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature biotechnology* *26*, 462-469.
- Rotter, W. (1921). Histogenese der malignen Geschwulste. *Ztschr Krebs-forschung* *18*, 171-208.
- Sabarth, N., Lamer, S., Zimny-Arndt, U., Jungblut, P. R., Meyer, T. F., and Bumann, D. (2002). Identification of surface proteins of *Helicobacter pylori* by selective biotinylation, affinity purification, and two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* *277*, 27896-27902.
- Sachlos, E., Risueno, R. M., Laronde, S., Shapovalova, Z., Lee, J. H., Russell, J., Malig, M., McNicol, J. D., Fiebig-Comyn, A., Graham, M., *et al.* (2012). Identification of Drugs Including a Dopamine Receptor Antagonist that Selectively Target Cancer Stem Cells. *Cell* *149*, 1284-1297.
- Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S. C., van Daalen, S. K., Korver, C. M., Roepers-Gajadien, H. L., Koruji, M., Hovingh, S., de Reijke, T. M., de la Rosette, J. J., van der Veen, F., *et al.* (2009). Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA* *302*, 2127-2134.
- Salama, I., Malone, P. S., Mihaimeed, F., and Jones, J. L. (2008). A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol* *34*, 357-364.
- Salcman, M. (1980). Survival in glioblastoma: historical perspective. *Neurosurgery* *7*, 435-439.
- Sameshima, T., Nabeshima, K., Toole, B. P., Yokogami, K., Okada, Y., Goya, T., Koono, M., and Wakisaka, S. (2000). Glioma cell extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (CD147) stimulates production of membrane-type matrix metalloproteinases and activated gelatinase A in co-cultures with brain-derived fibroblasts. *Cancer letters* *157*, 177-184.
- Sanchez-Gonzalez, P., Jellali, K., and Villalobo, A. (2010). Calmodulin-mediated regulation of the epidermal growth factor receptor. *FEBS J* *277*, 327-342.
- Saxonov, S., Berg, P., and Brutlag, D. L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 1412-1417.
- Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* *441*, 1075-1079.
- Scaltriti, M., Verma, C., Guzman, M., Jimenez, J., Parra, J. L., Pedersen, K., Smith, D. J., Landolfi, S., Ramon y Cajal, S., Arribas, J., and Baselga, J. (2009). Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. *Oncogene* *28*, 803-814.
- Schaub, M. C., and Heizmann, C. W. (2008). Calcium, troponin, calmodulin, S100 proteins: from myocardial basics to new therapeutic strategies. *Biochemical and biophysical research communications* *369*, 247-264.
- Scherer, H. J. (1940). A Critical Review: The Pathology of Cerebral Gliomas. *J Neurol Psychiatry* *3*, 147-177.
- Schimmer, A. D. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research* *64*, 7183-7190.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* *103*, 211-225.
- Schmalz, P. G. R., Shen, M. J., and Park, J. K. (2011). Treatment resistance mechanisms of malignant glioma tumor stem cells. *cancers* *3*, 621-635.

- Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., and Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* *128*, 735-745.
- Schuller, H. M., Orloff, M., and Reznik, G. K. (1991). Antiproliferative effects of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin antagonist B859-35 and the Ca(2+)-channel blocker verapamil on human lung cancer cell lines. *Carcinogenesis* *12*, 2301-2303.
- Schumacher, M. A., Rivard, A. F., Bachinger, H. P., and Adelman, J. P. (2001). Structure of the gating domain of a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel complexed with Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Nature* *410*, 1120-1124.
- Schwaller, B. (2010). Cytosolic Ca<sup>2+</sup> buffers. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *2*, a004051.
- Seidel, S., Garvalov, B. K., Wirta, V., von Stechow, L., Schanzer, A., Meletis, K., Wolter, M., Sommerlad, D., Henze, A. T., Nister, M., *et al.* (2010). A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha. *Brain* *133*, 983-995.
