



HAL
open science

Rôle de la signalisation calcique dépendante des Store-Operated Channels (SOC) dans les cellules souches neurales adultes et les cellules souches cancéreuses de glioblastomes

Élodie Terrie

► **To cite this version:**

Élodie Terrie. Rôle de la signalisation calcique dépendante des Store-Operated Channels (SOC) dans les cellules souches neurales adultes et les cellules souches cancéreuses de glioblastomes. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Poitiers, 2019. Français. NNT : 2019POIT2322 . tel-03165501

HAL Id: tel-03165501

<https://theses.hal.science/tel-03165501v1>

Submitted on 10 Mar 2021

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.

THÈSE

Pour l'obtention du Grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale « *Sciences Biologiques & Santé* »

Secteur de Recherche : Neurosciences

Présentée par :

Elodie TERRIÉ

Rôle de la signalisation calcique dépendante des Store-Operated Channels (SOC) dans les cellules souches neurales adultes et les cellules souches cancéreuses de glioblastomes

Directeurs de Thèse : Pr Valérie CORONAS et Dr Bruno CONSTANTIN

Soutenue le 17 Décembre 2019

devant la Commission d'Examen

JURY

P. GAILLY	Professeur, Université de Louvain, Belgique	Rapporteur
F. BOUSSIN	Directeur de recherche CEA, Université Paris XI	Rapporteur
V. MAGUER-SATTA	Directrice de recherche CNRS, Université de Lyon	Examinatrice
F. LALLOUÉ	Professeur, Université de Limoges	Examineur
V. CORONAS	Professeur, Université de Poitiers	Examinatrice
B. CONSTANTIN	Directeur de recherche CNRS, Université de Poitiers	Examineur

Ama Maman

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse Pr Valérie CORONAS et Dr Bruno CONSTANTIN. Je remercie le Dr Bruno CONSTANTIN de m'avoir accueillie dans son équipe, d'avoir passé du temps avec moi en M2 pour m'apprendre la technique d'imagerie calcique et ce toujours dans la bonne humeur. Je remercie sincèrement le Pr Valérie CORONAS de m'avoir acceptée en stage de master 2 pour travailler sur un sujet passionnant qui est devenu une partie de mon sujet de thèse. Merci de m'avoir encadrée et suivie durant toutes ces années, de m'avoir transmis les techniques nécessaires à nos travaux, et d'avoir passé du temps à corriger mon manuscrit de thèse.

Je tiens à exprimer tout ma gratitude au professeur Philippe GAILLY et au directeur de recherche François BOUSSIN pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit, ainsi qu'à la directrice de recherche Véronique MAGUER-SATTA, et au professeur Fabrice LALLOUÉ pour avoir accepté de faire partie du jury lors de la soutenance de cette thèse.

Je remercie le Pr Fredericq BECQ et le Dr Bruno CONSTANTIN, précédent et actuel directeur du laboratoire Signalisation et transports ioniques membranaires (STIM), de m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire.

J'adresse mes remerciements à toute mon équipe, l'équipe 4CS. Je remercie Nadine Déliot, Nicolas Bourmeyster, Aubin et Sabrina Penna ainsi que Manuella Lévêque et Christine Barrault.

Je tiens à remercier tout particulièrement Patricia Arnault pour ces précieux conseils, sa bienveillance et sa bonne humeur communicative, et les nombreuses plantes qui ornent désormais mon salon grâce à elle. Merci pour tes précieux conseils et pour m'avoir écoutée dans les moments de doutes. Je remercie Laëtitia Cousin pour m'avoir supportée depuis le M2, et pour son aide et ses conseils précieux. Merci pour les pauses café, ton aide dans les moments durs et pour ta bonne humeur. Merci à Thomas Harnois, le roi des Western blot, pour m'avoir transmis un peu de son savoir-faire et pour sa gentillesse et sa bonne humeur malgré les nombreux aléas de la recherche.

Je tiens à remercier les doctorants, avec qui j'ai partagé le fardeau qu'est une thèse parfois, les docteurs : Obélia, Sandie, Mathilde, déjà parties vers de nouvelles aventures, ainsi qu'Elsa et Jonathan anciens doctorants de STIM. Je tiens tout particulièrement à remercier ma copine Audrey Dubourg, qui débute sa 2^{ème} année de thèse. Merci pour ton soutien, pour les pauses-passerelles, les repas, les rigolades, et pour ta gentillesse. J'aurai aimé que tu sois là dès le début de cette aventure !

Je tiens à remercier ma famille, qui se demande encore ce que je fais exactement, mais qui me soutient quand même : mon papa, mes sœurs Vane et Zaza et leurs petites familles : mes « beaufs » Cédric et Cyril et leurs enfants Adrien, Anthony et Romane. J'ai une pensée toute particulière pour ma mamie, qui nous a quittés l'an dernier, pour ses sourires, son amour et sa bienveillance. Et bien sûr, je tiens à remercier ma maman, à qui cette thèse est dédiée. Ma maman, qui avait son papillon dans la tête, un papillon qu'elle a réussi à apprivoiser pendant des années, mais qui a fini par s'envoler avec elle il y a déjà 2 ans. Merci pour tout maman, j'espère que tu es fière de moi là-haut.

Un grand merci à mon amoureux, ma moitié, mon Ludo, qui m'a supportée tout ce temps et surtout en cette fin de thèse. Merci d'avoir toujours été là, dans les bons comme dans les mauvais moments. Et enfin, un petit clin d'œil à « petit bout » qui me soutiendra de près lors de la soutenance de thèse.

Table des matières

INTRODUCTION	9
Partie I : Cellules souches neurales et cellules souches de glioblastomes	
<u>1. Qu'est-ce qu'une cellule souche ?</u>	11
<u>2. Les cellules souches neurales</u>	13
<u>2.1. CSN et neurogenèse chez l'adulte, la fin d'un dogme</u>	13
<u>2.2. Découverte des cellules souches neurales</u>	14
<u>2.3. Identité des cellules souches neurales</u>	16
<u>2.3.1. Structure de la zone sous-ventriculaire</u>	16
<u>2.3.2. Marqueurs des cellules de la zone sous-ventriculaire</u>	18
<u>2.3.3. Origine des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire</u>	20
<u>2.4. Régulation des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire par son microenvironnement</u>	21
<u>2.4.1. Facteurs de croissance</u>	21
<u>2.4.2. Neurotransmetteurs</u>	22
<u>2.4.3. Morphogènes</u>	23
<u>2.4.4. Matrice extracellulaire</u>	24
<u>2.4.5. Protéines chargées des interactions cellule-cellule</u>	24
<u>3. Les cellules souches cancéreuses de glioblastomes</u>	26
<u>3.1. Les glioblastomes</u>	26
<u>3.1.1. Epidémiologie</u>	26
<u>3.1.2. Facteurs de risques</u>	26
<u>3.1.3. Les symptômes</u>	27
<u>3.1.4. Classification</u>	28
<u>3.1.5. Traitements</u>	31

3.2. Cellules souches cancéreuses	33
3.2.1. Découverte	33
3.2.2. Caractéristiques des CSC	34
3.2.3. Origine	36
3.3. Cellules souches de glioblastomes	37
3.3.1. Découverte	37
3.3.2. Marqueurs des CSG	38
3.3.3. Régulation des CSG par le microenvironnement	39
4. Lien entre CSN et CSG	41
4.1. Caractéristiques communes	41
4.2. Origine des CSG, implication des CSN	42

Partie II : Le signal calcique

1. Les acteurs du signal calcique ou calcium toolkit	45
1.1. Les acteurs réticulaires	47
1.1.1. Les récepteurs à l'inositol trisphosphate (IP3R)	47
1.1.2. Les récepteurs à la ryanodine RyR	48
1.1.3. Les SERCA	48
1.1.4. Les canaux de fuite	49
1.2. Les acteurs mitochondriaux, golgiens et nucléaires	49
1.3. Les acteurs cytoplasmiques	50
1.4. Les acteurs de la membrane plasmique	51
1.4.1. Les PMCA	51
1.4.2. Les échangeurs NCX	52
2. Les entrées calciques dans les cellules non excitables	53
2.1. Les influx ROC et SOC	53

2.1.1. Les influx ROC.....	54
2.1.2. Les influx SOC.....	54
2.2. Les acteurs du SOC.....	56
2.2.1. Les protéines STIM.....	56
2.2.2. Les canaux Orai	58
2.2.3. TRPC	60
2.3. Pharmacologie des SOC.....	62
3. Rôle des SOC dans les CSN et les CSG	64
3.1. SOC dans le cerveau et les CSN.....	65
3.1.1. Expression des SOC dans le cerveau	65
3.1.2. Rôle des SOC dans les CSN	66
3.2. SOC dans les GBM et les CSG	67
3.2.1. SOC et GBM.....	67
3.2.2. SOC et CSG	69
OBJECTIFS.....	71
RESULTATS.....	73
Partie I : Rôle de la signalisation calcique passant par les canaux store-operated dans les cellules souches neurales.....	74
1. Rôle des canaux SOC dans les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire.....	74
2. Rôle des canaux SOC dans les cellules souches neurales de l'area postrema	97

Partie II : Rôle de la signalisation calcique passant par les canaux store-operated dans les cellules souches de glioblastomes.....	103
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	139
1. Rôle des SOC dans les cellules souches neurales.....	140
2. Rôle des SOC dans la régulation des cellules souches de glioblastomes.....	145
3. SOC, signalisation calcique et état souche.....	149
CONCLUSION.....	154
ANNEXES.....	155
Annexe 1 : Role of the calcium toolkit in cancer stem cells.....	156
Annexe 2 : Neural stem cell self-renewal stimulation by store-operated calcium entries of adult mouse area postrema: influence of leptin.....	168
BIBLIOGRAPHIE.....	200

Liste des figures

Introduction

<u>Figure 1 : Les cellules souches et leurs potentialités.....</u>	12
<u>Figure 2 : Culture en neurosphères des cellules souches neurales (CSN).....</u>	15
<u>Figure 3 : Composition cellulaire de la zone sous-ventriculaire (SVZ).....</u>	17
<u>Figure 4 : Marqueurs des cellules souches neurales de la SVZ et de leurs progéniteurs.....</u>	19
<u>Figure 5 : Caractéristiques des cellules souches cancéreuses (CSC).....</u>	35
<u>Figure 6 : Origine des CSC.....</u>	37
<u>Figure 7 : Caractéristiques communes aux CSN et CSG.....</u>	41
<u>Figure 8 : Acteurs de la signalisation calcique.....</u>	46
<u>Figure 9 : Influx calcique SOC.....</u>	55
<u>Figure 10 : Structure de la protéine STIM1.....</u>	57
<u>Figure 11 : Structure de la protéine Orai1.....</u>	59
<u>Figure 12 : Structure des protéines TRPC.....</u>	61
<u>Figure 13 : Acteurs de la signalisation calcique piratés dans les cellules souches de glioblastomes.....</u>	70

Résultats

<u>Figure 14 : Les CSN de l'area postrema sont capables de générer un SOCE.....</u>	99
<u>Figure 15 : La leptine induit une diminution du SOCE dans les CSN de l'area postrema.....</u>	101

Liste des tableaux

Introduction

Tableau 1 : Comparaison des classifications moléculaires des GBM de Phillips et Verhaak.....30

Tableau 2 : Etat de l'art des travaux sur le rôle du SOCE dans les cellules de glioblastomes.....68

Discussion et Perspectives

Tableau 3 : Etat souche et voies de signalisation activées par le Ca²⁺.....152

Abréviations

5-HT : 5-hydroxytryptamine
= sérotonine

A

AA : acide arachidonique
Aas : acides aminés
ADN : acide désoxyribonucléique
AnkR : ankyrin
ARC : arachidonate-regulated Ca²⁺
channels
AVC : accident vasculaire cérébral

B

BDNF : brain derived neurotrophic
factor
BMP : bone morphogenetic protein
BrdU : bromodésoxyuridine

C

Ca²⁺ : ion calcium
CaBP : Ca²⁺ binding protein
CAD : CRAC activation domain
Calmodulin : Ca²⁺ modulated protein
CaM : calmodulin
CaMK : Ca²⁺ modulated protein
kinase
CC : coiled-coil
CIRB : calmodulin/IP3R binding
C-MET : tyrosine protein kinase met
CNTF : ciliary neurotrophic factor
CRAC : Ca²⁺ release activated
channel
CRACM1 : CRAC modulator 1 = Orai1
CSC : cellule souche cancéreuse
CSG : cellule souche de
glioblastome
CSN : cellule souche neurale

D

DAG : diacylglycérol
DBI : diazepam binding inhibitor
protein
DII : delta-like
DMSO : diméthylsulfoxyde
DTM : domaine transmembranaire

E

EGF : epidermal growth factor
EGFR : EGF receptor

F

FGF : fibroblast growth factor
FGFR : FGF receptor

G

GABA : acide gamma-
aminobutyrique
GBM : glioblastome
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GFP : green fluorescent protein
GOK : gene overexpressed in
cancer = STIM1

H

HGF : hepatocyte growth factor
HIF : hypoxia inducible factor

I

IDH : isocitrate déshydrogénase
IP3 : inositol trisphosphate
IP3R : IP3 receptor
IPS : induced pluripotent stem cell

J

JAG1 : jagged1

K

KD : knock-down
kDa : kiloDalton
Klf1 : Krueppel-like factor 1
KO : knock-out

L

LCR : liquide céphalo-rachidien
LGC : ligand gated channel

M

MCU : mitochondrial Ca²⁺ uniporter
MEC : matrice extra-cellulaire
MERTK : myeloid-epithelial-
reproductive tyrosine kinase
MGMT : methyl guanine transferase
mHCX : échangeurs mitochondrial
Na⁺/ Ca²⁺
mNCX : échangeurs mitochondrial
H⁺/ Ca²⁺

N

NCX : échangeurs Na⁺/ Ca²⁺

NEFL :	neurofilament light
NF1 :	neurofibromatose 1
NFAT :	nuclear factor of activated T-cells
NFκB :	nuclear factor kappa B

O

OCT-4 :	octamer binding transcription factor 4
OLIG2 :	oligodendrocyte transcription factor 2
OMS :	organisation mondiale de la santé

P

P53 :	protein 53
PCNA :	proliferating cell nuclear antigen
PDGF :	platelet derived growth factor
PDGFR :	PDGF receptor
PDZ :	domaine de liaison protéique (Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, Zonula occludens-1 protein)
PECAM1 :	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PEDF :	pigment epithelium-derived factor
PIP2 :	phosphatidyl inositol bisphosphate
PKA :	protéine kinase A
PKC :	protéine kinase C
PLA :	phospholipase A
PLC :	phospholipase C
PMCA :	plasma membrane ATPase
PTEN :	phosphate and tensin homolog

R

RCPG :	récepteur couplé à des protéines G
ROC :	receptor-operated channel
ROCE :	receptor-operated calcium entry
RTK :	récepteur à tyrosine kinase
RyR :	ryanodine receptor

S

S1P :	sphingosine-1-phosphate
S1PR :	S1P receptor

SAM :	sterile alpha motif
SERCA :	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ -ATPase
shRNA :	short-hairpin RNA
Shh :	sonic hedgehog
siRNA :	small interfering RNA
Smo :	smoothened
SMOC :	second messenger operated channel = ROC
SNC :	système nerveux central
SOAR :	STIM-Orai activation domain
SOC :	store-operated channel
SOCE :	store-operated Ca ²⁺ entry
SOX2 :	sex determining region Y box2
SPCA :	secretory pathway Ca ²⁺ ATPase
STIM :	stromal interaction molecule
SVF :	sérum de veau fœtal
SVZ :	zone sous-ventriculaire
SYT1 :	synaptotagmin 1

T

TG :	thapsigargine
TGFα :	transforming-growth factor alpha
TMZ :	témazolomide
TNF :	tumor necrosing factor
TOP2A :	DNA topoisomerase 2 alpha
TP53 :	tumor protein 53 = p53
TRP :	transient receptor potential
TRPA :	TRP Ankyrine
TRPC :	TRP Canonical
TRPM :	TRP Mélastatine
TRPML :	TRP Mucolipine
TRPN :	TRP NO (monoxide d'azote) mécanosensible
TRPP :	TRP Molycistine
TRPV :	TRP Vanilloïde
TRPY :	TRP Yeast

V

VCAM1 :	vascular cell adhesion molecule 1
VDAC :	voltage dependent anion channel
VEGF :	vascular endothelial growth factor
VEGFR :	VEGF receptor
VOC :	voltage-operated channel

Introduction

Partie I :

Cellules souches neurales

&

Cellules souches cancéreuses

de glioblastomes

1. Qu'est-ce qu'une cellule souche ?

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées capables de s'autorenouveler et de se différencier en plusieurs types cellulaires dont le nombre dépend du stade du développement ainsi que du tissu dont elles proviennent.

Chez les mammifères, les cellules souches sont dites totipotentes du stade de zygote à morula c'est-à-dire capable de générer toutes les cellules d'un individu ainsi que les annexes embryonnaires. Au stade de blastocyste les cellules souches appelées alors cellules souches embryonnaires sont pluripotentes : elles sont capables de générer toutes les cellules de l'individu mais pas les annexes embryonnaires. Chez l'adulte on retrouve des cellules souches chargées de l'homéostasie tissulaire qui sont dites multipotentes : elles sont capables de générer différents types cellulaires d'un tissu. Elles portent un nom en lien avec le tissu dont elles régulent l'homéostasie : cellules souches hématopoïétiques, cellules souches neurales, cellules souches mésenchymateuses, épidermiques, intestinales, (figure 1).

Les cellules souches partagent des propriétés cardinales : autorenouvellement, prolifération quasi-illimitée et différenciation en différents types cellulaires.

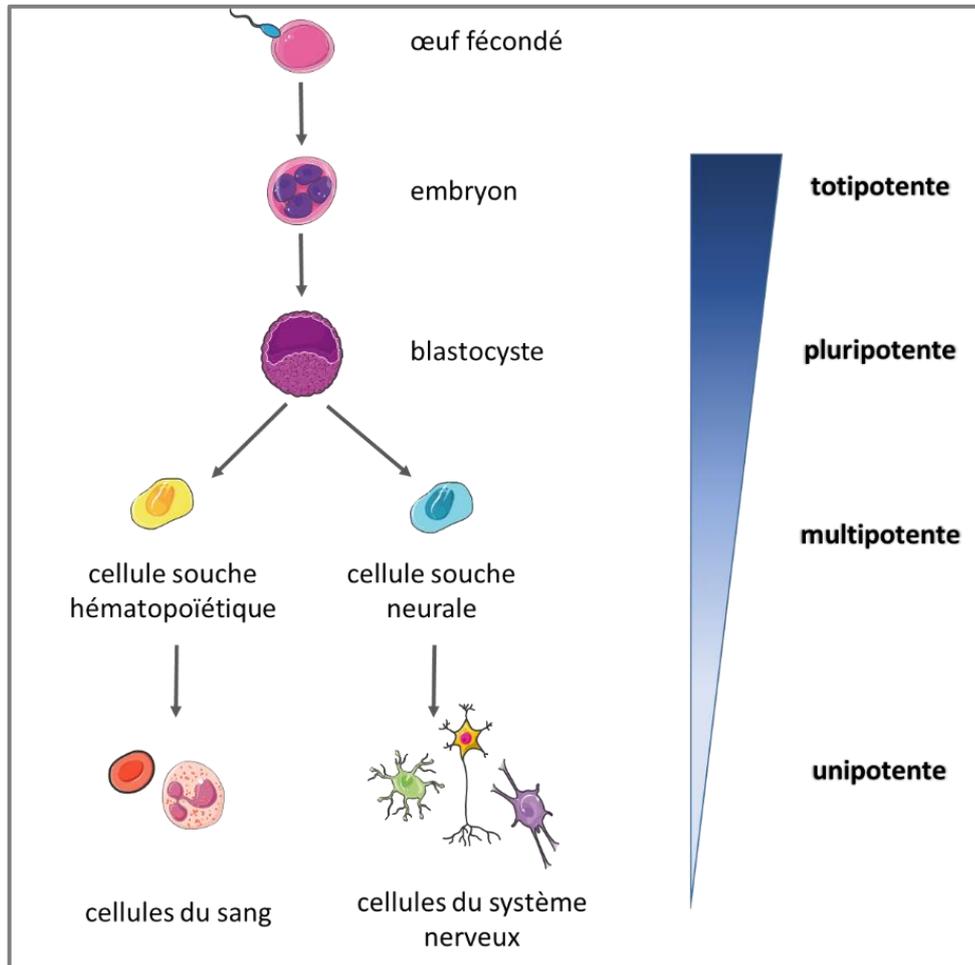


Figure 1 : Les cellules souches et leurs potentialités. Au stade d'embryon, les cellules souches embryonnaires sont dites totipotentes. Au stade de blastocyste elles sont qualifiées de pluripotentes. A l'âge adulte, les cellules souches présentes dans l'organisme sont des cellules souches multipotentes. Elles donnent naissance à des cellules différenciées.

2. Les cellules souches neurales

Les cellules souches neurales (CSN) adultes sont responsables du maintien de l'homéostasie tissulaire du cerveau. Ces cellules, situées dans des zones cérébrales appelées niches neurogéniques, sont à l'origine du renouvellement des cellules gliales et des neurones. Jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle, le cerveau adulte était considéré comme un organe fini incapable de régénération et notamment de formation de nouveaux neurones (neurogenèse). Si l'existence de neurogenèse chez la souris adulte est désormais un consensus scientifique, la présence de genèse de nouveaux neurones dans le cerveau chez l'Homme après l'adolescence, bien qu'étayée par plusieurs publications (Boldrini et al., 2018; Eriksson et al., 1998; Moreno-Jiménez et al., 2019; Tobin et al., 2019), a encore été questionnée ces dernières années (Sorrells et al., 2018).

2.1. CSN et neurogenèse chez l'adulte, la fin d'un dogme

Au début du 20^{ème} siècle, le père de la théorie neuronale et prix Nobel en 1906, Santiago Ramon y Cajal, est à l'origine de l'hypothèse selon laquelle dans le cerveau adulte, les circuits nerveux sont fixés, finis et immuables, et que rien ne peut être régénéré. Cette hypothèse prendra l'ampleur d'un dogme jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle malgré les mots même de Ramon y Cajal « It is for the science of the future to change, if possible, this harsh decree."