- Seyfried, N. T., Huysentruyt, L. C., Atwood, J. A., 3<sup>rd</sup>, Xia, Q., Seyfried, T. N., and Orlando, R. (2008). Up-regulation of NG2 proteoglycan and interferon-induced transmembrane proteins 1 and 3 in mouse astrocytoma: a membrane proteomics approach. *Cancer letters* *263*, 243-252.
- Sharif, A., Legendre, P., Prevot, V., Allet, C., Romao, L., Studler, J. M., Chneiweiss, H., and Junier, M. P. (2007). Transforming growth factor alpha promotes sequential conversion of mature astrocytes into neural progenitors and stem cells. *Oncogene* *26*, 2695-2706.
- Shea, M. A., Verhoeven, A. S., and Pedigo, S. (1996). Calcium-induced interactions of calmodulin domains revealed by quantitative thrombin footprinting of Arg37 and Arg106. *Biochemistry* *35*, 2943-2957.
- Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T., and Rosania, G. R. (2003). Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer research* *63*, 4331-4337.
- Shemarova, I. V., and Nesterov, V. P. (2005). [Evolution of mechanisms of Calcium signaling: the role of Calcium ions in signal transduction in prokaryotes]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* *41*, 12-17.
- Shen, J., Vil, M. D., Prewett, M., Damoci, C., Zhang, H., Li, H., Jimenez, X., Deevi, D. S., Iacolina, M., Kayas, A., *et al.* (2009). Development of a fully human anti-PDGFRbeta antibody that suppresses growth of human tumor xenografts and enhances antitumor activity of an anti-VEGFR2 antibody. *Neoplasia* *11*, 594-604.
- Shen, Q., Goderie, S. K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., and Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* *304*, 1338-1340.
- Shi, H., Kong, X., Ribas, A., and Lo, R. S. (2011). Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition. *Cancer research* *71*, 5067-5074.
- Shi, Y., Zhao, X., Hsieh, J., Wichterle, H., Impey, S., Banerjee, S., Neveu, P., and Kosik, K. S. (2010). MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* *30*, 14931-14936.
- Shim, J. S., Lee, J., Kim, K. N., and Kwon, H. J. (2007a). Development of a new Ca<sup>2+</sup>/calmodulin antagonist and its anti-proliferative activity against colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* *359*, 747-751.
- Shim, J. S., Lee, J., Kim, K. N., and Kwon, H. J. (2007b). Development of a new Ca<sup>2+</sup>/calmodulin antagonist and its anti-proliferative activity against colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* *359*, 747-751.
- Shimono, Y., Zabala, M., Cho, R. W., Lobo, N., Dalerba, P., Qian, D., Diehn, M., Liu, H., Panula, S. P., Chiao, E., *et al.* (2009). Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells. *Cell* *138*, 592-603.



- Shin, S. Y., Choi, B. H., Ko, J., Kim, S. H., Kim, Y. S., and Lee, Y. H. (2006). Clozapine, a neuroleptic agent, inhibits Akt by counteracting Ca<sup>2+</sup>/calmodulin in PTEN-negative U-87MG human glioblastoma cells. *Cell Signal* *18*, 1876-1886.
- Shistik, E., Ivanina, T., Puri, T., Hosey, M., and Dascal, N. (1995). Ca<sup>2+</sup> current enhancement by alpha 2/delta and beta subunits in *Xenopus* oocytes: contribution of changes in channel gating and alpha 1 protein level. *J Physiol* *489* ( Pt 1), 55-62.
- Shrimpton, R. E., Butler, M., Morel, A. S., Eren, E., Hue, S. S., and Ritter, M. A. (2009). CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol Immunol* *46*, 1229-1239.
- Shukla, V., Vaissiere, T., and Herceg, Z. (2008). Histone acetylation and chromatin signature in stem cell identity and cancer. *Mutat Res* *637*, 1-15.
- Shuttleworth, T. J., and Thompson, J. L. (1996). Evidence for a non-capacitative Ca<sup>2+</sup> entry during [Ca<sup>2+</sup>] oscillations. *The Biochemical journal* *316* ( Pt 3), 819-824.
- Sibilia, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B. M., Natarajan, A., Hecking, M., and Holcman, M. (2007). The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* *75*, 770-787.
- Silber, J., James, C. D., and Hodgson, J. G. (2009). microRNAs in gliomas: small regulators of a big problem. *Neuromolecular Med* *11*, 208-222.
- Silber, J., Lim, D. A., Petritsch, C., Persson, A. I., Maunakea, A. K., Yu, M., Vandenberg, S. R., Ginzinger, D. G., James, C. D., Costello, J. F., *et al.* (2008). miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* *6*, 14.
- Singh, A., and Settleman, J. (2010). EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* *29*, 4741-4751.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* *63*, 5821-5828.
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., and Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* *432*, 396-401.
- Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Jr., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., and Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* *10*, 1470-1476.
- Soeda, A., Park, M., Lee, D., Mintz, A., Androutsellis-Theotokis, A., McKay, R. D., Engh, J., Iwama, T., Kunisada, T., Kassam, A. B., *et al.* (2009). Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* *28*, 3949-3959.
- Son, M. J., Woolard, K., Nam, D. H., Lee, J., and Fine, H. A. (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* *4*, 440-452.
- Song, H., and Moon, A. (2006). Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) promotes low-grade Hs683 glioma cell migration through JNK, ERK-1/2 and p38 MAPK signaling pathways. *Neurosci Res* *56*, 29-38.
- Sorensen, B. R., and Shea, M. A. (1998). Interactions between domains of apo calmodulin alter calcium binding and stability. *Biochemistry* *37*, 4244-4253.
- Sorenson, C. M., and Eastman, A. (1988). Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. *Cancer Res* *48*, 4484-4488.

- Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature reviews Cancer* 6, 846-856.
- Spiegel, S., and Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 397-407.
- Stevens, M. F., Hickman, J. A., Langdon, S. P., Chubb, D., Vickers, L., Stone, R., Baig, G., Goddard, C., Gibson, N. W., Slack, J. A., and et al. (1987). Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer research* 47, 5846-5852.
- Stewart, L. A. (2002). Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 359, 1011-1018.
- Stommel, J. M., Kimmelman, A. C., Ying, H., Nabioullin, R., Ponugoti, A. H., Wiedemeyer, R., Stegh, A. H., Bradner, J. E., Ligon, K. L., Brennan, C., et al. (2007). Coactivation of receptor tyrosine kinases affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 318, 287-290.
- Strehler, E. E. (1991). Recent advances in the molecular characterization of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pumps. *The Journal of membrane biology* 120, 1-15.
- Strojnik, T., Rosland, G. V., Sakariassen, P. O., Kavalar, R., and Lah, T. (2007). Neural stem cell markers, nestin and musashi proteins, in the progression of human glioma: correlation of nestin with prognosis of patient survival. *Surg Neurol* 68, 133-143; discussion 143-134.
- Stupp, R., Mason, W. P., van den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 987-996.
- Sulova, Z., Orlicky, J., Fiala, R., Dovinova, I., Uhrík, B., Seres, M., Gibalova, L., and Breier, A. (2005). Expression of P-glycoprotein in L1210 cells is linked with rise in sensitivity to Ca<sup>2+</sup>. *Biochem Biophys Res Commun* 335, 777-784.
- Suva, M. L., Riggi, N., Janiszewska, M., Radovanovic, I., Provero, P., Stehle, J. C., Baumer, K., Le Bitoux, M. A., Marino, D., Cironi, L., et al. (2009). EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer research* 69, 9211-9218.
- Suzuki, M., Mose, E. S., Montel, V., and Tarin, D. (2006). Dormant cancer cells retrieved from metastasis-free organs regain tumorigenic and metastatic potency. *The American journal of pathology* 169, 673-681.
- Swan, D. G., Hale, R. S., Dhillon, N., and Leadlay, P. F. (1987). A bacterial calcium-binding protein homologous to calmodulin. *Nature* 329, 84-85.