En 1965, Altman est le premier à observer de la neurogenèse dans un cerveau de mammifère adulte. Ces résultats se basent sur un marquage par thymidine tritiée des cellules ayant proliféré, associé à une identification morphologique des cellules marquées. Ainsi, il met en évidence la formation de nouveaux neurones dans l'hippocampe et le bulbe olfactif de rats adultes. Ces travaux allant à l'encontre du dogme stipulant une absence de genèse de nouveaux neurones chez l'adulte, il fut suggéré que des astrocytes et non des neurones avaient été observés (Altman and Das, 1965).

Ce n'est qu'à la fin du 20^{ème} siècle, grâce à l'arrivée des techniques d'immunohistochimie, que les travaux d'Altman ont été confirmés chez les rongeurs, les primates non humains

puis l'être humain. C'est en 1998, que les travaux d'Eriksson et collaborateurs, ont mis un terme à ce dogme en démontrant l'existence d'une neurogenèse dans le cerveau humain adulte. Pour ce faire, ils ont eu accès, post-mortem, à des cerveaux de patients atteints de cancer qui avaient reçu une injection de BrdU (bromodésoxyuridine) pour suivre la progression tumorale. Au décès de ces patients, les cerveaux ont été récupérés et les cellules BrdU positives phénotypées. Ainsi, l'équipe d'Eriksson a pu établir l'existence d'une neurogenèse dans l'hippocampe de cerveau humain adulte (Eriksson et al., 1998), zone impliquée dans l'apprentissage et la mémoire.

Un nouveau rebondissement sur l'existence d'une neurogenèse dans le cerveau adulte humain a eu lieu en 2018 et 2019. L'équipe d'Alvarez-Buylla publie en 2018, que pendant l'enfance la neurogenèse décroît drastiquement jusqu'à devenir inexistante chez l'adulte (Sorrells et al., 2018), confirmant les travaux d'une autre équipe (Dennis et al., 2016). Mais en 2018 et 2019, trois équipes différentes définissent qu'il y a neurogenèse jusqu'à un âge très avancé (plus de 90 ans) et que cette neurogenèse décroît drastiquement dans les cerveaux de patients atteints d'Alzheimer (Boldrini et al., 2018; Moreno-Jiménez et al., 2019; Tobin et al., 2019). D'où viennent ces contradictions ? Il semblerait qu'il s'agisse d'un problème de méthodologie. En effet il n'y a pas de méthode systématique d'étude du cerveau humain, les législations étant différentes en fonction des pays. Or la préservation des tissus post-mortem est une étape clef pour la bonne réussite des marquages en immunohistochimie. Un autre paramètre est qu'il est important d'avoir connaissance de l'état pathologique ou non des individus étudiés (pour revue : (Kumar et al., 2019)).

2.2. Découverte des cellules souches neurales

C'est en 1992 que Reynolds et Weiss ont isolé à partir de la région sous-ventriculaire de souris adultes, des cellules qui, *in vitro*, ont des caractéristiques de CSN multipotentes. Cultivées en présence d'EGF (epidermal growth factor) et de FGF (fibroblast growth factor), ces cellules poussent en formant des amas de cellules indifférenciées appelés neurosphères. Les cellules issues des neurosphères primaires sont capables de former après dissociation en cellule unique, de nouvelles neurosphères dites secondaires. Si elles sont placées dans un milieu de différenciation, ces cellules donnent naissance aux trois

principaux types cellulaires du système nerveux central (SNC) : astrocytes, oligodendrocytes, neurones (figure 2). Reynolds et Weiss avaient donc identifié des cellules ayant des caractéristiques de CSN dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) de cerveau de souris adulte (Reynolds and Weiss, 1992).

En 2004, Sanai et coll ont isolé des cellules partageant les caractéristiques des CSN à partir de prélèvements de la SVZ de patients effectués post-mortem, mettant ainsi en évidence la présence de CSN dans la SVZ chez l'Homme (Sanai et al., 2004).

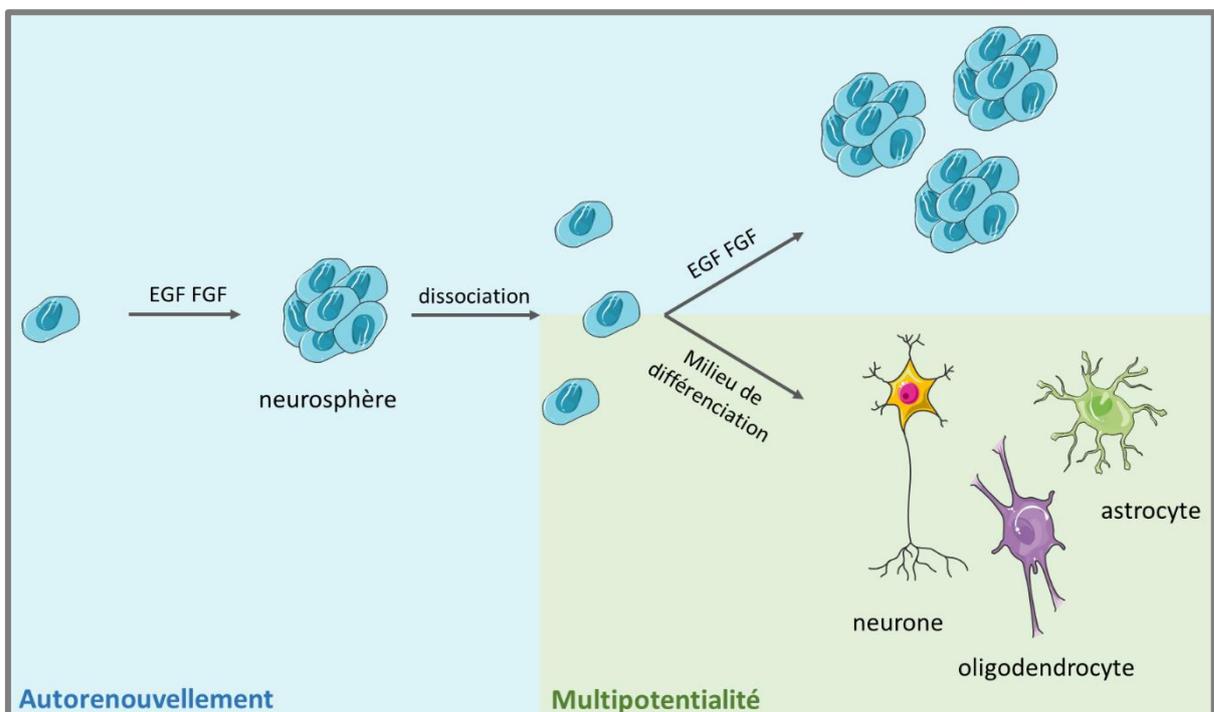


Figure 2 : Culture en neurosphères des cellules souches neurales (CSN). Cultivées en présence d'EGF et de FGF, les CSN poussent en formant des amas appelés neurosphères. Dans ce milieu, les cellules issues de la dissociation des neurosphères primaires forment des neurosphères secondaires. En revanche, si elles sont placées dans un milieu de différenciation, ces cellules peuvent être à l'origine de la production de neurones, astrocytes et oligodendrocytes. La couleur des zones dépend de la propriété cardinale impliquée (bleu : autorenouvellement, vert : multipotentialité).

2.3. Identité des cellules souches neurales

Pour connaître l'identité des cellules souches neurales, il faut s'intéresser à l'endroit où elles résident. Les CSN sont retrouvées dans des zones spécifiques appelées niches neurogéniques. La plus grande niche neurogénique des mammifères est la SVZ, et la seconde, le gyrus denté de l'hippocampe. Ces deux niches sont les plus décrites et les plus étudiées mais il existe d'autres niches plus petites à divers endroits du cerveau comme par exemple l'*area postrema* (une des structures du complexe vagal dorsal) (Bauer et al., 2005).

2.3.1. Structure de la zone sous-ventriculaire

La zone sous-ventriculaire borde le ventricule latéral dans chaque hémisphère cérébral. Située sous la couche de cellules épendymaires, la SVZ est composée de 3 types de cellules : les cellules A, B et C.

Les cellules souches neurales de la SVZ correspondent à une sous-population de cellules B, appelées cellules B1. Ces cellules sont situées sous la couche de cellules épendymaires et possèdent un long cil primaire baignant dans le ventricule. Ces cellules sont capables d'autorenouvellement et de formation des cellules progénitrices, les cellules de type C. Les progéniteurs sont à l'origine de la production de neuroblastes (cellules de type A) qui prolifèrent et migrent vers le bulbe olfactif où ils donnent naissance à des neurones s'intégrant dans le réseau neuronal existant (figure 3).

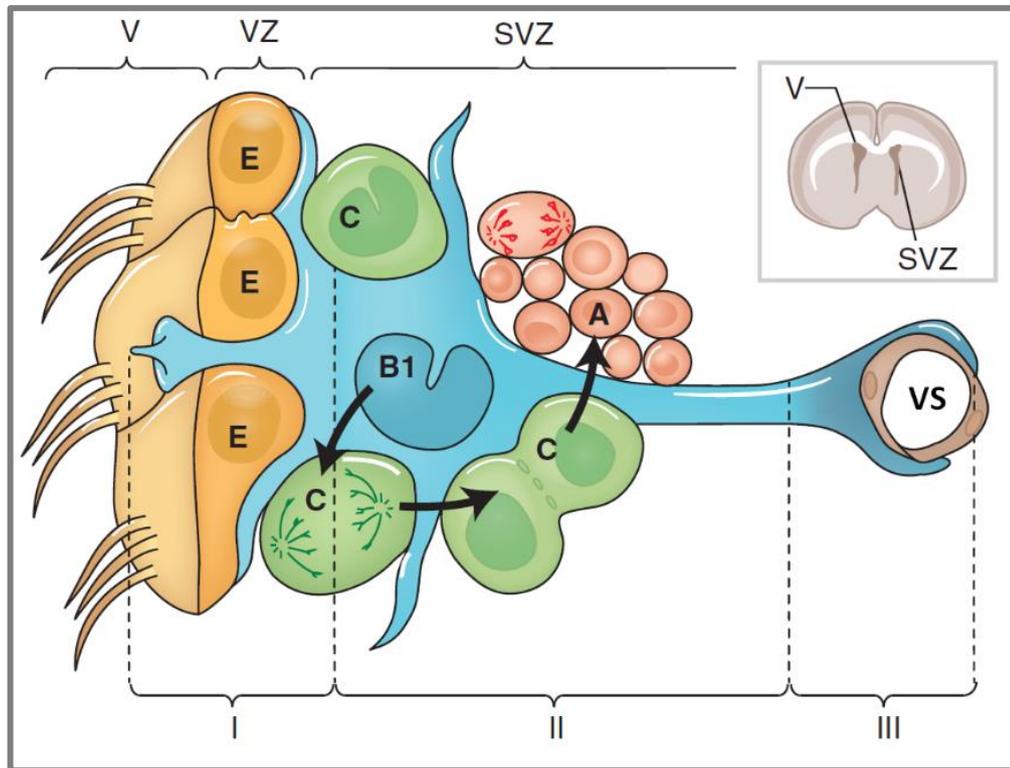


Figure 3 : Composition cellulaire de la zone sous-ventriculaire (SVZ). Dans l'encart en haut à droite, une coupe coronale de cerveau de souris adulte permettant de localiser la SVZ. Les cellules B1 (en bleu) sont les CSN de la SVZ. Elles sont à l'origine des cellules C (en vert), des progéniteurs ayant une forte activité proliférative et qui donnent naissance aux cellules A, les neuroblastes. Les neuroblastes, quant à eux, sont capables d'amplification et de différenciation pendant leur migration jusqu'au bulbe olfactif. Les CSN (cellules B1) peuvent être divisées en 3 domaines : le domaine I (apical) est le long cil primaire situé dans la zone ventriculaire (VZ), en contact avec les cellules épendymaires et baignant dans le ventricule (V) ; le domaine II (intermédiaire) est situé dans la SVZ, il s'agit du corps cellulaire de la CSN, qui est en contact avec les cellules de type C et A ; le domaine III (basal) constitue le processus basal de la cellule et est en contact avec les vaisseaux sanguins (VS). Adapté de (Lim and Alvarez-Buylla, 2016).

2.3.2. Marqueurs des cellules de la zone sous-ventriculaire

L'identification des CSN de la SVZ peut se faire en utilisant des marqueurs dits fonctionnels des cellules souches comme SOX2 (sex determining region Y box 2), Oct-4 (octamer binding transcription factor 4) ou encore Nanog. Afin de pouvoir utiliser la cytométrie en flux pour isoler cette population, des marqueurs membranaires ont été recherchés.

Une caractéristique des CSN de la SVZ est leur expression de la GFAP (glial fibrillary acidic protein), mais il s'agit d'un marqueur cytoplasmique qu'elles ont en commun avec les astrocytes, par conséquent il ne doit pas être utilisé seul. Le marqueur membranaire CD133 ou prominin 1 a été souvent utilisé pour enrichir en CSN mais il est important de noter que l'expression de CD133 est variable dans les CSN et qu'il est aussi exprimé par les cellules épendymaires (Beckervordersandforth et al., 2010; Coskun et al., 2008; Mirzadeh et al., 2008). Le marqueur LewisX (Lex)/CD15/SSEA-1 est un marqueur membranaire des CSN de la SVZ pouvant aussi être exprimé à bas bruit dans certains neuroblastes (Capela and Temple, 2002; Imura et al., 2006; Shen et al., 2008) ; son expression est plus importante dans les CSN quiescentes comparées aux actives (Daynac et al., 2013). L'EGFR (EGF receptor) est exprimé par les CSN actives mais aussi par des progéniteurs (Pastrana et al., 2009). Enfin, la Nestin, un neurofilament intermédiaire, est exprimée par les CSN, les progéniteurs et quelques neuroblastes. Des études suggèrent que son expression dans les CSN concernerait celles engagées dans une prolifération active (CSN actives) et peu les cellules quiescentes (Codega et al., 2014).

Les progéniteurs sont caractérisés par l'expression de l'EGFR et de la Nestin, tandis que les neuroblastes expriment la β 3 tubuline (figure 4).

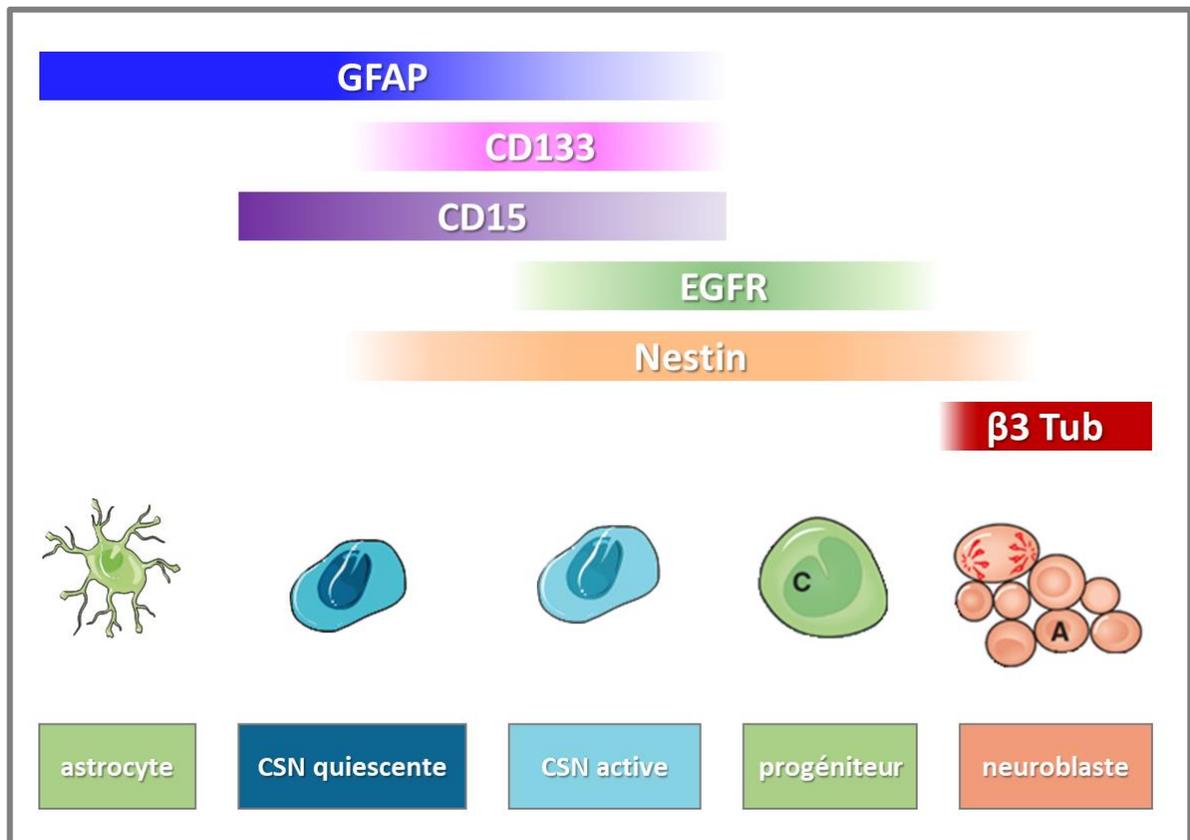


Figure 4 : Marqueurs des cellules souches neurales de la SVZ et de leurs progéniteurs. Les CSN expriment la GFAP, CD15, CD133 et la Nestin. En plus de ces marqueurs les CSN actives expriment également l'EGFR. Les progéniteurs expriment l'EGFR ainsi que la Nestin et les neuroblastes, quant à eux, expriment la β3 tubuline et la Nestin. Adapté de (Codega et al., 2014).

2.3.3. Origine des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire

Au cours du développement embryonnaire, le système nerveux antérieur provient de cellules neuroépithéliales bordant le tube neural. Ces cellules immatures vont s'amplifier de façon intense par divisions symétriques successives pour donner naissance à la plaque neurale (Rakic, 1988) et ce sont elles qui sont à l'origine des cellules de la glie radiaire. Les cellules de la glie radiaire ont une morphologie particulière : elles possèdent un cil en contact avec le LCR (liquide céphalo-rachidien) et un long prolongement gardant le contact avec la zone marginale (Gadisseux et al., 1989). Ces cellules se multiplient pour donner d'autres cellules de la glie radiaire ou pour donner un neuroblaste qui va se servir de la glie radiaire comme d'un échafaudage pour migrer d'abord dans les couches profondes puis dans les couches superficielles corticales (Noctor et al., 2002). Les astrocytes sont produits plus tard dans le développement embryonnaire, et les oligodendrocytes ne sont produits que durant la période post-natale (Bayraktar et al., 2015; Sauvageot and Stiles, 2002). Quelques jours après la naissance, il n'y a plus de cellules de la glie radiaire.

L'étude des CSN présentes au niveau de la SVZ du cerveau adulte a révélé qu'elles possédaient un long cil primaire baignant dans le LCR ainsi que le marqueur des cellules gliales GFAP suggérant une filiation possible avec les cellules de la glie radiaire (Doetsch et al., 1997; Tramontin et al., 2003). Pour étudier cette filiation, l'équipe d'Arturo Alvarez-Buylla a réalisé des expériences de traçage de lignage au moyen du système Cre/Lox utilisant l'injection d'adénovirus possédant la Cre dans des souris ayant des gènes rapporteurs (tels que la GFP, green fluorescent protein) en aval de sites LoxP. La recombinaison de l'ADN au niveau des sites LoxP par l'enzyme Cre dans les cellules infectées induit l'expression de GFP et permet ainsi marquer spécifiquement les cellules infectées ainsi que leur descendance. L'injection de l'adénovirus dans des cellules de la glie radiaire chez la souris nouveau-né a permis de montrer que ces cellules étaient à l'origine des cellules souches de la SVZ, de neurones, oligodendrocytes et astrocytes, ainsi que de neuroblastes retrouvés dans le flux rostral migratoire de souris adultes (Merkle et al., 2004). Ces résultats suggérant que les cellules de la glie radiaire sont à l'origine des CSN adultes ont été corroborés par des travaux montrant qu'une différenciation prématurée des cellules de la glie radiaire, suite à la perte de VCAM1 (vascular cell

adhesion molecule 1), aboutissait à une perte des CSN de la SVZ (Hu et al., 2017; Kokovay et al., 2012).

2.4. Régulation des cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire par son microenvironnement

Des facteurs intrinsèques tels que le profil génétique, épigénétique ou métabolique régulent les CSN ainsi que nombreux facteurs extrinsèques liés au microenvironnement cellulaire. En effet, les niches neurogéniques sont des zones du cerveau ayant un microenvironnement particulier permettant le maintien des CSN et de la neurogenèse.

2.4.1. Facteurs de croissance

Parmi les facteurs de croissance, l'EGF et le FGF ont été les premiers utilisés *in vitro* pour cultiver les CSN. Ces 2 facteurs de croissance *via* l'activation de leurs récepteurs, favorisent la prolifération des CSN et des progéniteurs et inhibent leur différenciation (Doetsch et al., 2002; Matsuoka et al., 2003). Il est à signaler une présence de TGF α (transforming-growth factor alpha) et de bêtacelluline dans la niche, tous deux capables d'activer les récepteurs à l'EGF (Gómez-Gavero et al., 2012; Tropepe et al., 1999).

D'autres facteurs de croissance ont été identifiés comme régulateurs de la SVZ. Parmi eux, le BDNF (brain derived neurotrophic factor) stimule la neurogenèse (Zigova et al., 1998) et le VEGF (vascular endothelial growth factor) augmente la prolifération et la survie des précurseurs (Jin et al., 2002).

Le PEDF (pigment epithelium derived factor) et le HGF (hepatocyte growth factor) tous deux produits par les cellules de la SVZ jouent un rôle dans le maintien des CSN : ils stimulent *in vitro* et *in vivo* l'autorenouvellement des CSN (Andreu-Agulló et al., 2009; Nicoleau et al., 2009; Ramírez-Castillejo et al., 2006).

Les cellules endothéliales quant à elles produisent également de la neurotrophin-3 qui favorise la quiescence des cellules souches neurales (Delgado et al., 2014).