- Swanton, C., Futreal, A., and Eisen, T. (2006). Her2-targeted therapies in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 4377s-4383s.
- Swindells, M. B., and Ikura, M. (1996). Pre-formation of the semi-open conformation by the apo-calmodulin C-terminal domain and implications binding IQ-motifs. *Nature structural biology* 3, 501-504.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tan, Y., Ma, S. Y., Wang, F. Q., Meng, H. P., Mei, C., Liu, A., and Wu, H. R. (2011). Proteomic-based analysis for identification of potential serum biomarkers in gallbladder cancer. *Oncology reports* 26, 853-859.
- Tanaka, T., Ohmura, T., and Hidaka, H. (1982). Hydrophobic interaction of the Ca<sup>2+</sup>-calmodulin complex with calmodulin antagonists. Naphthalenesulfonamide derivatives. *Mol Pharmacol* 22, 403-407.

- Tang, W., Sencer, S., and Hamilton, S. L. (2002). Calmodulin modulation of proteins involved in excitation-contraction coupling. *Front Biosci* 7, d1583-1589.
- Taylor, C. W., Genazzani, A. A., and Morris, S. A. (1999). Expression of inositol trisphosphate receptors. *Cell calcium* 26, 237-251.
- TCGA (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068.
- Teggatz, E. G., Zhang, G., Zhang, A. Y., Yi, F., Li, N., Zou, A. P., and Li, P. L. (2005). Role of cyclic ADP-ribose in Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release and vasoconstriction in small renal arteries. *Microvasc Res* 70, 65-75.
- Teo, T. S., and Wang, J. H. (1973). Mechanism of activation of a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of the protein activator as a Ca<sup>2+</sup> binding protein. *The Journal of biological chemistry* 248, 5950-5955.
- Thara, E., Dorff, T. B., Pinski, J. K., and Quinn, D. I. (2011). Vaccine therapy with sipuleucel-T (Provenge) for prostate cancer. *Maturitas* 69, 296-303.
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer* 2, 442-454.
- Thingholm, T. E., Jensen, O. N., and Larsen, M. R. (2009). Analytical strategies for phosphoproteomics. *Proteomics* 9, 1451-1468.
- Thirant, C., Galan-Moya, E. M., Dubois, L. G., Pinte, S., Chafey, P., Broussard, C., Varlet, P., Devaux, B., Soncin, F., Gavard, J., *et al.* (2012). Differential Proteomic Analysis of Human Glioblastoma and Neural Stem Cells Reveals HDGF as a Novel Angiogenic Secreted Factor. *Stem cells* 30, 845-853.
- Till, J. E., and Mc, C. E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
- Tohgo, A., Munakata, H., Takasawa, S., Nata, K., Akiyama, T., Hayashi, N., and Okamoto, H. (1997). Lysine 129 of CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase) participates in the binding of ATP to inhibit the cyclic ADP-ribose hydrolase. *The Journal of biological chemistry* 272, 3879-3882.
- Tolcher, A. W., Gerson, S. L., Denis, L., Geyer, C., Hammond, L. A., Patnaik, A., Goetz, A. D., Schwartz, G., Edwards, T., Reyderman, L., *et al.* (2003). Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules. *Br J Cancer* 88, 1004-1011.
- Trost, C., Bergs, C., Himmerkus, N., and Flockerzi, V. (2001). The transient receptor potential, TRP4, cation channel is a novel member of the family of calmodulin binding proteins. *The Biochemical journal* 355, 663-670.
- Trudeau, M. C., and Zagotta, W. N. (2002). Mechanism of calcium/calmodulin inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8424-8429.
- Truong, K., and Ikura, M. (2001). The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Current opinion in structural biology* 11, 573-578.
- Tso, C. L., Shintaku, P., Chen, J., Liu, Q., Liu, J., Chen, Z., Yoshimoto, K., Mischel, P. S., Cloughesy, T. F., Liau, L. M., and Nelson, S. F. (2006). Primary glioblastomas express mesenchymal stem-like properties. *Mol Cancer Res* 4, 607-619.
- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., and Sakurai, Y. (1982). Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer research* 42, 4730-4733.

- Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., and Sakurai, Y. (1983). Potentiation of vincristine and Adriamycin effects in human hemopoietic tumor cell lines by calcium antagonists and calmodulin inhibitors. *Cancer research* *43*, 2267-2272.
- Tucker-Burden, C., Chappa, P., Krishnamoorthy, M., Gerwe, B. A., Scharer, C. D., Heimbürg-Molinaro, J., Harris, W., Usta, S. N., Eilertson, C. D., Hadjipanayis, C. G., *et al.* (2012). Lectins Identify Glycan Biomarkers on Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells. *Stem Cells Dev.*
- Tucker, G. C. (2006). Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep* *8*, 96-103.
- Tungekar, M. F., Gatter, K. C., and Ritter, M. A. (1996). Bladder carcinomas and normal urothelium universally express gp200-MR6, a molecule functionally associated with the interleukin 4 receptor (CD 124). *Br J Cancer* *73*, 429-432.
- Uhrbom, L., Kastemar, M., Johansson, F. K., Westermark, B., and Holland, E. C. (2005). Cell type-specific tumor suppression by Ink4a and Arf in Kras-induced mouse gliomagenesis. *Cancer research* *65*, 2065-2069.
- Umar, A., Kang, H., Timmermans, A. M., Look, M. P., Meijer-van Gelder, M. E., den Bakker, M. A., Jaitly, N., Martens, J. W., Luider, T. M., Foekens, J. A., and Pasa-Tolic, L. (2009). Identification of a putative protein profile associated with tamoxifen therapy resistance in breast cancer. *Mol Cell Proteomics* *8*, 1278-1294.
- Vadakkan, K. I., Wang, H., Ko, S. W., Zastepa, E., Petrovic, M. J., Sluka, K. A., and Zhuo, M. (2006). Genetic reduction of chronic muscle pain in mice lacking calcium/calmodulin-stimulated adenylyl cyclases. *Mol Pain* *2*, 7.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J. J., and Lotvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* *9*, 654-659.
- Van Baelen, K., Vanoevelen, J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., and Wuytack, F. (2001). The Golgi PMR1 P-type ATPase of *Caenorhabditis elegans*. Identification of the gene and demonstration of calcium and manganese transport. *The Journal of biological chemistry* *276*, 10683-10691.
- van Vlerken, L. E., Hurt, E. M., and Hollingsworth, R. E. (2012). The role of epigenetic regulation in stem cell and cancer biology. *J Mol Med (Berl)*.
- VanScyoc, W. S., Newman, R. A., Sorensen, B. R., and Shea, M. A. (2006). Calcium binding to calmodulin mutants having domain-specific effects on the regulation of ion channels. *Biochemistry* *45*, 14311-14324.
- Vaupel, P., Kallinowski, F., and Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research* *49*, 6449-6465.
- Vegran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P., and Feron, O. (2011). Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer research* *71*, 2550-2560.
- Velpula, K. K., Rehman, A. A., Chelluboina, B., Dasari, V. R., Gondi, C. S., Rao, J. S., and Veeravalli, K. K. (2012). Glioma Stem Cell Invasion through Regulation of the Interconnected ERK, Integrin alpha6 and N-Cadherin Signaling Pathway. *Cell Signal*.
- Verhaak, R. G., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., *et al.* (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* *17*, 98-110.
- Vermeulen, L., De Sousa, E. M. F., van der Heijden, M., Cameron, K., de Jong, J. H., Borovski, T., Tuynman, J. B., Todaro, M., Merz, C., Rodermond, H., *et al.* (2010). Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol* *12*, 468-476.
- Vescovi, A. L., Galli, R., and Reynolds, B. A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat Rev Cancer* *6*, 425-436.