2.4.2. Neurotransmetteurs

Les CSN sont régulées par les neurotransmetteurs provenant de cellules de la niche, le GABA (acide gamma-aminobutyrique) et l'acétylcholine, mais aussi par des fibres sérotoninergiques et dopaminergiques provenant du noyau raphé pour les unes et de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale pour les autres.

Le GABA est le principal neurotransmetteur inhibiteur du SNC. Produit par les neuroblastes de la SVZ, le GABA diminue la prolifération des CSN (Liu et al., 2005). Par ailleurs, le blocage du récepteur GABA_A active les CSN quiescentes et entraîne une augmentation de prolifération dans la SVZ (Daynac et al., 2013; Fernando et al., 2011). Par conséquent, les neuroblastes exerceraient un rétrocontrôle négatif sur les CSN par la production de GABA. Par ailleurs, les CSN et les progéniteurs sécrètent du DBI (diazepam binding inhibitor protein) une molécule qui empêche la liaison du GABA à son récepteur et qui est responsable de l'augmentation de la prolifération et de la neurogenèse dans la SVZ (Alfonso et al., 2012).

Une population de neurones cholinergiques existe en bordure de la SVZ (Cooper-Kuhn et al., 2004). L'acétylcholine produite est capable de favoriser la production et la survie des neuroblastes (Cooper-Kuhn et al., 2004; Ho et al., 2009).

La SVZ est par ailleurs innervée par les fibres sérotoninergiques issues du noyau raphé. Ces fibres forment un plexus supra-épendymaire en contact direct avec les cellules épendymaires et les CSN (Tong et al., 2014). La sérotonine produite (ou 5-HT (5-hydroxytryptamine)) induit une augmentation de la neurogenèse dans la SVZ (Banar et al., 2004; Tong et al., 2014). De plus, l'activation par optogénétique des fibres sérotoninergiques contrôle la migration des neuroblastes par un mécanisme mettant en jeu un influx calcique via les récepteurs 5-HT_{3A} (García-González et al., 2017).

De même, la SVZ est innervée par les fibres dopaminergiques issues de la substance noire et de l'aire tegmentale ventrale (Höglinger et al., 2004). Les progéniteurs expriment des récepteurs de type D2 dont l'activation induit une augmentation de la prolifération. L'inhibition de l'expression (knock-out) ou le blocage pharmacologique de ces récepteurs

dans des souris aboutit à une diminution de la prolifération dans la SVZ et une diminution de la genèse des neuroblastes (Coronas et al., 2004; Lao et al., 2013).

2.4.3. Morphogènes

Des morphogènes de la famille des BMP (bone morphogenetic protein), Shh (Sonic hedgehog) et Wnt sont présents au niveau de la SVZ et peuvent donc réguler les CSN.

Shh et son récepteur Smo (smoothened) sont exprimés au niveau de la SVZ (Balordi and Fishell, 2007; Palma et al., 2005). Shh en se liant à son récepteur Patched lève l'inhibition qu'il portait sur Smo et permet la transduction du signal. Il a été rapporté que la voie Shh stimule la prolifération cellulaire et la sortie de quiescence des CSN (Jiao and Chen, 2008). Des travaux ultérieurs ont montré qu'une activation de la voie de signalisation Shh suite à l'inactivation de Patched aboutit à une augmentation du pool de CSN au détriment de la neurogenèse, ceci en favorisant les divisions symétriques prolifératives (une CSN va donner naissance à deux CSN) au détriment des divisions asymétriques (Feret et al., 2014).

Le récepteur Notch1 ainsi que ses ligands JAG1 (jagged1) et Dll1 (delta like 1) sont exprimés au sein de la SVZ (Stump et al., 2002). La liaison d'un de ses ligands sur leur récepteur induit la libération du domaine intracellulaire de Notch qui va être responsable de la transduction du signal. Dans les CSN, la voie de signalisation Notch est impliquée dans le maintien de la quiescence des CSN. Dll1 est exprimée par les CSN actives. Lors des divisions asymétriques, ce ligand de Notch restera exprimé par une des deux cellules filles, celle qui entrera en prolifération, alors que l'autre exprimera le récepteur Notch. Ainsi les CSN quiescentes sont maintenues grâce à leur cellules filles par une transmission asymétrique de Dll1 (Kawaguchi et al., 2013).

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine affecte particulièrement les CSN et les progéniteurs. La stimulation de cette voie de signalisation dans la SVZ entraîne une augmentation de la prolifération et de l'autorenouvellement des CSN (Qu et al., 2010).

Des BMP et leur récepteur sont présents dans la SVZ ainsi que Noggin un antagoniste des BMP qui est produit localement notamment par les cellules épendymaires (Lim et al.,

2000; Peretto et al., 2002). Les BMP diminuent la neurogenèse et stimulent la formation de cellules gliales (Mercier and Douet, 2014). La production de l'antagoniste Noggin par les cellules épendymaires permet ainsi une stimulation locale de la neurogenèse (Lim et al., 2000).

2.4.4. Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) joue un rôle important dans la régulation des CSN (pour revue : (Theocharidis et al., 2014)). Par exemple, les structures spécialisées appelées fractones sont capables de servir de tampon/réserve de facteurs de croissance ou morphogènes (Mercier, 2016; Mercier and Douet, 2014). De plus, les fractones sont composées, entre autres, de laminine $\alpha 5$, l'inactivation génétique de cette protéine dans les cellules épendymaires de souris transgéniques augmente la prolifération cellulaire dans la SVZ et diminue le nombre de CSN quiescentes (Nascimento et al., 2018).

D'autres protéines de la MEC, les tenascines sont importantes pour la régulation de la SVZ (Theocharidis et al., 2014). Par exemple la tenascine R est impliquée dans la migration des neuroblastes vers le bulbe olfactif des souris adultes (David et al., 2013).

La vitronectine, une glycoprotéine présente dans le sang et au niveau de la MEC de différents organes, stimule la différenciation des CSN *via* l'augmentation de la production du facteur pro-angiogénique CNTF (ciliary neurotrophic factor) (Jiao and Chen, 2008).

2.4.5. Protéines chargées des interactions cellule-cellule

Les éphrines, des ligands membranaires, et leur récepteur Eph sont présents au niveau de la SVZ. L'éphrine A2 est exprimée par les progéniteurs et les neuroblastes tandis que le récepteur EphA7 est présent dans les CSN et les cellules épendymaires. L'interaction entre ces 2 protéines inhibe la prolifération dans la SVZ, montrant une régulation des CSN par leur cellules filles (Holmberg et al., 2005).

Par ailleurs, la signalisation passant par l'EphB2 est impliquée dans la prolifération et l'autorenouvellement des CSN : l'injection intraventriculaire de l'ectodomaine de Eph2 ou de l'éphrine B2 augmente la prolifération cellulaire et induit une multiplication par 8 du nombre de CSN au niveau de la SVZ (Conover et al., 2000).

Les CSN expriment spécifiquement le récepteur EphA4, qui préserve les CSN dans un état indifférencié. S'il est absent, cela entraîne une diminution de la prolifération et une augmentation de la différenciation des CSN (Khodosevich et al., 2011).

Les cadhérines sont des glycoprotéines impliquées dans les interactions cellule-cellule. Les CSN de la SVZ expriment le N-cadhérine et la E-cadhérine toutes deux impliquées dans la régulation des CSN (Karpowicz et al., 2009; Porlan et al., 2014). La E-cadhérine régule l'autorenouvellement des CSN : la suppression de son expression diminue l'autorenouvellement des CSN et augmente la prolifération des progéniteurs (Karpowicz et al., 2009). Par ailleurs, le clivage des N-cadhérines qui assurent l'adhérence des CSN aux cellules épendymaires, augmente le nombre de CSN actives, indiquant que l'adhérence des CSN aux cellules épendymaires permet de les maintenir en quiescence (Porlan et al., 2014).

3. Les cellules souches cancéreuses de glioblastomes

3.1. Les glioblastomes

3.1.1. Épidémiologie

Le glioblastome (GBM) est la forme la plus grave mais aussi la plus fréquente de gliome. Les gliomes sont des tumeurs cérébrales touchant les cellules de la glie (astrocytes et/ou oligodendrocytes).

Le GBM représente seulement 2% des cancers avec une incidence de 5 à 8 cas pour 100.000 habitants selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), mais sa médiane de survie après diagnostic de 14-15 mois en fait un réel problème de santé public. Le GBM représente 50% des gliomes observés et ce, indépendamment de l'âge. Il peut survenir à tout âge mais on observe un pic d'incidence entre 55 et 60 ans. Cette pathologie touche plus les hommes (incidence de 5,4) que les femmes (incidence de 3,6) (Reni et al., 2017). Les pays développés semblent les plus touchés mais cette différence pourrait être due à un sous-diagnostic de la pathologie dans certains pays (Hanif et al., 2017).

3.1.2. Facteurs de risques

L'étiologie des GBM est peu connue. Le seul risque confirmé est l'exposition à de hautes doses de rayons ionisants. Des doses plus faibles pourraient avoir un effet notamment si elles sont reçues pendant l'enfance. Ainsi, une étude de 2013 a montré que chez les patients ayant subi un examen par tomodensitométrie durant leur enfance ou adolescence, il y avait un risque augmenté d'un facteur 2 de développer une tumeur cérébrale. Ce risque augmente avec la dose de rayon reçue (Mathews et al., 2013). A cause des effets des rayons ionisants sur la prévalence des tumeurs cérébrales, de nombreuses études se sont intéressées aux effets potentiels des champs électromagnétiques et radiofréquences des téléphones portables. Certaines équipes ont montré qu'un usage régulier augmenterait le risque de gliome (Baan et al., 2011; Hardell and Carlberg, 2015), ce qui a conduit à classer les champs électromagnétiques et radiofréquences comme carcinogènes potentiels par l'OMS. Toutefois, des études menées sur les données des

registres nationaux du cancer dans des pays tels que les Etats-Unis ou l'Australie ont montré que l'évolution de l'incidence du gliome n'a pas varié avec l'usage du téléphone mobile (Karipidis et al., 2018).

Il n'y a, à l'heure actuelle, aucune association avec des facteurs liés au mode de vie comme le tabac, le régime alimentaire, ou encore les pesticides.

Il existe des cas de gliomes familiaux (5%) dont le ou les gènes impliqués n'ont pas encore été identifiés (Wrensch et al., 1997). Enfin, des maladies génétiques rares prédisposent au GBM comme la neurofibromatose de type 1 et 2, la sclérose tubéreuse de Bourneville, le syndrome de Li-Fraumeni, et le syndrome de Turcot (Hanif et al., 2017; Ostrom et al., 2014).

3.1.3. Les symptômes

Les patients souffrant de GBM ont des symptômes différents dépendant notamment de la localisation de la tumeur.

La moitié des patients présente des symptômes « primaires » causés par la destruction du tissu cérébral par nécrose. Cette destruction cause des déficits neuronaux et des pertes cognitives dont les signes et symptômes dépendent de la localisation de la tumeur. Par exemple, des problèmes d'audition et de vision sont liés à une tumeur se situant dans le lobe temporal alors que des modifications du comportement correspondent à une tumeur située dans le lobe frontal.

D'autres symptômes dits « secondaires » peuvent être présents et sont liés à une augmentation de la pression intracrânienne engendrée par l'augmentation de la taille de la tumeur et de l'œdème. Cette augmentation entraîne des maux de tête qu'on retrouve chez 30 à 50% des patients. Ces maux de tête sont souvent unilatéraux et peuvent être accompagnés de vomissements et d'un œdème papillaire (qui est cependant de moins en moins observé grâce à une détection de la maladie de plus en plus précoce).

Enfin, en fonction de la localisation de la tumeur, 20 à 40% des patients souffrent d'épilepsies (Hanif et al., 2017).

3.1.4. Classification

Classification des gliomes selon l’OMS

Les gliomes étaient jusqu’en 2016 classés selon des critères histopathologiques utilisés par les anatomopathologistes pour rechercher le type cellulaire prédominant (astrocyte, oligodendrocyte), et le degré de malignité (nécrose, atypie nucléaire). Ainsi, les gliomes étaient répartis en 3 groupes : les astrocytomes, oligodendrogliomes et les oligoastrocytomes (aussi appelés tumeurs mixtes) de grades allant de I à IV. Le grade I correspond à des tumeurs bénignes non infiltrantes, ayant une croissance lente. Les tumeurs de grade II ont une prolifération lente mais une tendance à l’infiltration du tissu sain. Le grade III correspond à des tumeurs anaplasiques ayant une croissance rapide et un fort caractère infiltrant. Le grade IV, également appelé glioblastome (GBM), regroupe des tumeurs caractérisées par une hétérogénéité cellulaire, une croissance rapide, une nécrose et une infiltration très importante du tissu sain (Louis et al., 2007).

Ce n’est qu’en 2016 que l’OMS inclut dans la classification des gliomes des données moléculaires aux données histopathologiques. Cette classification repose principalement sur le statut muté ou non du gène de l’isocitrate déshydrogénase (IDH1, IDH2) et la présence ou l’absence de la codéletion 1p19q (codéletion du bras court du chromosome 1 et du bras long du chromosome 19). Pour les GBM, la majorité des tumeurs IDH muté proviennent de GBM secondaires à un gliome de bas grade. Quant aux tumeurs IDH non muté, il s’agit dans la plupart des cas de GBM *de novo* (Louis et al., 2016).

Classification moléculaire des glioblastomes

[Classification de Phillips](#)

Une première classification moléculaire des GBM a été publiée en 2006 et se base sur l’expression de 35 gènes pour classer les GBM en 3 groupes : proneural, prolifératif et mésenchymateux (Phillips et al., 2006)(tableau 1).

Le sous-type prolifératif est caractérisé par l’expression de gènes comme PCNA (proliferating cell nuclear antigen) et TOP2A (DNA topoisomerase 2 alpha) impliqués dans la prolifération. Les cellules tumorales sont davantage marquées par Ki67, un

marqueur de la prolifération, comparé aux deux autres sous-types. On notera aussi une expression plus élevée du marqueur souche CD133 (voir partie 3.3.2) dans ce sous-type.

Le sous-type mésenchymateux est caractérisé par l'expression de marqueurs impliqués dans l'angiogenèse comme PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), VEGF et VEGFR2 (VEGF receptor 2), et on retrouve une expression plus marquée de la Nestin et de CD44 comparé aux autres sous-groupes.

Les GBM proneuraux sont caractérisés par l'expression de gènes caractéristiques des progéniteurs comme OLIG2 (oligodendrocyte transcription factor 2) et DLL3 (Delta Like 3), un ligand de la voie de signalisation Notch.

Les médianes de survie varient en fonction du sous-type, le sous type proneural est le plus favorable avec une médiane de survie de 174,5 semaines comparée aux médianes de survie du sous-type prolifératif/classique, 60,5 semaines, et mésenchymateux, 65 semaines (Phillips et al., 2006).

Classification de Verhaak

Une deuxième classification moléculaire a été faite en 2010. Elle est basée sur l'expression de 840 gènes dans une cohorte de 189 patients. Elle divise les GBM en 4 sous-types : classique, mésenchymateux, proneural et neural (Verhaak et al., 2010) (tableau 1).

Les glioblastomes classiques sont caractérisés par une amplification du chromosome 7 et une perte du chromosome 10, l'EGFR est surexprimé (car son gène est sur le chromosome 7) et TP53 (tumor protein53) n'est pas muté. Concernant l'aspect souche, on notera une forte activation des voies de signalisation Shh avec une surexpression de SMO et GLI2, ainsi qu'une forte activation de la voie Notch avec une surexpression de NOTCH3 et JAG1.

Les glioblastomes de type mésenchymateux expriment des marqueurs mésenchymateux comme c-MET (tyrosine protein kinase met, récepteur du HGF), CD44 ou MERTK (myeloid epithelial reproductive tyrosine kinase). Ce sous-type est caractérisé par de grandes plages de nécroses dues à la surexpression des TNF (tumor necrosing factor) et à la surexpression de la voie NFκB (nuclear factor kappa B). On observe la délétion 17q11 contenant le gène NF1 (neurofibromatose 1), ainsi que la mutation de PTEN (phosphate and tensin homolog).

Les GBM proneuraux sont caractérisés par l'amplification du PDGFR α (platelet derived growth factor receptor α), et des mutations ponctuelles d'IDH1. On retrouve dans ce groupe une forte expression des gènes SOX2, OLIG2, ou encore DLL3.

Enfin le sous-type neural n'est pas caractérisé par l'expression de marqueurs spécifiques mais on peut signaler l'expression de marqueurs neuronaux comme SYT1 (synaptotagmin 1), NEFL (neurofilament light), ou encore GABAR α_1 (GABA type A receptor α_1 subunit).

Sous-type de GBM	Caractéristiques du sous-type	Marqueurs surexprimés en fonction de la classification	
		Phillips (2006)	Verhaak (2010)
Prolifératif / Classique	surexpression de marqueurs de prolifération	PCNA, TOP2A	EGFR, TP53 non muté
Mésenchymateux	surexpression de marqueurs d'angiogenèse / de marqueurs mésenchymateux	PECAM1, VEGF, VEGFR2	c-MET, CD44, MERTK, TNF
Proneural	surexpression de marqueurs neuronaux	OLIG2, DLL3	PDGFRA, OLIG2, DLL3
Neural	pas de surexpression de marqueurs spécifiques		SYT1, NEFL, GABARA1

Tableau 1 : Comparaison des classifications moléculaires des GBM de Phillips et Verhaak. Le sous-type neural est rayé en gris car des travaux récents tendent à considérer qu'il n'est pas à part mais correspond au sous-type proneural.

Apports du Cancer Genome Atlas

Ces deux classifications présentent des similitudes (cf tableau 1). Il est important de souligner que différentes études basées sur le TCGA (Cancer genome atlas) retiennent 3 sous-types sur les 4 de la classification de Verhaak : classique, mésenchymateux et la fusion des deux derniers sous-types, le sous-type neural/proneural (Shen et al., 2012; Teo et al., 2019; Wang et al., 2017).

Par exemple, une étude de 2019 a montré qu'une classification en ces 3 sous-types basée sur 500 gènes (contre 840 pour la classification de Verhaak) était robuste dans 6 différentes cohortes du TCGA (3 caucasiennes de 548, 588 et 168 individus et 3 asiatiques de 61, 52 et 60 individus), contre une seule de 183 sujets dans la classification de Verhaak.

Les 500 gènes ont été sélectionnés comme étant les 500 gènes avec l'expression la plus variable. Seul 108 gènes sur les 500 sont communs avec les 840 de la classification de Verhaak. Cependant, en comparant les 2 classifications sur une même cohorte, on retrouve les 3 clusters avec une fusion du sous-type proneural et neural, et concernant les autres sous-types 17% seulement ont changé de groupe, dont 71,9 % sont devenus mésenchymateux (Teo et al., 2019). Lors des rechutes, un glissement vers le sous-type mésenchymateux est souvent observé. Notamment, le sous-type proneural se transforme souvent en sous-type mésenchymateux après la radio et chimiothérapie. Or, le sous-type mésenchymateux est beaucoup plus agressif que le sous-type proneural et est associé à une plus grande résistance aux traitements (Fedele et al., 2019; Phillips et al., 2006; Segerman et al., 2016).

Il est important de noter que plusieurs sous-types peuvent coexister au sein d'une tumeur, la classification prenant en compte le sous-type majoritaire (Patel et al., 2014; Sottoriva et al., 2013); l'impact sur la survie peut alors être très important. Par exemple, le sous-type proneural sans signature d'autres sous-types est associée à une médiane de survie de 2 ans et une survie de 20 % à 6 ans, tandis que ce même sous-type associée à une signature de sous-type mésenchymateux est associé à une médiane de survie de moins d'un an et à un taux de survie à 2 ans nulle (Patel et al., 2014).

3.1.5. Traitements

Le traitement actuel des glioblastomes est le protocole de Stupp qui associe une résection chirurgicale lorsqu'elle est possible, suivie d'une radiothérapie concomitante avec une chimiothérapie au témozolomide (TMZ) (Stupp et al., 2005). En parallèle de ce traitement étiologique, des traitements symptomatiques peuvent être ajoutés pour améliorer la qualité de vie du patient, notamment des corticostéroïdes (contre les maux de tête et certains signes neurologiques) et des antiépileptiques (Hanif et al., 2017).

Chirurgie

La résection chirurgicale est d'autant plus efficace qu'elle est complète et comprend une zone de « sureté » autour de la tumeur. En fonction de la localisation et de l'état du patient, la balance bénéfice-risque est évaluée, le but étant d'avoir une exérèse aussi large que possible sans entraîner de risque majeur pour le patient. A cause du caractère très invasif des GBM, il est souvent difficile de retirer la tumeur dans son intégralité. Dans certains cas, la résection chirurgicale n'est pas possible car elle touche des zones comme les ganglions de la base, le tronc cérébral ou des zones du cortex « éloquent » (Hanif et al., 2017).

Radiothérapie

La radiothérapie est utilisée pour tuer les cellules cancéreuses ayant échappé à la résection chirurgicale ou de façon palliative dans les cas où la résection chirurgicale est impossible. Dans le cadre du protocole de Stupp, les GBM sont traités par 30 séances de 2 grays par jour, 5 jours par semaine (pour une dose totale de 60 grays). La radiothérapie a des limites et des effets indésirables : le caractère infiltrant des GBM, le risque de nécrose et de lésions neuronales permanentes dues aux radiations, ainsi que la radiorésistance de certaines tumeurs (Jacob and Dinca, 2009).

Chimiothérapie

Le protocole standard de traitement du GBM par chimiothérapie est la prise orale de temozolomide en traitement concomitant avec la radiothérapie puis en traitement adjuvant. En traitement concomitant, le TMZ est pris tous les jours, une heure avant la radiothérapie pendant 6 semaines à une dose de 75 mg/m². La dose est ensuite augmentée en traitement adjuvant 150-200 mg/m² pendant 5 jours d'affilée tous les 28 jours pendant 6 cycles.

Le TMZ est un agent alkylant qui va méthyler la guanine et ainsi empêcher la réplication de l'ADN. Ce blocage entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et l'induction de l'apoptose.

Les cellules tumorales ayant un fort niveau de MGMT (methyl guanine methyl transferase), une protéine de réparation de l'ADN, sont résistantes au TMZ (Bocangel et al., 2002).