- Veselska, R., Kuglik, P., Cejpek, P., Svachova, H., Neradil, J., Loja, T., and Relichova, J. (2006). Nestin expression in the cell lines derived from glioblastoma multiforme. *BMC cancer* 6, 32.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., and Kinet, J. P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science* 312, 1220-1223.
- Villalonga, P., Lopez-Alcala, C., Bosch, M., Chiloeches, A., Rocamora, N., Gil, J., Marais, R., Marshall, C. J., Bachs, O., and Agell, N. (2001). Calmodulin binds to K-Ras, but not to H- or N-Ras, and modulates its downstream signaling. *Mol Cell Biol* 21, 7345-7354.
- Virchow, R. (1855). Editorial Archiv fuer pathologische Anatomie und Physiologie und fuer klinische Medizin, 8-23.
- Visvader, J. E. (2011). Cells of origin in cancer. *Nature* 469, 314-322.
- Visvader, J. E., and Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755-768.
- Wang, C., Liu, Z., Woo, C. W., Li, Z., Wang, L., Wei, J. S., Marquez, V. E., Bates, S. E., Jin, Q., Khan, J., *et al.* (2012). EZH2 Mediates epigenetic silencing of neuroblastoma suppressor genes CASZ1, CLU, RUNX3, and NGFR. *Cancer research* 72, 315-324.
- Wang, J., Sakariassen, P. O., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, S. O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Rosland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., *et al.* (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122, 761-768.
- Wang, J., Wakeman, T. P., Lathia, J. D., Hjelmeland, A. B., Wang, X. F., White, R. R., Rich, J. N., and Sullenger, B. A. (2010a). Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells. *Stem Cells* 28, 17-28.
- Wang, S. Q., Zhu, M. X., and Carafoli, E. (2011). Ca<sup>2+</sup>: a versatile master key for intracellular signaling cascades. *Sci China Life Sci* 54, 683-685.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., Ahmad, A., Banerjee, S., and Sarkar, F. H. (2010 b). Cross-talk between miRNA and Notch signaling pathways in tumor development and progression. *Cancer letters* 292, 141-148.
- Wang, Z., Li, Y., Kong, D., and Sarkar, F. H. (2010c). The role of Notch signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition (EMT) during development and tumor aggressiveness. *Curr Drug Targets* 11, 745-751.
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8, 519-530.
- Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *The American journal of pathology* 174, 1149-1153.
- Watters, J. J., Schartner, J. M., and Badie, B. (2005). Microglia function in brain tumors. *J Neurosci Res* 81, 447-455.
- Watterson, D. M., Sharief, F., and Vanaman, T. C. (1980). The complete amino acid sequence of the Ca<sup>2+</sup>-dependent modulator protein (calmodulin) of bovine brain. *The Journal of biological chemistry* 255, 962-975.
- Wei, J., Barr, J., Kong, L. Y., Wang, Y., Wu, A., Sharma, A. K., Gumin, J., Henry, V., Colman, H., Priebe, W., *et al.* (2010a). Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Molecular cancer therapeutics* 9, 67-78.

- Wei, K. C., Huang, C. Y., Chen, P. Y., Feng, L. Y., Wu, T. W., Chen, S. M., Tsai, H. C., Lu, Y. J., Tsang, N. M., Tseng, C. K., *et al.* (2010b). Evaluation of the prognostic value of CD44 in glioblastoma multiforme. *Anticancer Res* *30*, 253-259.
- Weigmann, A., Corbeil, D., Hellwig, A., and Huttner, W. B. (1997). Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *94*, 12425-12430.
- Welch, D. R. (1997). Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clin Exp Metastasis* *15*, 272-306.
- Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., *et al.* (2009). The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol* *11*, 1487-1495.
- Wesseling, P., Schlingemann, R. O., Rietveld, F. J., Link, M., Burger, P. C., and Ruiter, D. J. (1995). Early and extensive contribution of pericytes/vascular smooth muscle cells to microvascular proliferation in glioblastoma multiforme: an immuno-light and immuno-electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol* *54*, 304-310.
- Whitaker, R. (2004). The case against antipsychotic drugs: a 50-year record of doing more harm than good. *Med Hypotheses* *62*, 5-13.
- Wicha, M. S., Liu, S., and Dontu, G. (2006). Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res* *66*, 1883-1890; discussion 1895-1886.
- Williams, R. J. (1998). Calcium: outside/inside homeostasis and signalling. *Biochimica et biophysica acta* *1448*, 153-165.
- Williams, R. T., Manji, S. S., Parker, N. J., Hancock, M. S., Van Stekelenburg, L., Eid, J. P., Senior, P. V., Kazenwadel, J. S., Shandala, T., Saint, R., *et al.* (2001). Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins. *The Biochemical journal* *357*, 673-685.
- Wilson, H. L., Dipp, M., Thomas, J. M., Lad, C., Galione, A., and Evans, A. M. (2001). Adp-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. a primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *The Journal of biological chemistry* *276*, 11180-11188.
- Wu, M. M., Buchanan, J., Luik, R. M., and Lewis, R. S. (2006). Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol* *174*, 803-813.
- Wuytack, F., Raeymaekers, L., and Missiaen, L. (2002). Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell calcium* *32*, 279-305.
- Xiao, W., Yao, N., Peng, L., Liu, R., and Lam, K. S. (2009). Near-infrared optical imaging in glioblastoma xenograft with ligand-targeting alpha 3 integrin. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* *36*, 94-103.
- Xu, L., Fukumura, D., and Jain, R. K. (2002). Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. *The Journal of biological chemistry* *277*, 11368-11374.
- Xu, P., Lu, J., Li, Z., Yu, X., Chen, L., and Xu, T. (2006). Aggregation of STIM1 underneath the plasma membrane induces clustering of Orai1. *Biochemical and biophysical research communications* *350*, 969-976.
- Xu, X., Stockhammer, F., and Schmitt, M. (2012). Cellular-based immunotherapies for patients with glioblastoma multiforme. *Clinical & developmental immunology* *2012*, 764213.
- Xu, Y., Stamenkovic, I., and Yu, Q. (2010). CD44 attenuates activation of the hippo signaling pathway and is a prime therapeutic target for glioblastoma. *Cancer research* *70*, 2455-2464.



- Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., *et al.* (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* *360*, 765-773.
- Yang, M. H., Hsu, D. S., Wang, H. W., Wang, H. J., Lan, H. Y., Yang, W. H., Huang, C. H., Kao, S. Y., Tzeng, C. H., Tai, S. K., *et al.* (2010). Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* *12*, 982-992.
- Yap, K. L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., and Ikura, M. (2000). Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics* *1*, 8-14.
- Yeromin, A. V., Zhang, S. L., Jiang, W., Yu, Y., Safrina, O., and Cahalan, M. D. (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature* *443*, 226-229.
- Yoshida, B. A., Sokoloff, M. M., Welch, D. R., and Rinker-Schaeffer, C. W. (2000). Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst* *92*, 1717-1730.
- Young, K. W., Challiss, R. A., Nahorski, S. R., and MacKrell, J. J. (1999). Lysophosphatidic acid-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization in human SH-SY5Y neuroblastoma cells is independent of phosphoinositide signalling, but dependent on sphingosine kinase activation. *The Biochemical journal* *343 Pt 1*, 45-52.
- Yu, J. S., Wheeler, C. J., Zeltzer, P. M., Ying, H., Finger, D. N., Lee, P. K., Yong, W. H., Incardona, F., Thompson, R. C., Riedinger, M. S., *et al.* (2001). Vaccination of malignant glioma patients with peptide-pulsed dendritic cells elicits systemic cytotoxicity and intracranial T-cell infiltration. *Cancer research* *61*, 842-847.
- Yuan, J. P., Zeng, W., Dorwart, M. R., Choi, Y. J., Worley, P. F., and Muallem, S. (2009). SOAR and the polybasic STIM1 domains gate and regulate Orai channels. *Nat Cell Biol* *11*, 337-343.