Autre traitement

En cas de non-réponse au TMZ ou de récurrence, des traitements de seconde ligne sont utilisés. Parmi eux, les nitrosourées, des agents alkylants qui étaient utilisés avant le TMZ pour le traitement des gliomes, mais qui, à cause de leur forte toxicité, ne sont actuellement utilisés que pour traiter certains GBM récidivants (Brandes et al., 2016).

Des anti-angiogéniques sont aussi utilisés. En effet, le GBM est un cancer très infiltrant et fortement angiogénique. Le principal anti-angiogénique employé est un anticorps anti-VEGF. Bien que ce traitement permette d'atténuer la taille de la tumeur, il n'améliore pas la survie globale des patients comparé au protocole de Stupp et entraînerait un déclin plus rapide des fonctions cognitives (Chinot et al., 2014; Gilbert et al., 2014) ; c'est pourquoi il n'est utilisé qu'en cas de résistance au TMZ.

Enfin, des immunothérapies ciblant des récepteurs à tyrosine kinase, notamment l'EGFR, le FGFR et le PDGFR, peuvent être utilisées (Hanif et al., 2017).

3.2. Cellules souches cancéreuses

3.2.1. Découverte

Dans les années 1930, Furth et Kahn démontrèrent que l'injection d'une seule cellule leucémique humaine dans une souris pouvait induire une leucémie et la mort de l'animal, mais dans seulement 5 % des souris injectées (Furth et al., 1937). Quelques décennies plus tard, dans les années 1970, Pierce et Wallace affinèrent ce résultat en prouvant que seules les cellules indifférenciées de la tumeur étaient capables de former des tumeurs après greffe et non les cellules différenciées (Pierce and Wallace, 1971).

Il fallut attendre les années 1990, pour que l'équipe de John Dick isole pour la première fois, des cellules souches cancéreuses (CSC) en utilisant la cytométrie en flux. En

s'appuyant sur des marqueurs de cellules souches hématopoïétiques (CD34 positives et CD38 négatives), ils isolèrent une sous-population de cellules leucémiques qui, une fois injectée dans une souris immunodéficente, induit une leucémie chez la souris hôte (Lapidot et al., 1994). A la suite de cette découverte dans la leucémie, des CSC ont été identifiées dans de nombreux types de cancers dits solides : sein, cerveau, ovaire, prostate, poumon, mélanome, pancréas, foie, colon, gastro-intestinal (Al-Hajj et al., 2003; Singh et al., 2004; Bapat et al., 2005; Collins et al., 2005; Eramo et al., 2008; Fang et al., 2005; Li et al., 2007; Ma et al., 2007; O'Brien et al., 2007; Takaishi et al., 2009).

3.2.2. Caractéristiques des CSC

Les cellules souches cancéreuses ont été définies par analogie avec les cellules souches physiologiques. En effet, elles partagent des caractéristiques communes : l'autorenouvellement, une prolifération quasi-illimitée et la multipotentialité. Ainsi, des CSC peuvent être dérivées de patients grâce à une culture dans un milieu défini sans sérum de veau fœtal (SVF) et riche en facteurs de croissance comme, par exemple, l'EGF et le FGF. Dans ce milieu, les cellules poussent en colonies sous forme de sphères, et les cellules à l'origine de ces sphères sont dans la très grande majorité des cas, des CSC (Galli et al., 2004; Ponti et al., 2005; Ricci-Vitiani et al., 2007).

A la différence des cellules souches physiologiques, les CSC sont capables d'initier une tumeur, c'est-à-dire de reconstituer une tumeur lorsqu'elles sont injectées dans une souris immunodéficente. C'est la raison pour laquelle la greffe demeure de nos jours une méthode de référence permettant de mettre en évidence la présence de cellules souches cancéreuses. Les cellules possédant cette caractéristique sont appelées cellules initiatrices de tumeur et regroupent les CSC mais aussi certains progéniteurs tumoraux. Pour faire la distinction entre ces deux types de population, certaines équipes font de la greffe « en série », car seules les CSC garderont leur capacité d'initier la tumeur sur plusieurs greffes successives (Clarke et al., 2006).

Les CSC sont très résistantes aux radiothérapies et chimiothérapies classiques (Bao et al., 2006; Li et al., 2008; Liu et al., 2006), et en raison de leurs caractéristiques, sont à l'origine des rechutes (figure 5).

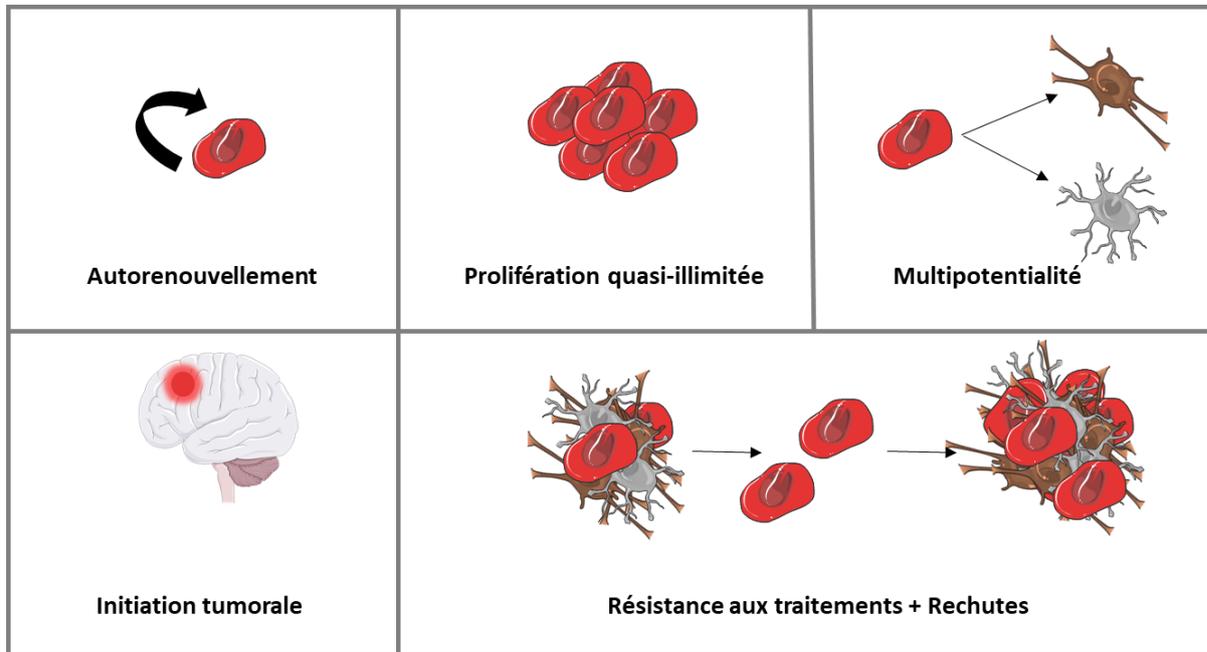


Figure 5 : Caractéristiques des cellules souches cancéreuses (CSC). Sur la première ligne : caractéristiques des CSC partagées avec les cellules souches somatiques. Sur la deuxième ligne : caractéristiques propres aux CSC.

Les marqueurs utilisés pour l'identification des CSC sont en majorité les mêmes que ceux utilisés pour reconnaître les cellules souches physiologiques. Certains marqueurs, les plus fiables, sont des facteurs de transcription et protéines structurales essentielles au fonctionnement des cellules souches saines et pathologiques comme SOX2, NANOG, OCT-4, c-MYC, Nestin, MUSASHI1. Afin d'isoler facilement par cytométrie en flux les CSC, des marqueurs membranaires ont été sélectionnés souvent en comparaison avec les cellules souches du même tissu. L'isolement des cellules souches leucémiques par exemple, peut se faire en utilisant les marqueurs CD34 et CD38, les CSC étant positives pour CD34 et négatives pour CD38, tout comme les cellules souches hématopoïétiques (Lapidot et al., 1994).

3.2.3. Origine

Les CSC alimentent la tumeur en cellules cancéreuses et sont à l'origine de la résistance aux traitements et de la rechute. Par conséquent, de nombreuses équipes se sont intéressées aux cellules à l'origine des CSC (figure 6).

Le modèle hiérarchique des CSC propose que seule une population restreinte de cellules possède les caractéristiques des CSC et que ces cellules s'autorenouvellent et sont à l'origine de l'hétérogénéité tumorale. Les cellules se rapprochant le plus de cette description, et donc étant de potentielles cellules d'origine des CSC, sont les cellules souches somatiques et leurs progéniteurs. Différentes études ont montré que les cellules souches et progéniteurs pouvaient être transformés en CSC. Par exemple, la leucémie myéloïde chronique est due à l'oncogène BCR-ABL, dont l'expression dans des cellules souches hématopoïétiques (CSH) entraîne le développement de la pathologie (Daley et al., 1990). Cette même expérience dans des cellules progénitrices entraîne le développement d'une leucémie myéloïde aigue (Zhao et al., 2007). Ces travaux démontrent que la leucémie peut émerger de cellules souches ou de progéniteurs et que dans cette pathologie, la cellule d'origine définit le type de cancer (Krivtsov et al., 2006).

D'autres études ont mis en évidence que des cellules non-souches pourraient se différencier pour devenir des CSC multipotentes. Par exemple, dans le cancer du sein et du colon, des cellules qui ne sont pas CSC peuvent avoir des propriétés souches suite à l'exposition à un microenvironnement inflammatoire ou à l'ablation des CSC (Iliopoulos et al., 2011; Shimokawa et al., 2017; de Sousa e Melo et al., 2017). Ces études mettent en évidence une plasticité des cellules non-souches liée à une forte capacité d'adaptation aux signaux du microenvironnement. Parmi les mécanismes impliqués dans cette plasticité, on retrouve l'activation aberrante de voies de signalisation responsables du maintien des cellules souches : Wnt, Hedgehog et Notch. Ainsi, dans les cancers colorectaux, une étude a montré que des myofibroblastes sécrètent de grandes quantités d'HGF, stimulant la voie de signalisation Wnt ce qui confère à des cellules non-souches des caractéristiques de CSC (Vermeulen et al., 2010). A l'opposé, l'ablation génétique des CSC de glioblastome diminue la croissance tumorale et le risque de rechute, suggérant que dans ce cancer, la plasticité des cellules non-souches est moins importante (Chen et al., 2012).

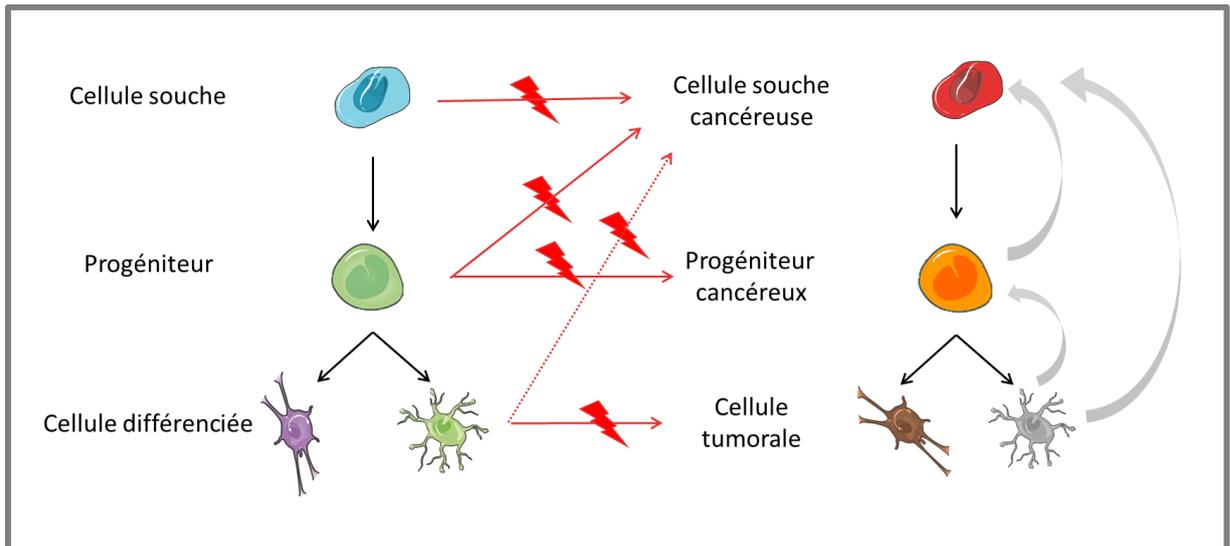


Figure 6 : Origine des cellules souches cancéreuses. Flèches rouges : les CSC peuvent être issues de la transformation de cellules souches saines/somatiques et de progéniteurs, quelques études suggèrent même qu'elles pourraient provenir d'une cellule différenciée saine. Flèches grises : la mise en évidence de l'existence d'une plasticité des cellules non-souches au sein des tumeurs suggère que des cellules tumorales différenciées et des progéniteurs tumoraux pourraient se dédifférencier en CSC.

3.3. Cellules souches de glioblastomes

3.3.1. Découverte

Les cellules souches de glioblastomes (CSG) ont été mises en évidence pour la première fois *in vitro* en 2002 par l'équipe de Steindler qui, en utilisant des échantillons de patients, a réussi à cultiver des sphères (Ignatova et al., 2002). Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans les tumeurs cérébrales : des cellules CD133 positives greffées dans des souris immunodéficientes ont permis le développement d'une tumeur (Singh et al., 2003, 2004). En 2004, Galli et coll démontrèrent que des cultures primaires, issues de résections chirurgicales provenant de patients atteints de GBM et cultivées en milieu défini, contiennent des CSG capables de reconstituer une tumeur lors de greffes en série dans des souris immunodéficientes (Galli et al., 2004).

3.3.2. Marqueurs des CSG

Les marqueurs des CSC comme SOX2, NANOG, OCT-4, Nestin, MUSASHI1, c-MYC, qui sont des acteurs essentiels au fonctionnement des cellules souches, sont les marqueurs les plus fiables pour reconnaître les CSG. Contrairement aux cancers liquides comme la leucémie, dans le glioblastome et pour d'autres cancers solides, la sélection de marqueurs membranaires est plus compliquée. Pour les CSG des marqueurs comme CD133 (ou prominin-1), CD44, CD15 (LewisX), ou L1CAM sont utilisés. Ainsi le marqueur CD133 permet d'isoler une population cellulaire hautement tumorigénique : seules 100 cellules CD133⁺ sont nécessaires pour former une tumeur chez la souris après xénotransplantation alors que 100.000 CD133⁻ en sont incapables (Singh et al., 2004). Cependant, l'expression de CD133 varie au cours du cycle cellulaire (Barrantes-Freer et al., 2015). D'autre part, la reconnaissance de l'expression de CD133 se fait *via* son épitope membranaire AC133. Or, lors de la différenciation, l'expression de AC133 diminue mais pas celle de CD133 (Kemper et al., 2010). Par ailleurs, une étude a montré que dans des cultures primaires de GBM cultivées en sphères et n'exprimant pas CD133, la xénotransplantation aboutit à la formation d'une tumeur à la même fréquence que la xénotransplantation de cellules cultivées dans les mêmes conditions et exprimant CD133 (Beier et al., 2007). Ceci démontre une diversité des CSG et l'importance d'utiliser plusieurs marqueurs, notamment les marqueurs dits fonctionnels comme SOX2, Nanog, OCT-4 ou de valider des caractéristiques des CSG par des méthodes fonctionnelles.

Le marqueur CD44 est retrouvé dans le sous-type mésenchymateux quasi exclusivement (Phillips et al., 2006). C'est d'ailleurs un marqueur des cellules mésenchymateuses saines. Récemment, l'équipe de Raphaël Rodriguez a mis en évidence un rôle insoupçonné de cette glycoprotéine membranaire : l'endocytose du fer. Jusqu'alors, seule la transferrine était connue pour jouer ce rôle ; ils ont montré que cette endocytose de fer peut interférer avec la plasticité épigénétique (Müller et al., 2019).

3.3.3. Régulation des CSG par le microenvironnement

Tout comme les CSN, les CSG sont régulées par leur microenvironnement : la niche tumorale.

En étudiant la localisation des cellules CD133+, Christensen et coll ont mis en évidence la présence de cellules CD133+ au niveau de niches mais aussi l'existence de cellules CD133+ isolées. Les cellules CD133+ regroupées en niche expriment d'avantage les marqueurs souches Sox2, EGFR et Nestin comparé à leurs homologues isolées qui pour leur part expriment plus fortement le marqueur de prolifération Ki67. Ces résultats suggèrent que les CSG sont localisées au niveau de niches tumorales et que leur activation s'accompagne d'une sortie de la niche (Christensen et al., 2011).

Les tumeurs sont souvent retrouvées près de la SVZ, la proximité avec cette zone est d'ailleurs de mauvais pronostic (Sinnaeve et al., 2018). Pour maintenir leur état indifférencié les CSG détournent les voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'état souche des cellules souches physiologiques comme la voie Wnt, Shh. Il n'est alors pas étonnant de retrouver les mêmes molécules dans la niche tumorale que dans la niche neurogénique notamment les morphogènes et les BMP (pour revue : (Lathia et al., 2015)). Ainsi, la signalisation passant par les BMP régule la quiescence des CSG et leur résistance aux traitements : BMP4 stimule la quiescence tandis que TGF- β 1 active les CSG (Sachdeva et al., 2019).

De plus, les CSG sont préférentiellement retrouvées à proximité de vaisseaux sanguins, les GBM étant des tumeurs fortement vascularisées. Ceci permet aux CSG d'avoir accès aux facteurs sécrétés par les cellules endothéliales, dont, en particulier, le ligand Shh, qui favorise l'autorenouvellement et la prolifération des CSG (Clement et al., 2007). En retour, les CSG favorisent l'angiogenèse par la sécrétion de VEGF et seraient capables de générer par transdifférenciation des péricytes ou des cellules endothéliales (Cheng et al., 2013).

Dans la tumeur, les cellules de la masse tumorale sont localisées en périphérie et les CSG au centre, au niveau de la zone nécrotique. Cette organisation résulte en un gradient d'oxygénation décroissant de l'extérieur vers l'intérieur de la tumeur : les CSG sont dans une niche hypoxique. En réponse à l'hypoxie, les cellules produisent les protéines HIF

(hypoxia inducible factor) qui participent au maintien de l'état souche, à la survie et à la résistance aux traitements des CSG (Li et al., 2009). L'hypoxie induit aussi la transcription de c-MET, et réciproquement, le HGF (son ligand) induit la production de VEGF favorisant l'angiogénèse (Joo et al., 2012). Or, le récepteur c-MET et son ligand HGF induisent une voie de signalisation connue pour favoriser la prolifération, la survie et la migration des glioblastomes (Trusolino et al., 2010).

Il est intéressant de signaler que les CSG ont un rôle direct dans l'immunosuppression. L'immunosuppression est une des caractéristiques des cancers en général et est indispensable à leur développement. Ainsi, les CSG sont capables d'inhiber les lymphocytes T cytotoxiques et de favoriser les lymphocytes T régulateurs et le recrutement des macrophages/microglie immunosuppresseurs (Tomaso et al., 2010; Wu et al., 2010).

4. Lien entre CSN et CSG

4.1. Caractéristiques communes

Les cellules souches saines et cancéreuses possèdent des propriétés cardinales des cellules souches à savoir l'autorenouvellement, la prolifération quasi illimitée ainsi que la multipotentialité. Ces deux populations sont aussi caractérisées par une faible fréquence dans le tissu/tumeur dans lequel elles résident. Enfin, elles ont en commun des marqueurs d'immaturité ou marqueurs souches (figure 7)(pour revue (Lathia et al., 2015)).

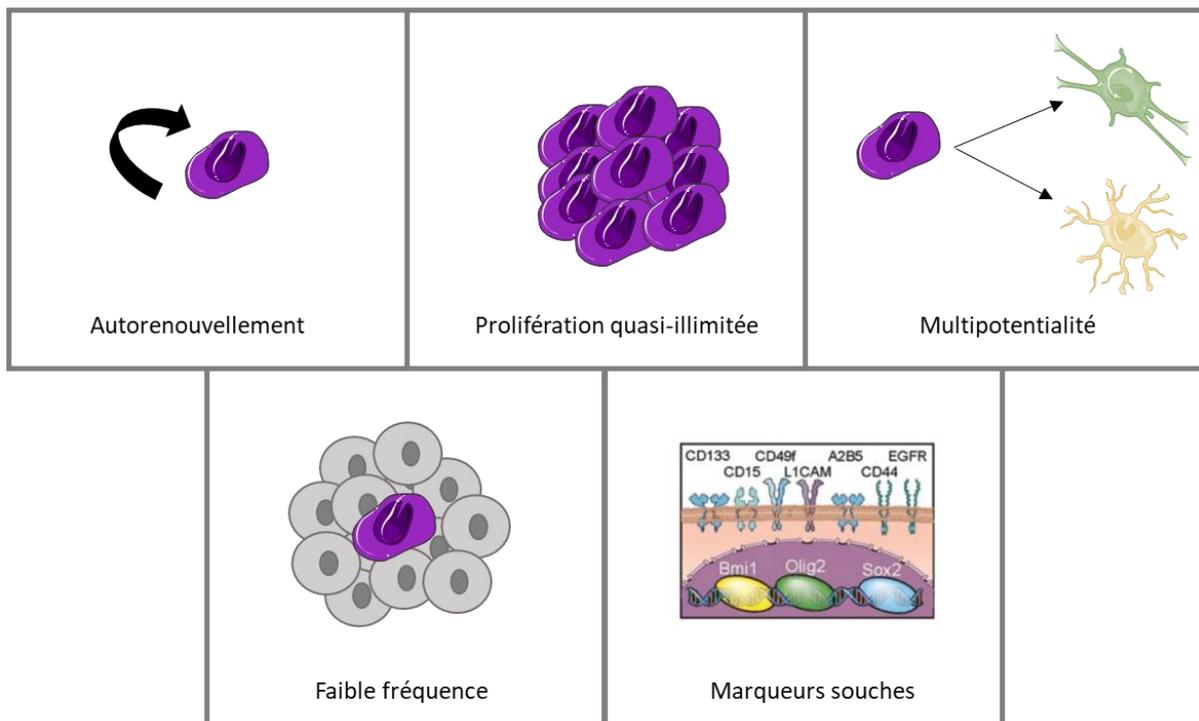


Figure 7 : Caractéristiques communes aux CSN et CSG. Les CSG et CSN possèdent les propriétés cardinales des cellules souches : l'autorenouvellement, la prolifération quasi-illimitée ainsi que la multipotentialité. Par ailleurs, ces cellules sont aussi caractérisées par une faible fréquence dans le tissu dans lequel elles résident et l'expression de marqueurs souches communs.

4.2. Origine des CSG, implication des CSN

Les CSC peuvent émerger à partir de cellules souches, de progéniteurs ou encore de cellules plus différenciées du tissu au sein duquel le cancer se développe (Moharil et al., 2017; Swartling et al., 2014). Dans le cas du glioblastome, de nombreuses études soutiennent que les CSG sont issues des CSN et de leurs progéniteurs précoces.

Etayant cette hypothèse, les travaux de Marumoto et coll. ont montré que l'introduction de mutations oncogéniques (TP53) par un système Cre-lox spécifiquement dans les CSN de Souris aboutit au développement de glioblastomes alors que ces mêmes mutations n'ont pas d'effet quand elles affectent d'autres cellules du cerveau (Marumoto et al., 2009). De même, les mutations PTEN/ P53 ou Nf1/P53/PTEN (fréquemment retrouvées dans le GBM) aboutissent à la formation de GBM uniquement si elles sont insérées dans des CSN et non des astrocytes (Alcantara Llaguno et al., 2009; Chen et al., 2012; Jacques et al., 2010).

En utilisant le même système Nf1/P53/PTEN ou Nf1/P53, l'équipe de Alcantara a montré chez la souris, que ces mutations oncogéniques insérées dans des progéniteurs précoces aboutissaient à 2 profils de GBM différents. Le premier profil correspondait à des tumeurs diffuses, infiltrantes, situées dans le cerveau dorsal et ayant une forte expression de GFAP et Nestin ; tandis que le deuxième profil correspondait à des tumeurs localisées dans le cerveau ventral, ayant des bords définis, et exprimant faiblement les marqueurs GFAP, Nestin et fortement les marqueurs Olig2 et PDGFR α . La comparaison des profils d'expression génique de ces 2 types de tumeurs leur ont permis de supposer que les tumeurs ayant un profil de type 2 avaient pour origine des progéniteurs oligodendrogiaux, théorie qu'ils ont ensuite confirmée en insérant les mutations spécifiquement dans ces cellules qui ont été capable de former des tumeurs de type 2 majoritairement mais également des tumeurs de type 1 (Alcantara Llaguno et al., 2015). Ce concept de différence de types de GBM en fonction de la cellule d'origine, a été corroboré par l'équipe de Jiang qui, en s'appuyant sur l'insertion d'une construction permettant l'autoproduction de PDGFB dans des sous-types spécifiques de cellules, a montré l'importance de la cellule d'origine dans le développement du glioblastome et dans sa résistance aux traitements. Dans ce contexte, les CSN autoproduisant le PDGFA

sont à l'origine de GBM correspondant au sous-type proneural alors que les progéniteurs autoproduisant le PDGFA conduisent à un GBM correspondant au sous-type mésenchymateux (Jiang et al., 2017).

La plupart des études menées chez les rongeurs appuient l'hypothèse selon laquelle les CSG dériveraient de cellules non différenciées, souches ou progéniteurs même si l'étude de Friedman et coll, basée sur une injection de lentivirus permettant d'éteindre l'expression de P53 et NF1 sélectivement dans les CSN, les astrocytes ou les neurones matures, a montré que les cellules immatures mais aussi des cellules matures seraient à l'origine des CSG (Friedmann-Morvinski et al., 2012).

Toutes ces études ont été réalisées chez la souris après induction de mutations oncogéniques. Il restait à savoir dans quelle mesure ces résultats sont transposables à l'Homme. Une étude de 2018, s'est intéressée à cette question en se basant sur du séquençage de GBM humain. Pour cela, 3 zones ont été prélevées et séquencées pour chaque patient : la zone tumorale (de GBM IDH wild type), de la SVZ éloignée de la tumeur ainsi que du tissu cortical sain. Dans 56,3 % des cas, les cellules de la SVZ contiennent 1% des mutations oncogéniques causales (« driver ») retrouvées à haut niveau dans la zone tumorale. Deux hypothèses s'opposaient pour expliquer ce résultat : soit une transformation des CSN de la SVZ ou une migration précoce d'un clone de GBM au sein de cette zone. Pour tester ces possibilités, les auteurs ont effectué du séquençage sur cellule unique couplée à de la microdissection laser et ont généré des modèles de souris portant ces mutations (P53, PTEN, EGFR). Ceci leur a permis de démontrer que les CSN de la SVZ contenant un bas taux de mutations oncogéniques causales migrent hors de la SVZ et forment des GBM dans des régions du cerveau éloignées de la SVZ (Lee et al., 2018). Ces travaux supportent l'hypothèse d'une relation ontogénique entre CSN de la SVZ et CSG de glioblastomes chez l'Homme.

Partie II :

Le signal calcique

1. Les acteurs du signal calcique ou calcium toolkit

L'ion calcium (Ca^{2+}) est un second messager ubiquitaire capable de réguler des fonctions cellulaires très diverses telles que la prolifération, la migration ou encore la différenciation (Berridge et al., 2000). Compte tenu des fonctions clés du Ca^{2+} dans la cellule, il est essentiel que sa concentration cytosolique soit finement régulée.

Au repos, la concentration cytosolique de Ca^{2+} est autour de 10^{-7} M alors que la concentration extracellulaire est de l'ordre de 10^{-3} M. Le maintien de ce gradient de concentration est assuré par des canaux, pompes et échangeurs présents à la membrane plasmique ainsi que dans les membranes des organites de réserves. Le réticulum endoplasmique constitue la principale réserve de Ca^{2+} de la cellule et la source principale de libération de Ca^{2+} dans le cytoplasme. Les mitochondries peuvent, elles aussi, stocker du Ca^{2+} en quantité plus faible que le RE. Enfin, l'appareil de golgi et le noyau peuvent stocker du calcium dans certaines conditions (figure 8).

Le Ca^{2+} régule de nombreuses fonctions physiologiques, et ce, de façon spécifique. En effet les variations de concentration de Ca^{2+} intracellulaire sont contrôlées dans l'espace, le temps et leur amplitude. La variation de ces paramètres permet d'activer une voie de signalisation précise.

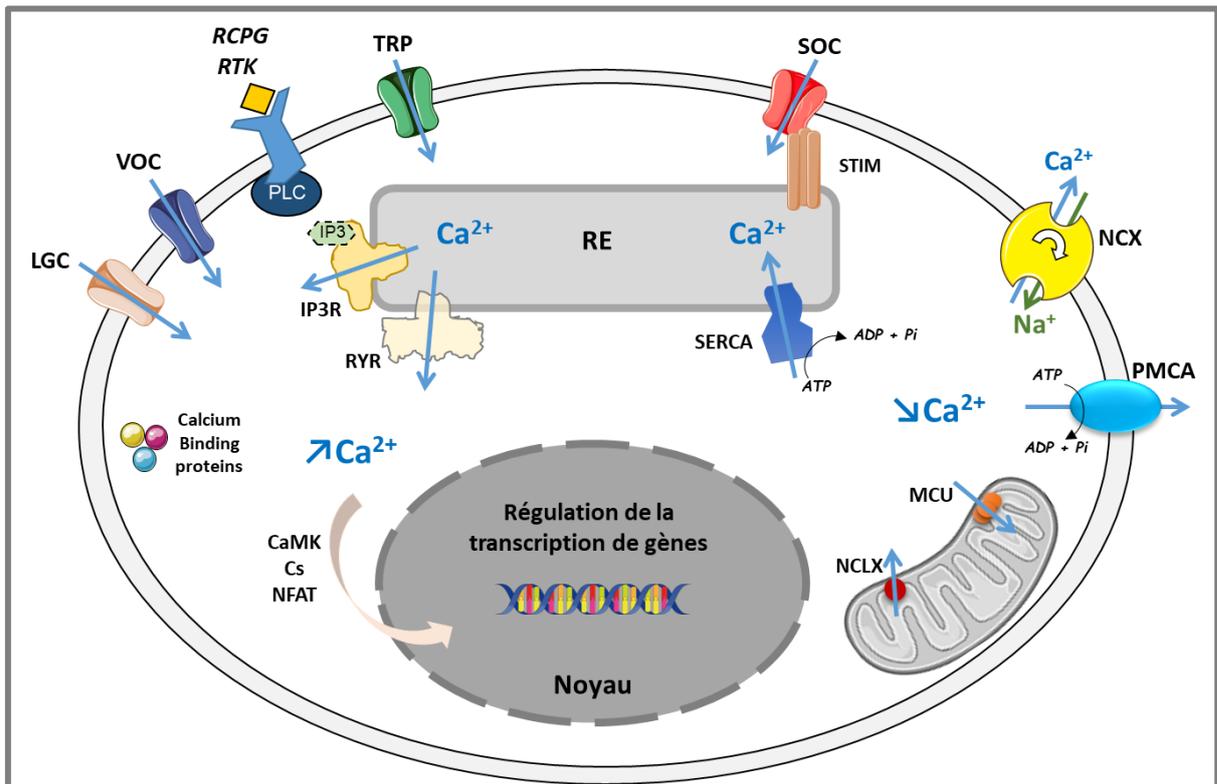


Figure 8 : Acteurs de la signalisation calcique. L'ion calcium est un second messager capable de réguler de nombreux processus physiologiques, par conséquent sa concentration cytosolique est finement contrôlée. Cette concentration peut augmenter suite à l'activation de canaux présents à la membrane plasmique : LGC (ligand gated channels), VOC (voltage operated channels), TRP (transient receptor potential), ou encore SOC (store-operated channels). La libération des réserves présentes dans des organites comme le réticulum endoplasmique (RE) peut aussi contribuer à cette augmentation, le RE libère ses réserves suite à l'activation des canaux RyR (ryanodine receptor) ou IP3R (inositol-trisphosphate receptor) présents au niveau de sa membrane. La libération des réserves mitochondriales, quant à elle, est dépendante de l'échangeur mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX). Des pompes et échangeurs sont chargés de garantir une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire transitoire en permettant au Ca^{2+} de sortir de la cellule via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) ou encore la pompe PMCA (plasma membrane Ca^{2+} ATPase) ou de gagner des compartiments de réserve intracellulaire comme le RE via les pompes SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase) ou la mitochondrie grâce à l'uniporteur de Ca^{2+} mitochondrial (MCU). Enfin les calcium binding proteins (CaBP), dont certaines ont un rôle tampon, font pour la majorité d'entre elles partie de cascades de signalisation et ont un rôle critique dans la transduction du signal.

1.1. Les acteurs réticulaires

Le réticulum endoplasmique est un organite cellulaire impliqué dans la synthèse protéique, lipidique, la maturation de protéines et le stockage du Ca^{2+} . Il s'agit du réservoir de Ca^{2+} le plus important de la cellule. La libération de ses réserves vers le cytoplasme se fait grâce aux récepteurs à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3R) et aux récepteurs à la ryanodine (RyR) tandis que les pompes ATP dépendantes SERCA (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase) sont chargées du réapprovisionnement des réserves calciques du RE.

1.1.1. Les récepteurs à l'inositol trisphosphate (IP3R)

Les IP3R sont responsables de la libération des réserves de calcium du RE, suite à la fixation du messenger secondaire IP3. Il existe 3 isoformes : IP3R1, IP3R2, IP3R3, codées par 3 gènes différents. L'IP3R1 est prédominant dans le système nerveux central.

Les IP3R sont constitués de 3 parties : la grande partie N-terminale située dans le cytosol et correspondant au site de liaison avec l'IP3 et à de nombreux sites de régulation, 6 domaines transmembranaires (TM5 et TM6 portent la fonction canal) et le domaine c-terminal cytosolique jouant un rôle dans la tétramérisation et l'activité du récepteur. L'IP3R peut être régulé par des protéines kinases, le pH, les ions divalents et la phosphorylation, ainsi que par le Ca^{2+} cytosolique permettant de générer un phénomène nommé calcium-induced calcium release (CICR) impliqué dans la propagation du signal calcique.

L'IP3, ligand activateur de l'IP3R, est généré à la suite de nombreux stimuli activant un récepteur couplé à une phospholipase C (PLC), qui produit de l'IP3 comme messenger secondaire. En effet la PLC, une fois activée, transforme le phosphatidyl-inositol bis phosphate (PIP2), un phospholipide membranaire, en diacylglycérol (DAG) d'une part et en inositol trisphosphate d'autre part. Cette voie de signalisation régule de nombreux processus cellulaires et est, par conséquent, liée à de nombreuses pathologies (pour revue (Berridge, 2016; Mikoshiba, 2015)).

1.1.2. Les récepteurs à la ryanodine RyR

La famille des récepteurs RyR présente de fortes homologies avec les récepteurs à l'IP3. Il existe 3 isoformes RyR1-3, codés par 3 gènes différents. Ces récepteurs s'organisent en tétramères. Ils ont tout d'abord été mis en évidence dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques où ils jouent un rôle dans le couplage excitation-contraction, avant d'être identifiés dans d'autres types cellulaires comme les neurones (notamment RyR3) (pour revue (Petrovic et al., 2008; Sorrentino, 2003)). Les RyR sont retrouvés dans les cellules dites excitables où ils sont activés par l'ATP ou lorsque la concentration en calcium du cytosol est vers $10^{-6}M$ pour RyR1 dans les cellules cardiaques et squelettiques (Lanner et al., 2010).

Structuralement, les RyR possèdent une extrémité N-terminale cytosolique très longue dont le rôle est la régulation du canal, et 6 domaines transmembranaires, les domaines 4 et 5 portant l'activité canal. Les canaux RyR peuvent être régulés par phosphorylation (par la PKA ou CaMKII) ou par liaison de molécules sur son extrémité N-terminale notamment la calmoduline et la calséquestrine (pour revue (Ozawa, 2010)). Les dysfonctionnements de ces récepteurs sont liés à diverses pathologies (pour revue (Santulli et al., 2018)).

1.1.3. Les SERCA

Les SERCA appartiennent à la famille des ATPases de type P (« P » pour phosphorylation). Leur rôle est de faire rentrer le calcium en provenance du cytosol dans la lumière du RE. Ce transport se faisant contre le gradient électrochimique du Ca^{2+} , l'hydrolyse d'ATP est nécessaire.

Les SERCA s'organisent en tétramères. Il existe 3 familles de SERCA (1 à 3) codées par 3 gènes différents. Chaque famille est composée de plusieurs isoformes : 2 isoformes pour SERCA1 (SERCA1a et 1b), 3 isoformes pour la SERCA2 (SERCA2a-c) et 6 isoformes pour la SERCA3 (SERCA3a-f). L'expression des différentes isoformes dépend de plusieurs facteurs : le tissu, le stade du développement ou le vieillissement ; cependant la SERCA2b

est ubiquitaire. Il est important de noter que chaque famille de SERCA possède une cinétique et une sensibilité au Ca^{2+} qui lui est propre (Brini and Carafoli, 2009).

Structuralement, l'hydrolyse de l'ATP entraîne l'ajout d'un phosphate sur le résidu N351 de la SERCA ce qui induit son changement de conformation permettant le passage de 2 ions Ca^{2+} dans le RE.

L'activité des SERCA est modulée par la fixation de protéines comme les phospholambanes et la sarcolipine qui diminuent l'affinité des SERCA au Ca^{2+} et donc leur activité. La phosphorylation de ces protéines inhibitrices par la PKA ou la CaMKII permet de lever cette inhibition (Vandecaetsbeek et al., 2011).

1.1.4. Les canaux de fuite

L'utilisation d'inhibiteurs des SERCA a permis de mettre en évidence une fuite continue de Ca^{2+} du RE. L'identité de ces « canaux de fuite » n'est pas encore élucidée. Plusieurs pistes sont évoquées, notamment l'implication du complexe ribosome translocon très perméable au Ca^{2+} et qui disparaît pendant la traduction (Flourakis et al., 2006; Van Coppenolle et al., 2004). L'IP3R1 est aussi un candidat car, après clivage par la caspase 3, un de ses fragments peut fonctionner en canal de fuite (Verbert et al., 2008). Enfin des protéines pouvant former des jonctions GAP (pannexine 1) sont aussi soupçonnées d'être responsable de cette fuite de Ca^{2+} du RE (Vanden Abeele et al., 2006).

1.2. Les acteurs mitochondriaux, golgiens et nucléaires

La mitochondrie est, elle aussi, un réservoir de calcium intracellulaire. La concentration en calcium qu'elle contient est comprise entre $2 \cdot 10^{-7}$ M (concentration faible) et 0,5 à $2 \cdot 10^{-6}$ M (concentration très élevée).

La membrane externe mitochondriale est perméable aux petits solutés dont le Ca^{2+} , mais celui-ci peut aussi passer par le canal VDAC (voltage-dépendant anion channel). Le transporteur MCU (mitochondrial Ca^{2+} uniporter) va permettre de faire rentrer le calcium

dans la lumière de la mitochondrie en suivant son gradient électrochimique. La libération du calcium contenu dans la mitochondrie se fait via les échangeurs $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+ / \text{Ca}^{2+}$ (mNCX et mHCX) (Rizzuto et al., 2012).

L'appareil de golgi dont le rôle principal est la maturation des protéines peut également servir de réservoir calcique. A sa surface les mêmes protéines que le RE y sont présentes : SERCA2, RyR et IP3R (Pizzo et al., 2011). Une autre calcium ATPase est exprimée la SPCA (secretory pathway Ca^{2+} ATPase) au niveau de cet organite. Ces protéines transportent le calcium mais aussi le manganèse avec une plus haute affinité (Vandecaetsbeek et al., 2011).

Enfin, le noyau possède au niveau de sa membrane les mêmes acteurs retrouvés à la membrane du RE ; rappelons que la membrane externe du noyau est en continu avec celle du RE. Sur la membrane externe du noyau, ont été retrouvé des SERCA (Gerasimenko et al., 1996; Humbert et al., 1996), IP3R (Echevarría et al., 2003; Leite et al., 2003) et RyR (Gerasimenko and Gerasimenko, 2004; Marius et al., 2006). Sur la membrane interne du noyau un variant de l'échangeur NCX (échangeur $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$) présent à la membrane plasmique a été retrouvé (épissage alternatif) (Ledeen and Wu, 2007).

1.3. Les acteurs cytoplasmiques

Les calcium binding protéines (CaBP), littéralement protéines liant le calcium, jouent un rôle de tampon en limitant le taux de Ca^{2+} libre présent dans le cytosol et ont également la charge de la transduction du signal. Il existe 2 types de CaBP, celles possédant un domaine EF-hand, capable de lier un ion Ca^{2+} , représentées par les protéines S100, la calmoduline (Ca^{2+} modulated protein) ou CaM, la calcineurine, et la calpaïne et celles dépourvues de domaine EF-hand notamment les annexines, la PKC, et la synaptotagmine (Yáñez et al., 2012).

Il existe des CaBP fixant le Ca^{2+} dans la lumière des organites notamment dans le RE : la calréticuline, la calséquestrine et la calnexine (Arnaudeau et al., 2002).

La plupart des CaBP font partie de cascades de signalisation intracellulaire et ont un rôle critique dans la transduction du signal et la régulation des transporteurs de Ca^{2+} (Schwaller, 2010). Par exemple la PKC peut réguler les SOCE (Harrisseh et al., 2013; Hoover and Lewis, 2011). La CaM régule des canaux calciques notamment IP3R et RyR du RE (Nadif et al., 2002; Rodney et al., 2005) et active la calcineurine qui à son tour recrute les voies de signalisation MEK / ERK, CaMK (Ca^{2+} modulated protein kinase) ou NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) (Hogan et al., 2003).

1.4. Les acteurs de la membrane plasmique

L'homéostasie calcique est régulée principalement par le réticulum endoplasmique mais des acteurs canaux et pompes présents à la membrane plasmique interviennent également.

Les pompes PMCA (plasma membrane ATPase) et NCX (échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) transportent le Ca^{2+} du cytosol vers le milieu extracellulaire contre son gradient de concentration. Par ailleurs, de nombreux canaux, plus ou moins sélectifs du Ca^{2+} , comme par exemple les protéines de la famille des TRP (transient receptor potential) ou de la famille Orai, font rentrer du Ca^{2+} dans le cytoplasme lors de leur activation (le détail sera décrit dans la partie suivante).

1.4.1. Les PMCA

Les PMCA sont des pompes calciques ATP-dépendantes de la même famille que les SERCA du RE. Elles sont chargées de l'extrusion du Ca^{2+} du cytosol vers le compartiment extracellulaire contre son gradient électrochimique. Les PMCA sont codées par 4 gènes, et divers épissages alternatifs des ARNm ont été décrits avec une expression tissulaire très variée (pour revue : (Di Leva et al., 2008)). PMCA1 et PMCA4 sont ubiquitaires tandis

que les 2 et 3 sont retrouvées dans les cellules dites excitables comme les neurones et les myocytes (Stauffer et al., 1995).

Les PMCA sont activées par phosphorylation par les PKA et les PKC et peuvent être inhibées par la CaM (Strehler et al., 2007).

1.4.2. Les échangeurs NCX

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est présent à la membrane plasmique et est chargé, avec les PMCA, du relargage du Ca^{2+} cytosolique dans le milieu externe. Cet échangeur utilise le gradient électrochimique du Na^+ pour extruder le Ca^{2+} . À la suite de son activation 4 Na^+ sont échangés contre 1 Ca^{2+} .

Les trois isoformes de NCX à la membrane plasmique sont codées par 3 gènes différents et il existe plusieurs variants d'épissage.

2. Les entrées calciques dans les cellules non excitables

Les influx calciques présents dans les cellules dites non excitables sont principalement des SOCE (store-operated calcium entry) et des ROCE (receptor-operated calcium entry).

Les influx VOC (voltage-operated channels), prépondérants dans les cellules dites excitables, sont aussi retrouvés dans les CSG mais dépendent de canaux à faible conductance comme Cav3.2. On notera aussi l'existence d'entrée constitutive de Ca²⁺ qui passerait par Orai1, de façon indépendante des réserves (voie non SOC) et des canaux de la famille TRP (transient receptor potential) dans certains types cellulaires notamment TRPV5, TRPV6 et TRPC3 (Zhang et al., 2011; Tano et al., 2012; Vachel et al., 2015).