- Yuan, T., and Vogel, H. J. (1998). Calcium-calmodulin-induced dimerization of the carboxyl-terminal domain from petunia glutamate decarboxylase. A novel calmodulin-peptide interaction motif. *The Journal of biological chemistry* *273*, 30328-30335.
- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D. L., Black, K. L., and Yu, J. S. (2004). Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene* *23*, 9392-9400.
- Yung, W. K., Albright, R. E., Olson, J., Fredericks, R., Fink, K., Prados, M. D., Brada, M., Spence, A., Hohl, R. J., Shapiro, W., *et al.* (2000). A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *Br J Cancer* *83*, 588-593.
- Zeisberg, M., and Neilson, E. G. (2009). Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation* *119*, 1429-1437.
- Zhang, J., Sarkar, S., Cua, R., Zhou, Y., Hader, W., and Yong, V. W. (2012). A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis* *33*, 312-319.
- Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* *4*, 67-73.
- Zhang, M., Song, T., Yang, L., Chen, R., Wu, L., Yang, Z., and Fang, J. (2008a). Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J Exp Clin Cancer Res* *27*, 85.
- Zhang, M., Tanaka, T., and Ikura, M. (1995). Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin. *Nat Struct Biol* *2*, 758-767.
- Zhang, Q. B., Ji, X. Y., Huang, Q., Dong, J., Zhu, Y. D., and Lan, Q. (2006a). Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Res* *16*, 909-915.

- Zhang, S. L., Yeromin, A. V., Zhang, X. H., Yu, Y., Safrina, O., Penna, A., Roos, J., Stauderman, K. A., and Cahalan, M. D. (2006 b). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 9357-9362.
- Zhang, X. P., Zheng, G., Zou, L., Liu, H. L., Hou, L. H., Zhou, P., Yin, D. D., Zheng, Q. J., Liang, L., Zhang, S. Z., *et al.* (2008b). Notch activation promotes cell proliferation and the formation of neural stem cell-like colonies in human glioma cells. *Mol Cell Biochem* 307, 101-108.
- Zhao, J. H., Luo, Y., Jiang, Y. G., He, D. L., and Wu, C. T. (2011). Knockdown of beta-Catenin through shRNA cause a reversal of EMT and metastatic phenotypes induced by HIF-1alpha. *Cancer Invest* 29, 377-382.
- Zhao, Y., Zhang, W., and Kho, Y. (2004). Proteomic analysis of integral plasma membrane proteins. *Anal Chem* 76, 1817-1823.
- Zheng, H., Fu, G., Dai, T., and Huang, H. (2007). Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 50, 274-280.
- Zhou, X., Ren, Y., Han, L., Mei, M., Xu, P., Zhang, C. Z., Wang, G. X., Jia, Z. F., Pu, P. Y., and Kang, C. S. (2010). Role of the AKT pathway in microRNA expression of human U251 glioblastoma cells. *Int J Oncol* 36, 665-672.
- Zhou, Z., and Neher, E. (1993). Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology* 469, 245-273.
- Zhu, Y., Yu, T., Zhang, X. C., Nagasawa, T., Wu, J. Y., and Rao, Y. (2002). Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat Neurosci* 5, 719-720.
- Zola, H., Swart, B., Banham, A., Barry, S., Beare, A., Bensussan, A., Boumsell, L., C, D. B., Buhning, H. J., Clark, G., *et al.* (2007). CD molecules 2006--human cell differentiation molecules. *J Immunol Methods* 319, 1-5.
- Zuhlke, R. D., Pitt, G. S., Deisseroth, K., Tsien, R. W., and Reuter, H. (1999). Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 399, 159-162.



## **Publications**

- 1. Revisiting intracellular calcium signaling semantics**
- 2. New aspects of Calmodulin – Calmodulin binding domains recognition**
- 3. General framework to characterize inhibitors of Calmodulin: Application to six new Calmodulin antagonists**