2.1. Les influx ROC et SOC

Les influx ROC et SOC sont intimement liés. Une large variété de signaux du microenvironnement entraîne l'activation de récepteurs couplés à des protéines G (RCPG) ou des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). Les protéines G hétérotrimérique de type α , β , γ vont activer la PLC β tandis que les RTK vont activer la PLC γ . Les PLC hydrolysent un phospholipide membranaire, le PIP₂, en DAG et IP₃. Le DAG va être à l'origine de l'activation des ROC tandis que l'IP₃, en se fixant à son récepteur au niveau de la membrane du RE, va entraîner la libération des réserves calciques du RE et donc l'activation des SOC. La libération des réserves du RE peut aussi être induite après activation des récepteurs à la ryanodine. Dans les cellules dites non excitables, les RyR peuvent être activés par des messagers secondaires tels que l'ADPRc (adénosine diphosphate ribose cyclique) et le Ca²⁺ lors du phénomène de CICR (Calcium induced calcium release).

Par ailleurs, un autre second messenger, l'acide arachidonique, peut-être à l'origine de l'activation des ROC (voir partie 2.1.1), que l'on peut trouver également sous la dénomination SMOC (secondary messenger operated channel).

Ces 2 types d'influx, ROC et SOC, sont activés par l'un ou l'autre de ces seconds messagers mais impliquent les familles de canaux : les TRPC et les Orai.

2.1.1. Les influx ROC

Les influx ROC, appelés entrées non capacitives, sont des influx calciques induits par l'activation de récepteurs à la membrane et ce, indépendamment des réserves calciques intracellulaires. Le DAG peut activer directement certains canaux TRPC3 et TRPC6 ainsi qu'indirectement *via* la PKC, les TRPC1,4,5 et 6 qui vont ainsi produire un influx ROC.

L'activation de RCPG peut aussi induire l'activation des phospholipases A2 (PLA2) et C δ (PLC δ) qui vont être à l'origine de la production d'acide arachidonique (AA). L'AA active les canaux nommés ARC pour arachidonate-regulated Ca²⁺ channels composés de 3 Orai1 et 2 Orai3 (Mignen et al., 2009) et permettent ainsi un influx calcique indépendant des réserves (Mignen and Shuttleworth, 2000).

2.1.2. Les influx SOC

Les influx SOC ou entrées capacitives, constituent l'influx calcique principal observé dans quasiment toutes les cellules non excitables.

L'influx SOC est l'entrée de calcium dépendante des réserves. En effet, l'IP3 en se liant à son récepteur présent à la membrane du RE, entraîne la libération des réserves de calcium contenu dans cet organite. STIM1 (stromal interaction molecule 1) présent à la membrane du RE est un senseur du taux de Ca²⁺ intraréticulaire. La baisse transitoire des réserves de Ca²⁺ active la protéine STIM1 qui s'oligomérisse et va à son tour activer les canaux SOC à la membrane plasmique (figure 9).

L'existence de cette entrée a été proposée par l'équipe de Putney en 1986 (Putney, 1986). Il fallut attendre quelques années pour mettre en évidence la participation du canal Orai1 à ce courant, mais la mise en évidence de profils de courant différents en fonction du type cellulaire laissait suggérer la participation d'autres canaux. La famille des canaux TRP a été la première mise en avant comme possible candidate à l'influx SOC. TRPC1 se révéla

être un bon candidat avec la médiation d'un courant relativement sélectif au calcium (pour revue (Ong et al., 2016; Prakriya and Lewis, 2015)).

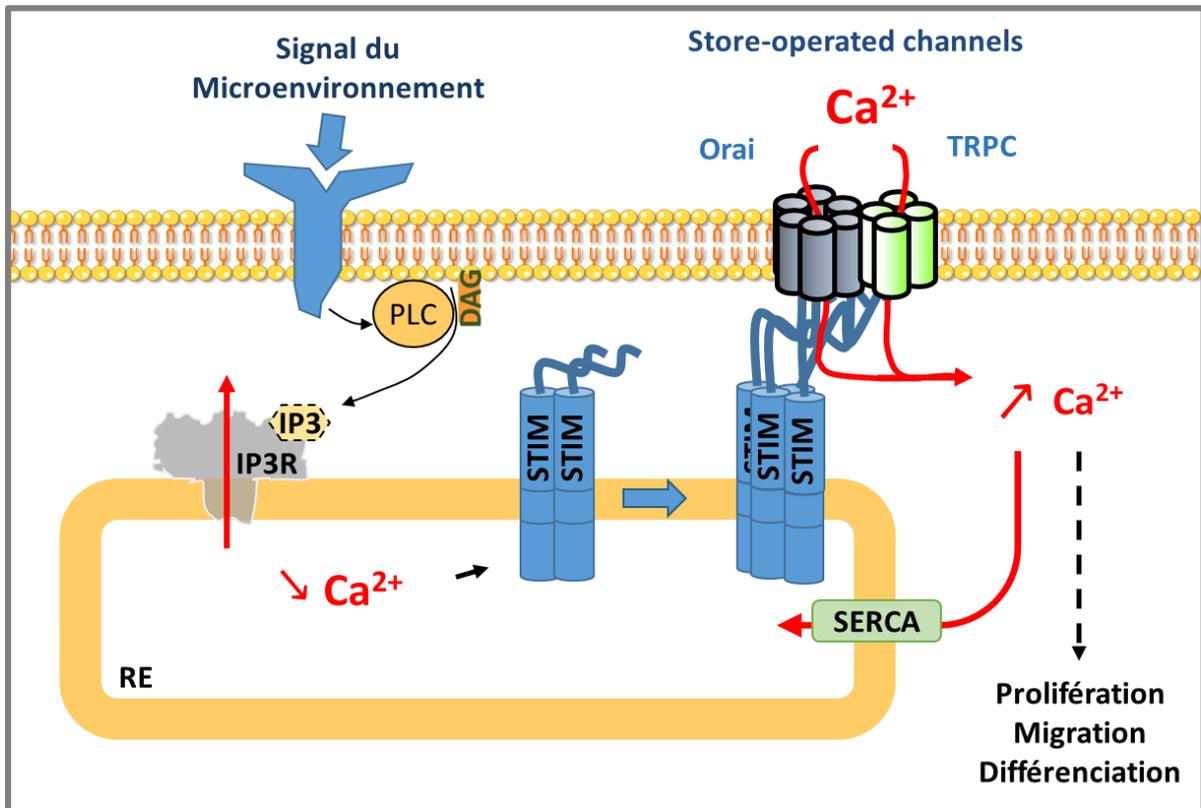


Figure 9 : Influx calcique SOC. Les signaux du microenvironnement activant des RCPG ou des RTK vont permettre l'activation de la PLC qui va hydrolyser le PIP2, un phospholipide membranaire, en IP3 et DAG. La liaison de l'IP3 à son récepteur permet la libération des réserves de Ca²⁺ du RE, permettant l'activation des protéines STIM qui vont s'oligomériser et activer les canaux Orai et TRPC et ainsi permettre le SOCE. Le Ca²⁺ va alors pouvoir intégrer le RE grâce aux pompes SERCA et activer des voies de signalisation menant à la régulation de nombreux processus cellulaires.

Cette augmentation de calcium va activer des « calcium binding proteins » qui, pour la majorité d'entre elles, appartiennent à des voies de signalisation. Ainsi, on peut citer l'activation calcium-dépendante des protéines CaM/calcineurine qui stimulent la translocation de NFAT, un facteur de transcription, dans le noyau ou encore l'activation de la voie NFκB. Ces voies mènent à la transcription de gènes impliqués dans une grande variété de processus cellulaires comme la prolifération, la migration, ou encore la différenciation.

2.2. Les acteurs du SOC

2.2.1. Les protéines STIM

La famille des protéines STIM comprend 2 isoformes STIM1 aussi appelés GOK (gene overexpressed in cancer), et STIM2, ce sont des protéines à un domaine transmembranaire. STIM1 est une protéine de 685 acides aminés (aas) (77 kilodaltons (kDa)) codée par un gène présent sur le chromosome 1 tandis que STIM2 est composée de 833 aas (105 kDa) et est codée par le chromosome 4. STIM1 et STIM2 ont chez l'Homme 74% d'homologie. La protéine STIM1 est majoritairement retrouvée au niveau de la membrane du RE (75 à 85%) mais une petite fraction est aussi présente à la membrane plasmique et au niveau de certains organites dits « acides » comme les lysosomes alors que STIM2 est exclusivement présent à la membrane du RE (Manji et al., 2000; Mignen et al., 2007).

La protéine STIM1 réticulaire possède en N-terminal, sa partie intraluminaire, un domaine EF-hand permettant la liaison au Ca^{2+} . Lors de la déplétion des stocks réticulaires, le Ca^{2+} va se dissocier de ce domaine, les dimères de STIM1 ainsi activés vont s'oligomériser et déployer leur domaine cytoplasmique d'activation des SOC (figure 10).

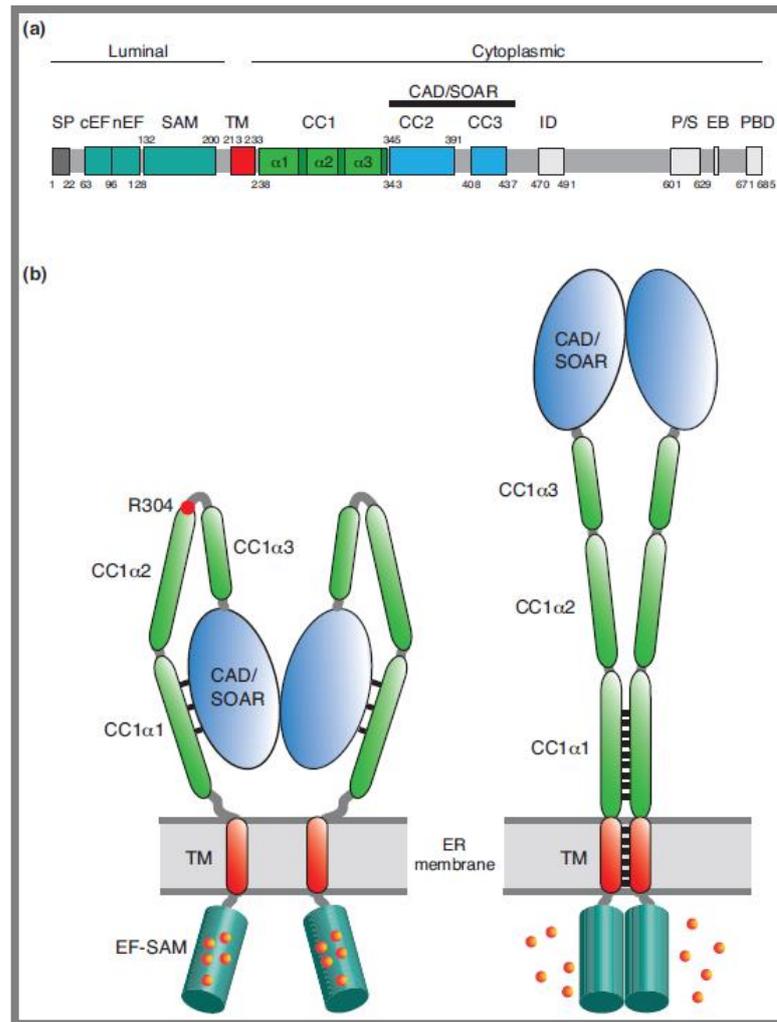


Figure 10 : Structure de la protéine STIM1.

(a) La protéine STIM1 réticulaire possède en N-terminal, sa partie intraluminaire, un domaine EF-hand permettant la liaison au Ca^{2+} , un domaine SAM (sterile alpha motif) suivi d'un domaine transmembranaire. En C-terminal, on retrouve tout d'abord 3 motifs coiled-coil (CC) dont le premier est subdivisible en 3 parties alpha 1, 2 et 3, un domaine d'inactivation et enfin des régions riches en proline/sérine, un domaine de liaison à EB1, et une région polybasique (riche en lysine). Le domaine CAD/SOAR (CRAC activation domain/STIM-Orai activation region) responsable de la liaison avec les Orai1 se situe au niveau des domaines CC2 et CC3.

(b) Activation de STIM1 (la partie C-terminale faisant suite au domaine CAD/SOAR a été omise pour plus de clarté) Au repos, les domaines EF-SAM sont liés au calcium et séparés. La partie cytosolique de STIM1 est repliée et le domaine CAD/SOAR est lié au domaine CC1 le gardant proche de la membrane du RE. La diminution du taux de calcium dans la lumière du réticulum entraîne une libération des domaines EF-hand permettant l'oligomérisation de STIM1, un changement de conformation permettant la libération des domaines CAD/SOAR et ainsi la liaison avec Orai1 (Qiu and Lewis, 2019).

STIM1 et STIM2 sont tous deux des senseurs du taux de calcium dans le réticulum mais ils ont des constantes de dissociation du calcium différentes : STIM1 a une constante de dissociation de 500 μM et STIM2 de 250 μM . Au repos (état « plein »), le RE a une concentration en calcium de 250 à 600 μM , par conséquent STIM2 est plus sensible à de petites variations de Ca^{2+} et est partiellement activé quand la réserve du RE est pleine (Zheng et al., 2008). Par contre STIM2 a une cinétique d'oligomérisation moindre comparé à STIM1 et est moins efficace pour se lier et activer Orai1 (Stathopoulos et al., 2009). Par conséquent, STIM2 semble plutôt impliqué dans la régulation fine du stock de Ca^{2+} intraréticulaire et STIM1 dans la réponse après une libération massive.

Un variant d'épissage alternatif de STIM1, nommé STIM1L (long) a été identifié et serait responsable d'une réactivation plus rapide et maximale des SOCE. Contrairement à STIM1 dont l'expression est ubiquitaire, l'expression de STIM1L a été observé dans le muscle squelettique chez l'Homme, et chez la souris dans le muscle squelettique, le cœur et le cerveau (Darbellay et al., 2011). Inversement un variant de STIM2, STIM2 β ne peut pas se lier seul à Orai1 ; il nécessite la présence de STIM1 ou STIM2 pour former des hétérodimères, être recruté auprès de Orai1 et inhiber sa fonction canal (Rana et al., 2015).

2.2.2. Les canaux Orai

La famille des canaux Orai, nommé ainsi en hommage au gardien des portes du paradis, est composée de 3 membres Orai 1 à 3. Ces protéines possèdent 4 domaines transmembranaires.

Orai1 aussi nommé CRACM1 est composé de 301 aas pour un poids moléculaire en absence de glycosylation de 33 kDa, la seule glycosylation de l'aa N223 aboutit à un poids moléculaire de 55 kDa. Le gène codant pour Orai1 se trouve sur le chromosome 12.

Orai1 est une protéine à 4 domaines transmembranaires. Ces extrémités N et C terminales ainsi que sa deuxième boucle sont dans le cytoplasme. Dans sa partie N-terminale, Orai1 dispose d'un domaine riche en arginine et un autre riche en proline, ce qui le distingue

des autres isoformes Orai2 et Orai3 (Takahashi et al., 2007). En C-terminal, faisant suite aux 4 domaines transmembranaires, se trouve un domaine coiled-coil (CC), domaine commun aux trois isoformes dont le rôle est l'interaction avec d'autres protéines notamment STIM1 (figure 11).

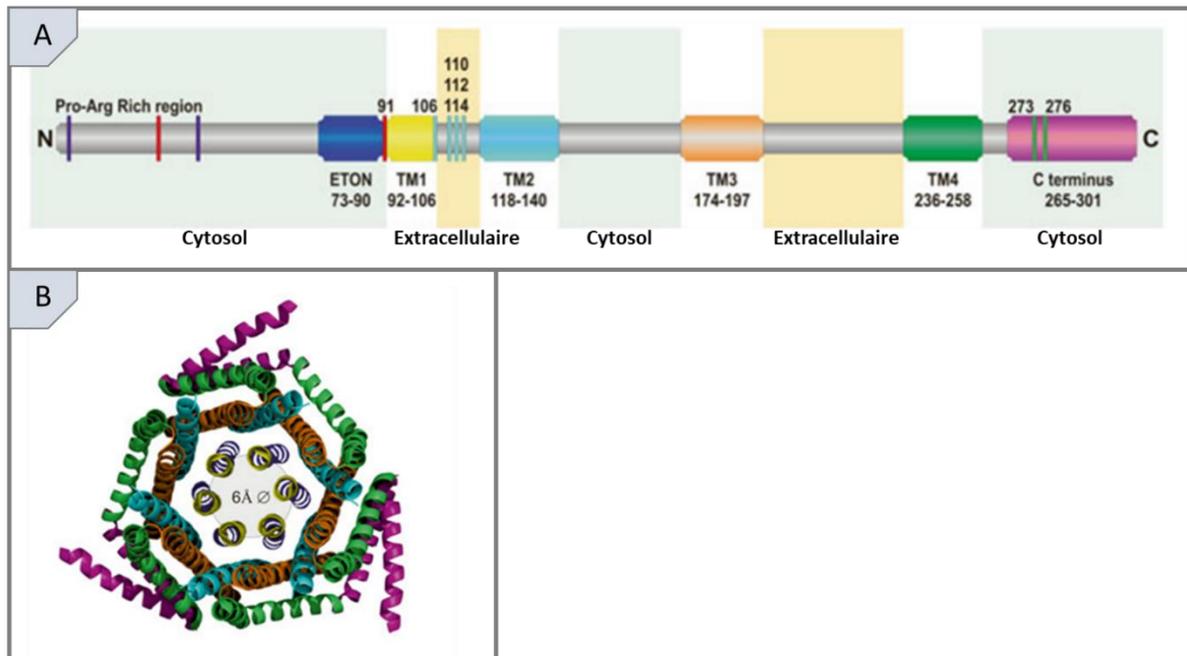


Figure 11 : Structure de la protéine Orai1. A : principales régions de Orai1. B : dessin représentant l'organisation en hexamères de Orai1 (TM : régions transmembranaires ; ETON : extended transmembrane Orai1 N-terminal region) (Frischauf et al., 2016).

Afin de former le canal « CRAC » les Orai s'organisent en hexamères (Hou et al., 2012) (figure 11B). L'inactivation du canal Orai, se fait rapidement est de façon dépendante du Ca^{2+} .

2.2.3. TRPC

La famille des TRP

La famille des TRP est une large famille de canaux perméables aux cations. C'est en 1969 que Cosens et Manning ont découvert une souche mutante spontanée de drosophile présentant une déficience visuelle et caractérisée par l'absence fonctionnelle d'un gène (Cosens and Manning, 1969). Ce n'est qu'en 1975 que Minke décrit et nomme ce gène TRP transient receptor potential car cette mutation provoque une dépolarisation transitoire des photorécepteurs après l'entrée de Ca^{2+} ou de Na^+ (Minke et al., 1975). La recherche d'homologue de TRP chez les mammifères a conduit à la découverte de 28 homologues (contre 13 chez la drosophile) classés en 6 familles : TRPC pour canonical comportant 7 membres, TRPV pour vanilloïdes comprenant 6 membres, TRPA pour ankyrine comprenant 1 membre, TRPM pour mélastastine composée de 8 membres, TRPML pour mucopolipine comprenant 3 membres et les TRPP pour polycistine comprenant 3 membres. A noter que chez les invertébrés et vertébrés inférieurs, la famille des TRPN (NO mechanotransducer potential C) est présente et chez les mycètes, la famille des TRPY (TRP Yeast) pour revue : (Nilius and Owsianik, 2011)).

TRPC

Les TRPC, tout comme les TRP, sont des protéines à 6 domaines transmembranaires (DTM) dont les parties N et C terminales sont cytoplasmiques. La boucle hydrophile située entre les DTM 5 et 6 est impliquée dans la sélectivité cationique du canal. Les TRPC possède en N-terminal des domaines Ankyrines (AnkR) et un domaine coiled-coil permettant ancrages et interactions protéiques. En C-terminal, est retrouvé après les domaines transmembranaires, un domaine TRP (TRP box) impliqué dans l'activation du canal, un domaine d'interaction avec la calmoduline (CIRB) et un domaine d'interaction protéique (PDZ) pour TRPC4 et TRPC5 (figure 12).

La famille TRPC est composée de 7 membres TRPC1 à 7, *trpc2* est un pseudogène chez l'Homme mais ce n'est pas le cas chez la souris par exemple.

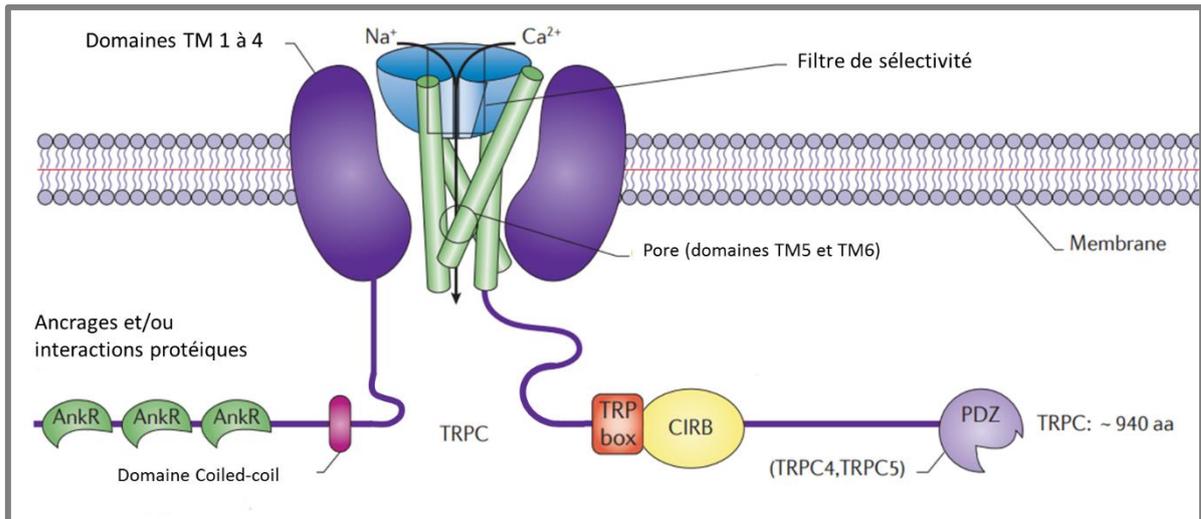


Figure 12 : Structure des protéines TRPC. TM : transmembranaire, Ankr : Ankyrine, CIRB : calmodulin/IP3R binding, PDZ : domaine de liaison protéique, aa : acides aminés. Adapté de (Moran et al., 2011)

Contrairement au couple Orai1-STIM1, les canaux TRPC ne sont pas impliqués dans l'influx SOC de tous les types cellulaires. TRPC1, TRPC2, TRPC4 et TRPC5 peuvent interagir directement avec STIM1 et ainsi participer à l'influx calcique SOC. D'autres TRPC, notamment TRPC3 et TRPC6 peuvent aussi participer au SOC mais seulement lorsqu'ils sont associés avec TRPC1 et TRPC4 respectivement (Huang et al., 2006; Shin et al., 2016).

A l'heure actuelle, la contribution de TRPC1 est celle qui regroupe le plus de preuves montrant son implication dans la formation de SOC, suivie par celle de TRPC4 ; les contributions des autres TRPC sont moins étudiées et sont très dépendantes de la stœchiométrie des TRPC ainsi que du type cellulaire (Bomben et al., 2011; Sabourin et al., 2009; Tajeddine and Gailly, 2012; Zanou et al., 2012)(pour revue : (Ong et al., 2016)).

TRPC1 est le premier TRPC à avoir été rapporté comme impliqué dans les influx SOC. Il s'agit d'un canal cationique perméable aux Ca^{2+} et au Na^{+} .

Même si TRPC1 peut interagir directement avec STIM1, la participation d'Orai1 au complexe semble indispensable à sa participation au SOCE. En effet, des mutants non fonctionnels de Orai1 abrogent l'activation de TRPC1 dépendante des réserves (Cheng et al., 2008). De plus, une étude de 2011 a montré que l'entrée de calcium dépendant de

Orai1-STIM1 engendre l'insertion de TRPC1 à la membrane plasmique qui va alors s'associer au complexe pour participer au SOCE (Cheng et al., 2011).

2.3. Pharmacologie des SOC

Expérimentalement, les SOCE peuvent être induits par l'utilisation d'inhibiteurs des SERCA, comme la thapsigargine (TG) ou l'acide cyclopiazonique. L'inhibition des SERCA empêche la recapture de Ca^{2+} par le RE et permet de mettre en évidence une fuite constante du calcium contenu dans le RE. Cette fuite va permettre la vidange des réserves, l'activation des protéines STIM qui vont entraîner l'ouverture des canaux SOC à la membrane plasmique. Différentes molécules sont utilisées pour bloquer les SOC comme le Gd^{3+} (gadolinium), le SKF-96365, le YM-58483 (ou BTP2), la GSK-7975A ou la syntha66. Ces molécules ont été testées en patch-clamp pour évaluer leur capacité à inhiber I_{CRAC} (le courant dépendant de l'entrée calcique par Orai1) ou le I_{SOCE} (le courant dépendant de l'entrée calcique passant par Orai1 et TRPC1).

Les lanthanides dont font partie La^{3+} et Gd^{3+} sont considérés comme des bloqueurs du pore de Orai1 avec une grande affinité. Cependant ces molécules bloquent aussi des canaux voltages dépendants, des canaux TRP et les pompes PMCA mais avec une plus faible affinité (Prakriya and Lewis, 2015).

2-APB est un antagoniste non compétitif du récepteur à l'IP3 (IP3R). A faible dose, ce composé stimule le SOCE (<5 μM) et à dose élevée (<20 μM), le 2-APB inhibe le SOCE. Cette molécule est peu sélective mais sa capacité bimodale à potentialiser ou inhiber le SOCE fait qu'elle a beaucoup été utilisée dans l'étude de ce courant (Parekh and Putney, 2005).

Le SKF-96365 est un inhibiteur des SOC (Orai et TRPC) dont la cible est à ce jour encore inconnue. La concentration pour bloquer I_{CRAC} est de l'ordre de 4 μM . Ce composé est aussi connu pour bloquer à hautes doses d'autres canaux TRP (TRPV par exemple), les canaux voltages dépendants, des canaux potassiques ainsi que la protéine cytochrome P450 (Prakriya and Lewis, 2015).

YM-58483 aussi appelé BTP2 est un inhibiteur des SOC (Orai et TRPC) mis en évidence grâce à sa capacité à inhiber l'entrée calcique induite par la TG dans des cellules T Jurkat. Son mode d'action est aussi non élucidé. Des concentrations de l'ordre du μM inhibent I_{CRAC} , et des concentrations de 100 à 150 nM sont capables d'inhiber le SOCE. De faibles concentrations d'YM-58483 (10 fois inférieures à celles utilisées pour bloquer le SOC) sont capables d'activer TRPM4, un canal perméable au Na^+ . YM-58486 peut aussi bloquer, mais de façon moins spécifique, des canaux potassiques, des canaux voltages-dépendants et d'autres canaux TRP (Prakriya and Lewis, 2015).

La GSK-7975A est un dérivé du pyrazole. Il a été montré que la modification de la géométrie du pore de Orai1 entraînait une diminution de l'affinité de la GSK-7975A suggérant que ce composé inhibe les SOC en bloquant le pore de Orai1. La GSK-7975A est aussi décrite comme inhibiteur de Orai3, ce qui reste en adéquation avec l'hypothèse de son mode d'inhibition car la géométrie du pore est conservée entre les isoformes de Orai (Derler et al., 2013).

La syntha66 a une structure similaire au YM-58483 mais possède un groupe biphényle à la place de l'anneau pyrazole. Ce composé inhibe I_{CRAC} à une concentration de 3 μM et est sélectif, car il ne bloque pas les canaux potassiques ou les pompes calciques (Prakriya and Lewis, 2015).

3. Rôle des SOC dans les CSN et les CSG

La signalisation calcique régule de très nombreux processus cellulaires. Le Ca^{2+} est un second messenger ubiquitaire important pendant la fécondation, le développement embryonnaire, pour la prolifération, la différenciation, la mort des cellules et l'activation de facteurs de transcription NFAT, NF κ B ou CREB. Ce signal universel est modulé par chaque cellule en fonction de la composition du répertoire d'acteurs calciques qu'elle exprime, mais aussi de la localisation et de la durée du signal. La variation de ces paramètres permet d'activer une voie de signalisation précise (Berridge et al., 2000, 2003). Une des fonctions critiques du SOCE est le contrôle de la transcription de gènes grâce à des facteurs de transcription sensibles à cet ion comme NFAT. Le calcium active la calcineurine qui va déphosphoryler NFAT, exposant alors son domaine de localisation nucléaire permettant sa translocation dans le noyau et la transcription de gènes impliqués dans des processus cellulaires très variés (Hogan et al., 2003).

Historiquement, c'est l'équipe de Putney qui met en évidence l'existence d'une entrée de Ca^{2+} provenant du milieu extracellulaire faisant suite à la libération des réserves contenues dans le RE. Il nomme cette entrée, entrée capacitive, par analogie avec les condensateurs (capacitor en anglais) des circuits électriques (Putney, 1986). Ce n'est que plus tard que cet influx sera renommé SOCE afin de refléter plus explicitement son mode d'activation. La première mise en évidence du SOCE a été faite par patch clamp et imagerie calcique dans des mastocytes (Matthews et al., 1989).

L'étude du SOCE devient plus facile avec l'arrivée de nouveaux outils expérimentaux, les inhibiteurs des SERCA, capable d'induire une libération des réserves du RE sans IP₃, et la sonde Fura 2. S'en suit la mise en évidence d'un influx SOCE dans de nombreuses cellules non excitables comme les hépatocytes ou les lymphocytes puis dans des cellules excitables (Prakriya and Lewis, 2015). Le SOCE est décrit comme étant impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques comme la perméabilité des cellules endothéliales (Wu et al., 2005), la prolifération et la contractilité des cellules musculaires lisses vasculaires (Domínguez-Rodríguez et al., 2012; Rodríguez-Moyano et al., 2013) ou

encore l'exocytose (Fomina and Nowycky, 1999). De nombreuses études invalidant l'expression de certaines isoformes de la famille TRPC, notamment le couple TRPC1 et TRPC4, montraient l'implication de ces canaux cationiques de la membrane plasmique dans les SOCE de certains types cellulaires de tissus non excitables (Zhu et al., 1996; Zitt et al., 1996), ou plus tardivement de tissus excitables comme le muscle squelettique (Antigny et al., 2017; Sabourin et al., 2009; Vandebrouck et al., 2002).

C'est seulement en 2005, avec la mise en évidence de la protéine STIM1 comme acteur des SOCE (Roos et al., 2005), que l'on commence à comprendre leurs mécanismes d'activation et qu'on découvre enfin le mystérieux senseur du niveau de calcium dans la lumière du RE. La protéine STIM1, appelée aussi GOK pour *gene overexpressed in cancer*, était déjà connue comme jouant un rôle central dans l'établissement et la progression des rhabdomyosarcomes (Sabbioni et al., 1997), et depuis, son implication a été mise en évidence dans de nombreux autres cancers (Xie et al., 2016). La découverte de la protéine Orai1 suit très rapidement en 2006, elle est alors mise en évidence comme formant un canal responsable du courant calcique I_{CRAC} (Feske et al., 2006; Vig et al., 2006). De plus, ces études montrent pour la première fois, qu'une mutation du gène codant pour Orai1 est à l'origine d'une maladie héréditaire appelé le syndrome d'immunodéficience grave : les cellules T des patients souffrant de cette maladie ont des SOCE altérés (Feske et al., 2006). Orai1 et sa fonction canal ont depuis également été impliqués dans de nombreuses fonctions ainsi que dans divers processus impliqués dans le développement tumoral. Enfin, l'implication des canaux de la famille TRPC, notamment TRPC1, dans les SOCE et les courants I_{SOC} , longtemps débattue, a été confirmée dans certains types cellulaires et dans de nombreux phénomènes pathologiques tels que les cancers (Déliot and Constantin, 2015; Stewart et al., 2015; Xie et al., 2016).

3.1. SOC dans le cerveau et les CSN

3.1.1. Expression des SOC dans le cerveau

Chez l'Homme et la souris, les transcrits de STIM1 et STIM2 sont systématiquement retrouvés dans le cerveau au niveau du cortex, du cervelet et de l'hippocampe. STIM1 est fortement exprimé dans le cervelet, moyennement dans le cortex et faiblement dans

l'hippocampe, tandis que STIM2 est fortement exprimé dans l'hippocampe et le cortex et moyennement dans le cervelet. A noter que pendant la neurogenèse hippocampique observée *in vitro*, les transcrits de STIM1 et STIM2 augmentent (Kraft, 2015).

Les trois isoformes de Orai sont retrouvées dans le cerveau humain et celui de souris. Pour les deux espèces, les transcrits de ORAI3 sont nettement supérieurs à ceux de ORAI1. ORAI2 est fortement exprimé chez la souris mais pas chez l'Homme (Kraft, 2015).

Concernant les TRPC, toutes les isoformes sont retrouvées dans le cerveau. TRPC1 est retrouvé dans l'hippocampe, le cortex, le cervelet, le tronc cérébral, et les ganglions de la base (pour revue : (Vennekens et al., 2012)).

Dans le cerveau, la signalisation calcique régule des processus clés comme l'excitabilité neuronale, la transmission synaptique, le développement neuronale ou tout simplement la prolifération (Rosenberg and Spitzer, 2011). Le rôle des canaux VOC et LGC dans la régulation de ces mécanismes a été très étudié mais peu d'études s'intéressent aux rôles des SOC dans ces processus. Contrairement aux neurones, les CSN sont des cellules non excitables, ainsi, les SOC pourraient être des acteurs clés de leur signalisation calcique.

Physiologiquement, de nombreux signaux du microenvironnement, *via* la stimulation de leurs récepteurs membranaires, provoquent une déplétion des réserves de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique. Ceci va activer les SOC qui doivent, par conséquent, jouer un rôle clé dans la transduction des signaux extracellulaires reçus par de nombreuses cellules comme par exemple les CSN.

3.1.2. Rôle des SOC dans les CSN

Des analyses transcriptomiques ont montré un enrichissement en transcrits de la signalisation calcique dans les CSN adultes de SVZ de souris (Beckervordersandforth et al., 2010) ainsi que dans les CSN adultes humaines (Sandberg et al., 2014).

Des travaux menés sur des CSN embryonnaires de rat ont montré que TRPC1 est exprimé par ces cellules et que la réduction de l'expression de TRPC1, par l'utilisation d'un oligonucléotide anti-sens, diminue la prolifération des CSN induite par le FGF. De plus,

l'augmentation du taux de Ca^{2+} cytosolique induite par le FGF est fortement diminuée par des inhibiteurs du SOCE (SKF-96365 et Gd^{3+}). Ces résultats montrent, dans les CSN embryonnaires de rat, que TRPC1 contribue au SOCE engendré par la liaison du FGF à son récepteur, une voie de signalisation impliquée dans la prolifération des CSN (Pla et al., 2005).

Par ailleurs, des travaux sur des progéniteurs de l'hippocampe de souris adultes, ont montré que l'inhibition du SOCE par des inhibiteurs pharmacologiques (2-APB, Gd^{3+} et SKF-96365) réduisait la prolifération des cellules. L'analyse des progéniteurs en prolifération, *in vitro* et *in vivo*, a montré qu'ils exprimaient davantage de transcrits de TRPC1 comparé à leurs homologues quiescents. L'utilisation d'un anticorps anti-TRPC1 ou d'un siRNA ciblant l'ARNm de TRPC1, induit une diminution du SOCE et de la prolifération des progéniteurs neuronaux. Des résultats similaires ont été obtenus avec une diminution de l'expression (siRNA) d'Orai1 ou de STIM1. Ainsi, ce travail a permis de montrer que le SOCE régule la prolifération des progéniteurs neuronaux de l'hippocampe de souris (Li et al., 2012).

Concernant les CSN de la SVZ, une étude de 2014 a montré que ces cellules avaient un courant SOC dépendant de Orai1 et STIM1. Les auteurs de cette étude ont montré que dans ces cellules, le SOCE contrôle la prolifération des CSN *in vitro* et *in vivo* et qu'il régule l'expression de gènes par la voie calcineurine/NFAT (Somasundaram et al., 2014). Toutefois, cette étude ne comportait pas de données concernant une éventuelle implication des SOC dans l'autorenouvellement ou la différenciation des CSN.

3.2. SOC dans les GBM et les CSG

3.2.1. SOC et GBM

La signalisation calcique est très importante pour réguler de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, ou encore la migration. Ainsi, elle est souvent piratée dans les cellules cancéreuses pour favoriser notamment une prolifération et une migration accrue (pour revue : (Déliot and Constantin, 2015; Stewart et al., 2015)).

Des analyses transcriptomiques de tumeurs de patients souffrant de glioblastome ont montré une surreprésentation des transcrits de TRPC1 (Alptekin et al., 2015) et STIM1 (Scrideli et al., 2008), suggérant un rôle du SOCE dans cette pathologie.

Plusieurs études menées sur des lignées de GBM ont montré un impact de l'inhibition des SOC par des agents pharmacologiques et des siRNA ou shRNA, sur des paramètres d'agressivité comme la prolifération, la migration, ou l'invasion (tableau 2). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des SOC diminue la prolifération cellulaire de différentes lignées de GBM humains, réduit leur capacité d'invasion ainsi que leur chimiotactisme vers l'EGF (Li et al., 2013; Liu et al., 2011; Motiani et al., 2013).

La réduction de l'expression de STIM1 par shRNA diminue la prolifération de cellules de GBM avec un arrêt en phase G0/G1 des cellules de la lignée U251 (Li et al., 2013). Cependant, ce même traitement dans des cellules tumorales dérivées de patients n'a qu'un effet marginal sur ces cellules alors qu'il inhibe leur capacité d'invasion (Motiani et al., 2013). La diminution de l'expression d'Orai1 diminue aussi les capacités d'invasion des cellules tumorales dérivées de patients (Motiani et al., 2013). Enfin, la diminution de l'expression de TRPC1 diminue la croissance tumorale des cellules humaines D54MG de GBM et altère leur capacité de migration vers un milieu contenant de l'EGF (Bomben and Sontheimer, 2010; Bomben et al., 2011).

Lignées cellulaires	Méthodes d'inhibition des SOC	Effets	Références
C6 (rat)	inhibiteurs SKF-96365, 2-APB / shRNA STIM-1	↘ prolifération	(Liu et al., 2011)
D54MG (humain)	shRNA TRPC-1	↘ croissance	(Bomben and Sontheimer, 2010)
		↘ migration chimiotactique vers EGF	(Bomben et al., 2011)
U87 / U373 (humain)	shRNA STIM-1	↘ prolifération	(Li et al., 2013)
U251 (humain)	inhibiteurs SKF-96365, 2-APB / shRNA STIM-1	↘ prolifération	(Li et al., 2013) (Liu et al., 2011) (Motiani et al., 2013)
		↗ apoptose	(Liu et al., 2011)
	siRNA STIM1 / siRNA ORAI-1	↘ prolifération ↘ invasion	(Motiani et al., 2013)
lignées dérivées de patients	siRNA STIM1 / siRNA ORAI-1	↘ invasion	(Motiani et al., 2013)
		= prolifération	

Tableau 2 : Etat de l'art des travaux sur le rôle du SOCE dans les cellules de glioblastomes.

3.2.2. SOC et CSG

Dans les CSC des acteurs de la signalisation calcique sont piratés afin de favoriser le caractère souche de ces cellules ainsi que leur résistance aux traitements (pour revue : (Terrié et al., 2019) présente en Annexe 1).

Des analyses transcriptomiques de CSG de patients ont montré une augmentation des transcrits liés à la signalisation calcique dans ces cellules (Wee et al., 2014). Spécifiquement, plusieurs acteurs calciques ont été identifiés comme affectés dans cette pathologie (figure 13) : la CaBP S100A4 (Chow et al., 2017), l'IP3R (Dong et al., 2017) ainsi que des canaux présents à la membrane plasmique de la famille des TRP (TRPM7, TRPV2) (Liu et al., 2014; Morelli et al., 2012), le VOC Cav3.2 (Zhang et al., 2017), ainsi que des LGC (Oh et al., 2012). La majorité de ces acteurs sont plus exprimés dans les CSG comparés au reste de la tumeur et leur inhibition ou réduction d'expression affecte des caractéristiques clés des CSG comme leur prolifération ou leur différenciation (cf revue en annexe). A l'inverse, la surexpression de TRPV2 induit une diminution de la prolifération des CSG et une différenciation des cellules (Morelli et al., 2012).

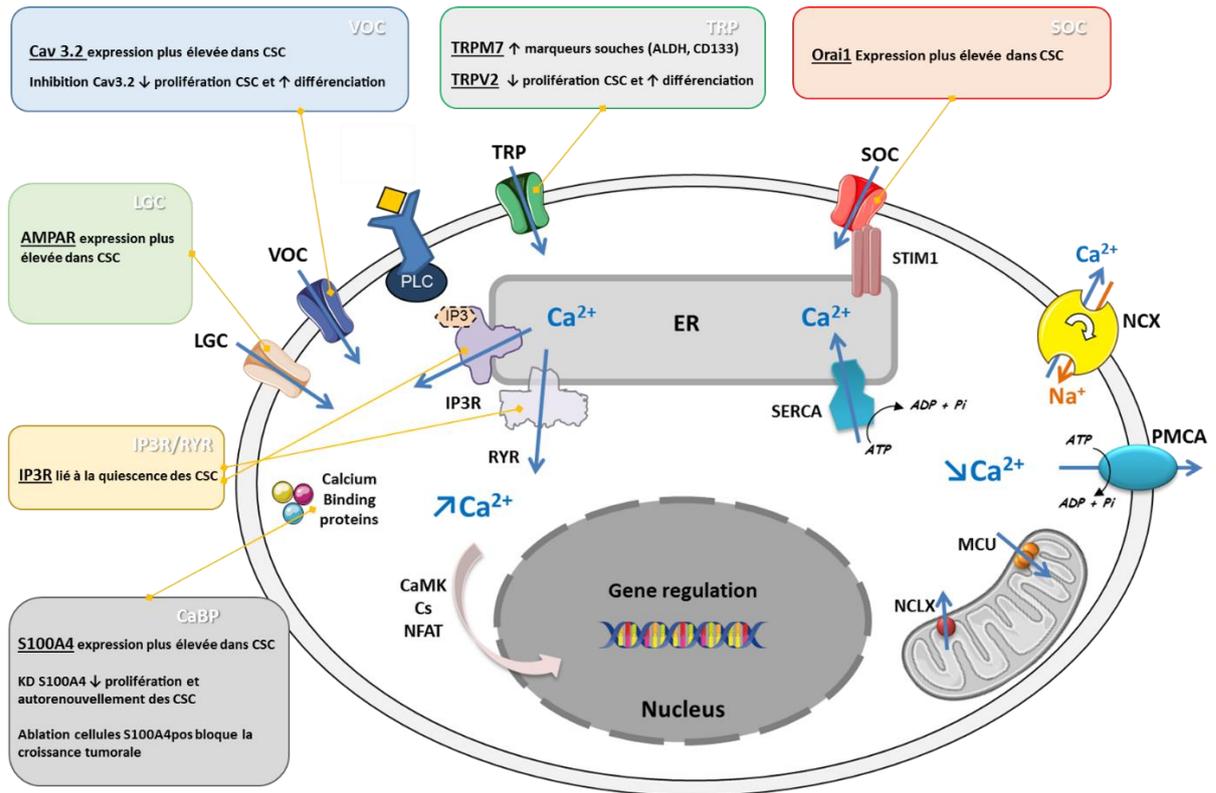


Figure 13 : Acteurs de la signalisation calcique piratés dans les cellules souches de glioblastomes.

A l'heure actuelle, il n'existe que très peu d'étude sur le rôle des SOC dans les CSG. Parmi elles, des analyses transcriptomiques de CSG de patients ont montré une augmentation des transcrits de Orai1 comparé aux cellules de la masse tumorale (Robil et al., 2015).

Objectifs

Les cellules souches neurales (CSN) produisent des neurones et des cellules gliales tout au long de la vie de l'individu. En cas d'atteintes cérébrales, ces cellules sont recrutées pour réparer le tissu endommagé. Ces cellules suscitent donc un intérêt considérable en matière de médecine régénératrice. Toutefois, le développement de thérapies reposant sur les CSN exige une connaissance approfondie des mécanismes de régulation gouvernant ces cellules.

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquemment rencontrées chez l'adulte ainsi que celles présentant le plus fort taux de mortalité. Les cellules souches de glioblastomes (CSG) constituent une sous-population de cellules retrouvées au sein des tumeurs de glioblastomes. Ces cellules sont très résistantes aux traitements, les rendant potentiellement responsables des nombreuses rechutes observées chez les patients. Les CSG et CSN partagent des caractéristiques telles que l'autorenouvellement ou la multipotentialité. De nombreuses études suggèrent que les CSG sont issues de la transformation des CSN.

Des analyses transcriptomiques, effectuées à la fois dans les CSN et les CSG, ont mis en évidence un enrichissement en transcrits de la signalisation calcique dans ces cellules. L'ion calcium est un second messager ubiquitaire dont les variations de concentration cytosolique régulent de nombreux processus cellulaires. Sa concentration intracytosolique varie suite à la libération des réserves de calcium intracellulaire ou grâce à un influx calcique en provenance du compartiment extracellulaire. Constituant une des voies d'entrée majeure du calcium dans la cellule, les Store-Operated Channels (SOC) sont des canaux calciques régulant une grande variété de processus cellulaires comme la prolifération ou la migration. Il est démontré qu'ils peuvent être détournés afin de favoriser la progression tumorale.

Etant donné que les SOC sont activés par de nombreux signaux extracellulaires et que l'activité des CSN et des CSG est très dépendante de leur microenvironnement, nous sommes intéressés au rôle potentiel des SOC dans la régulation des CSN d'une part, et des CSG, d'autre part.

Des données préliminaires obtenues au laboratoire et des travaux de la littérature sur des souris invalidées pour *Orai1* (Somasundaram et al., 2014) ont montré que l'inhibition des SOC réduit la prolifération cellulaire des CSN de la zone sous-ventriculaire (SVZ), une zone qui constitue le principal réservoir de CSN dans le cerveau adulte. Sur la base de ces données, le projet visait à poursuivre l'étude du rôle des SOC dans les CSN en examinant leurs effets sur l'autorenouvellement et la différenciation cellulaire. Afin de déterminer si ce mécanisme découvert sur les CSN de la SVZ est commun à des CSN provenant d'une autre niche neurogénique de la souris adulte, nous avons étudié la présence et le rôle des SOC dans les CSN issues de l'*area postrema* (AP), une zone impliquée dans la régulation de la balance énergétique.

Compte tenu des rôles potentiels d'une altération de la signalisation calcique et de celle des CSN dans le développement de nombreuses pathologies cérébrales dont les glioblastomes, nous avons poursuivi nos travaux en étudiant l'implication des SOC dans les CSG.

L'autorenouvellement est une caractéristique clé des cellules souches. C'est grâce à elle que les CSN et les CSG peuvent maintenir leur population. Une meilleure compréhension de la régulation de ce processus est de grand intérêt à la fois pour la médecine régénératrice et pour lutter contre les glioblastomes ou tout autre cancer comportant des CSC.

Ainsi notre but était d'examiner :

- L'expression et la fonctionnalité des canaux SOC dans les CSN et les CSG.
- L'impact de leur inhibition sur la prolifération, l'autorenouvellement et la différenciation des CSN et des CSG.

Une première partie des résultats est dédiée au rôle de la signalisation calcique passant par les SOC dans les cellules souches neurales de souris adultes.

La seconde est dédiée au rôle de ces canaux dans la régulation des cellules souches cancéreuses de glioblastomes.

Résultats

Partie I : Rôle de la signalisation calcique passant par les canaux store-operated dans les cellules souches neurales

1. Rôle des canaux SOC dans les cellules souches neurales de la zone sous-ventriculaire

Article 1 : Store-Operated Calcium entries Control Neural Stem Cell Self-Renewal in the Adult Brain Subventricular Zone

La zone sous-ventriculaire (SVZ) est la niche neurogénique la plus importante du cerveau de mammifères adultes. Les cellules souches neurales (CSN) produisent des neurones et des cellules gliales tout au long de la vie de l'individu.

Des analyses transcriptomiques effectuées dans des CSN, ont mis en évidence un enrichissement en transcrits de la signalisation calcique dans ces cellules. L'ion calcium est un second messager ubiquitaire dont les variations de concentration cytosolique régulent de nombreux processus cellulaires. Les Store-Operated Channels (SOC) sont des canaux calciques constituant une des voies d'entrée majeure du Ca^{2+} dans la cellule. Ils sont activés par de nombreux signaux du microenvironnement, et régulent une grande variété de processus cellulaires comme la prolifération ou la migration.

Nous avons montré par des approches *in vitro* et *in vivo*, que les CSN provenant de la zone sous-ventriculaire de souris adultes expriment des TRPC1 et Orai1, des constituants de SOC, et leur activateur STIM1. L'imagerie calcique nous a permis d'établir que ces canaux sont fonctionnels dans les CSN isolées à partir de la SVZ de souris adultes. Leur inhibition pharmacologique diminue la prolifération et l'autorenouvellement des CSN, propriété indispensable au maintien de la population souche, sans affecter la différenciation cellulaire. Plus spécifiquement, nous avons démontré que cette diminution de l'autorenouvellement est due à une modification de la balance entre division symétrique et asymétrique des CSN.

Article 1

Store-Operated Calcium entries Control

Neural Stem Cell Self-Renewal in the

Adult Brain Subventricular Zone

Store-Operated Calcium Entries Control Neural Stem Cell Self-Renewal in the Adult Brain Subventricular Zone

FLORENCE DOMENICHINI,* ELODIE TERRIÉ,* PATRICIA ARNAULT, THOMAS HARNOIS, CHRISTOPHE MAGAUD, PATRICK BOIS, BRUNO CONSTANTIN, VALÉRIE CORONAS 

Key Words. Adult stem cells • Calcium flux • Nervous system • Neural stem cell • Self-renewal • Stem cell asymmetry • Stem cell–microenvironment interactions • Stem cells • Neurogenesis/neural regeneration • Stem cell niche

Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, University of Poitiers, CNRS ERL 7003, Poitiers Cedex 09, France

*Co-first authors.

Correspondence: Valérie Coronas, Ph.D., Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, University of Poitiers, CNRS ERL 7003, Bat B36, 1 rue Georges Bonnet-TSA 51 106, 86073 Poitiers Cedex 09, France. Telephone: 33 (0)5 49 45 36 55; e-mail: valerie.coronas@univ-poitiers.fr

Received July 20, 2017; accepted for publication January 10, 2018; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* January 23, 2018.

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.2786>

ABSTRACT

The subventricular zone (SVZ) is the major stem cell niche in the brain of adult mammals. Within this region, neural stem cells (NSC) proliferate, self-renew and give birth to neurons and glial cells. Previous studies underlined enrichment in calcium signaling-related transcripts in adult NSC. Because of their ability to mobilize sustained calcium influxes in response to a wide range of extracellular factors, store-operated channels (SOC) appear to be, among calcium channels, relevant candidates to induce calcium signaling in NSC whose cellular activities are continuously adapted to physiological signals from the microenvironment. By Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), Western blotting and immunocytochemistry experiments, we demonstrate that SVZ cells express molecular actors known to build up SOC, namely transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) and Orai1, as well as their activator stromal interaction molecule 1 (STIM1). Calcium imaging reveals that SVZ cells display store-operated calcium entries. Pharmacological blockade of SOC with SKF-96365 or YM-58483 (also called BTP2) decreases proliferation, impairs self-renewal by shifting the type of SVZ stem cell division from symmetric proliferative to asymmetric, thereby reducing the stem cell population. Brain section immunostainings show that TRPC1, Orai1, and STIM1 are expressed *in vivo*, in SOX2-positive SVZ NSC. Injection of SKF-96365 in brain lateral ventricle diminishes SVZ cell proliferation and reduces the ability of SVZ cells to form neurospheres *in vitro*. The present study combining *in vitro* and *in vivo* approaches uncovers a major role for SOC in the control of SVZ NSC population and opens new fields of investigation for stem cell biology in health and disease. *STEM CELLS* 2018; 00:000–000

SIGNIFICANCE STATEMENT

The present study addresses the roles in adult neural stem cells (NSC) of store-operated channels (SOC), which are calcium channels that have the capacity to mobilize calcium influxes in response to a wide range of extracellular signals. Our study combining multiple *in vitro* and *in vivo* approaches, demonstrates that NSC express SOC that support calcium entries (SOCE), and that pharmacological inhibition of SOCE decreases proliferation and self-renewal of NSC by promoting asymmetric at the expense of symmetric proliferative division. Our study opens new perspectives for examining further the physiological roles of SOC within stem cells and their involvement in brain physiopathology.

INTRODUCTION

Stem cells contribute to homeostasis and repair of the tissues wherein they reside by providing new differentiated cells. In the brain of adult rodents, the subventricular zone (SVZ) bordering lateral ventricles is the major reservoir of neural stem cells (NSC) [1]. Within the murine SVZ germinal niche, NSC proliferate, self-renew and continuously provide thousands

of olfactory bulb neurons every day, as well as a small number of myelinating oligodendrocytes [2–5]. Recruited by injuries, NSC contribute to brain repair and consequently, to functional recovery [6–10]. Cells that proliferate *in vivo* and that behave as multipotent progenitor cells *in vitro* have also been found in the lateral ventricle walls of the human brain [11, 12]. These human SVZ stem cells could even be harvested by endoscopy for *in vitro*

vitro expansion [13]. Although the ability of SVZ cells to sustain neurogenesis in healthy human brain in vivo is debated and seems limited to striatum for neuronal production, several reports support that as in rodents, SVZ cells are recruited and generate neuroblasts in the injured human brain after an ischemic stroke [14–20]. This capacity is retained even in old age [21]. Taking into account the considerable hope that discovery of NSC has nurtured for brain repair, there is an urgent need for understanding the mechanisms that govern NSC, which is a prerequisite for the manipulation of adult stem cells and neurogenesis.

Previous transcriptome studies underlined enrichment in transcripts related to calcium signaling in NSC in both mice and humans [22, 23]. Calcium is a ubiquitous second messenger whose oscillations of its cytosolic concentration are used as a key signal in virtually every mammalian cell [24]. Changes in cytosolic calcium levels are consecutive to either a release from intracellular calcium stores or a calcium influx from the extracellular medium through calcium channels of the plasma membrane. In many cell types, store-operated calcium entry (SOCE) is an important pathway for calcium influx from the extracellular space. Activated by emptying of intracellular calcium stores, among which the most important reservoir is the endoplasmic reticulum (ER), SOCE occurs through store-operated channels (SOC) that are mainly formed of Orai1 and also of transient receptor potential canonical (TRPC1) [25, 26]. SOCE is coordinated by stromal interaction molecule 1 (STIM1) protein from the ER that acts as an ER calcium sensor and activates SOC (see Graphical abstract). SOCE is triggered after G protein-coupled or tyrosine kinase-coupled receptors, acting through phospholipase C (PLC)/inositol triphosphate (IP3) pathway, stimulate the release of calcium from the ER stores via IP3 receptor. The subsequent reduction of calcium content in the ER is sensed by STIM1 that oligomerizes and in turn, activates SOC thereby inducing a calcium entry. This SOCE not only allows refilling of calcium stores, but also evokes a sustained calcium signal that drives a wide range of cellular and physiological effects.

SOC are involved in pleiotropic cell functions including proliferation of endothelial cells or lymphocytes, motility of keratinocytes as well as migration of mesenchymal stem cells or myoblasts [27–31]. Early evidence for a crucial role of SOC channels in human health came from the analysis of patients with rare inherited immunodeficiency diseases [32]. Consecutive studies on patients or on mice with Orai1 deficiency revealed in addition to severe immune defects, impairments in skeletal development, myopathy and alterations in hair cell function or skin integrity [33–35]. Genetic invalidation of TRPC1 also resulted in major regeneration impairments of damaged muscle or intestinal mucosa [36, 37], pointing to possible roles of SOC in the maintenance of tissue homeostasis.

Along with reports showing a decreased proliferation of neural progenitors following pharmacological or genetic alterations of SOC [38–40], these above data prompted us to conduct the present study aimed at deciphering the involvement of SOC in NSC. By using multiple in vitro and in vivo approaches, we demonstrate that SVZ cells express SOC whose pharmacological inhibition decreases proliferation and self-renewal by promoting asymmetric division at the

expense of symmetric proliferative division of NSC in the SVZ.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed on C57BL/6J mice. Animals were housed in PREBIOS facilities for animal care (University of Poitiers). All experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture (decree 87849) and the European Communities Council Directive (2010/63/EU) and validated by the Regional Ethical Committee (Authorization n°02184.01).

Solutions and Chemicals

SKF-96365 and YM-58483 (BTP2) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis) and dissolved in water and dimethylsulfoxide (DMSO), respectively. Cell culture media and growth factors were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA).

SVZ Cell Culture

SVZ was microdissected out of C57BL/6J mice brains, dissociated as single cells and grown in DMEM-F12 supplemented with B27 and with 10 ng ml⁻¹ epidermal growth factor (EGF) and 5 ng ml⁻¹ fibroblast growth factor (FGF2) as previously described [41]. Neurospheres obtained after a week in vitro, were dissociated as single cells and seeded to obtain secondary neurospheres that were used for calcium imaging assays, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), Western blotting, immunostaining, and cell proliferation assays.

RT-PCR

Total RNA was prepared from SVZ cell cultures using RNable reagent (Eurobio, Les Ulis, France). One microgram of RNA was reverse transcribed at 37°C for 1 hour by using 400U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and 1.5 µg Random Primer Pd(N)₆ (Invitrogen). PCR reactions were performed using *Taq* polymerase (Invitrogen) and the primers described in Supporting Information Table S1. RNA extracted from C2C12 myoblasts was used as positive controls [42]. Negative control was performed in the absence of RNA template.

Western Blot

For Western blotting analysis, 10⁶ SVZ cells were lysed in Laemmli loading buffer (Sigma Aldrich). Samples were resolved in a 9% gradient SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred to Amersham Protran nitrocellulose membranes (0.20 µm-pore size; GE Healthcare, Little Chalfont, U.K.). Immunoblots were probed overnight at 4°C in TBS-Tween with 3% fat milk with one of the following antibodies: polyclonal rabbit anti-Orai1 (H-46, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX; 0.4 µg ml⁻¹), monoclonal mouse anti-STIM1 (GOK 610954, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ; 0.4 µg ml⁻¹), monoclonal mouse anti-TRPC1 (E-6, Santa Cruz Biotechnology; 0.4 µg ml⁻¹) or polyclonal rabbit anti-actin (Sigma Aldrich; 1/5,000) before incubation with anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin-HRP-linked (1/5,000; GE Healthcare) and detection with ECL (Immobilon, Millipore, Billerica, MA). Results were analyzed with GeneGnome XRQ (SYNGENE Ozyme, Cambridge, U.K.).

Immunostaining

For immunostaining of brain sections, mice were deeply anaesthetized and transcardially perfused with a 9 g l⁻¹ NaCl solution followed by 4% paraformaldehyde. Brains were removed, post-fixed, and cryoprotected. Frontal brain sections, 40 µm thick, were cut using a Leica cryostat and processed for immunohistochemistry.

For immunostaining, SVZ neurospheres were thrown on glass slides with a cytospin and fixed in methanol at -20°C. For immunostaining on single cells, SVZ neurospheres were dissociated, plated on polylysine-coated glass coverslips for 24 hours and fixed.

After permeabilization and blockade of non-specific binding sites, the preparations were stained using one of the antibodies listed in Supporting Information Table S2 and then incubated with the appropriate Alexa fluor 555 or Alexa fluor 488 conjugated antibodies before analysis with a spectral confocal FV-1000 station installed on an inverted microscope IX-81 (Olympus). 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) or TOPRO-3 was used to label nuclei. The emitted fluorescence was detected through spectral detection channels between 425–475 nm, 500–530 nm and 550–625 nm, for UV, green and red fluorescence, respectively and through a 650 nm long pass filter for far red fluorescence.

Intracellular Calcium Measurements

Cells were plated at 30,000 cells ml⁻¹ on glass coverslips coated with poly-L-lysine. After 72 hours, cells were incubated for 30 minutes at 37°C with 6 µmol l⁻¹ of the single-wavelength calcium sensitive probe fluo-8-AM (Santa Cruz Biotechnology). Assays were performed in a standard external buffer solution (130 mmol l⁻¹ NaCl, 5.4 mmol l⁻¹ KCl, 0.8 mmol l⁻¹ MgCl₂, 10 mmol l⁻¹ HEPES, 5.6 mmol l⁻¹ D-glucose, pH 7.4). SVZ cells were perfused with the buffer solution containing 0.1 mmol l⁻¹ EGTA (Ca²⁺-free solution). SOCE was triggered with cyclopiazonic acid (CPA) (Sigma Aldrich, 15 µmol l⁻¹) or carbachol (Sigma Aldrich, 10 µmol l⁻¹). Fluorescence images were recorded using a Revolution XD Andor multi-point confocal laser microscopy system equipped with a Yokogawa CSU-X1 spinning disk confocal unit and an Andor EMCCD Camera. The multi-point confocal laser microscopy system was based around an inverted microscope (Olympus IX81-ZDC) equipped with a 60× oil objective and with a microscope incubation chamber. Fluorescence signal was collected at 37°C through the control software Fluoview. Fluo-8-AM was excited at 488 nm and the emitted fluorescence was detected at 522 nm. The intensity of fluorescence emission (F) was measured over time in selected regions of interest on several cells of small neurospheres, normalized to basal fluorescence obtained before stimulation (F₀) and expressed as the ratio of (F-F₀)/F₀.

Cell Proliferation Assays

SVZ cell proliferation was evaluated by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in DNA using an ELISA assay. SVZ neurospheres dissociated as single cells were plated at the concentration of 30,000 cells ml⁻¹ in polylysine-coated 96 well plates and treated for 24 hours with SKF-96365 or YM-58483. BrdU was added to the medium for the last 4 hours of the assay before quantification of BrdU incorporated in DNA according to manufacturer's instructions (Roche diagnostics, Meylan, France).

Cell Culture Growth Assays

SVZ cell culture growth was measured on SVZ neurospheres maintained for 5 days in their culture medium alone (control of SKF-96365), or supplemented with either SKF-96365 (1 µmol l⁻¹), or YM-58483 (5 µmol l⁻¹), or DMSO (control of YM-58483). The viable cells were counted using the Trypan blue exclusion assay.

Cell Death Assays

SVZ neurospheres dissociated as single cells were plated at the concentration of 100,000 cells ml⁻¹ in 12-well plates and treated for 24 hours with SKF-96365 or YM-58483 at the indicated concentrations. Apoptotic cells were labeled with FITC-conjugated AnnexinV (BD Biosciences) and subjected to FACS analysis (BD FACS verse).

Neurosphere Forming and Self-Renewal Assays

SVZ dissected out of mice brains was dissociated and seeded at 10 cells µl⁻¹ in 24 well plates in the cell culture medium alone or supplemented with either SKF-96365 (1 µmol l⁻¹), or YM-58483 (5 µmol l⁻¹), or DMSO. After a 7-day incubation period, primary neurospheres were counted under the microscope. For self-renewal assays, neurospheres were collected, centrifuged, and reseeded (5 cells µl⁻¹) in the culture medium to obtain secondary neurospheres.

SVZ cells obtained and treated as above were also subjected to a neural-colony forming cell assay as described previously [43].

Cell Pair Assays

SVZ dissected out of mice brains was dissociated, plated on polylysine-coated glass coverslips at 10 cells µl⁻¹ and incubated for 18 hours in culture medium containing low concentrations of growth factor (5 ng ml⁻¹ EGF and 2.5 ng ml⁻¹ FGF2) alone or supplemented with either SKF-96365 (1 µmol l⁻¹), or YM-58483 (5 µmol l⁻¹), or DMSO. The preparations were then fixed and immunostained for SOX2 and α-tubulin. Cell pairs were analyzed with a spectral confocal FV-1000 station installed on an inverted microscope IX-81 (Olympus).

Cell Differentiation Assays

SVZ neurospheres were dissociated as single cells, plated at the concentration of 80,000 cells ml⁻¹ on polylysine-coated glass coverslips and allowed to adhere to the substrate overnight. SVZ cells were then treated with SKF-96365 (1 µmol l⁻¹), or YM-58483 (5 µmol l⁻¹), or DMSO for 1 week in culture medium without growth factors. The cultures were then fixed and immunostained for Glial fibrillary acidic protein (GFAP), O4, βIII-tubulin, or doublecortin (DCX).

In Vivo Injection of SOC Inhibitors

Two to three months-old mice were anesthetized with 100 mg kg⁻¹ ketamine and 10 mg kg⁻¹ xylazine. Two microliters of a 9 mg ml⁻¹ NaCl solution containing either 100 ng µl⁻¹ EGF or 100 ng µl⁻¹ EGF combined with 6 nmol µl⁻¹ SKF-96365 were injected as a single dose in the left lateral cerebral ventricle using a 5 µl Hamilton syringe at the following coordinates [anterior relative to Bregma, lateral, depth below the dura]: 0.74 mm, 0.6 mm, 2.18 mm. Seventy two hours post-intracerebroventricular injections, SVZ was microdissected and subjected to the neurosphere assay.

For the analysis of cell proliferation and cell death, mice that had been injected in the left lateral cerebral ventricle 2 μl of either 500 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ EGF or 500 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ EGF combined with 6 $\text{nmol } \mu\text{l}^{-1}$ SKF-96365, were deeply anesthetized 6 hours post-injection and transcardially perfused with paraformaldehyde. Brains were removed and frontal sections, 40 μm thick, were cut using a cryostat. Ki67 immunostaining, alone or along with SOX2, and TUNEL labeling were performed following denaturation during 20 minutes in sodium citrate buffer at 95°C, by using respectively a monoclonal mouse Ki67 antibody (1/250, Abcam, Cambridge, U.K.) and an in situ cell death detection kit (Sigma Aldrich).

Data Analysis

For in vitro experiments, data were derived from at least three independent experiments, each being performed with a culture derived from one animal ($N=3$ experiments corresponds to three different mice). Cell numbers were counted on a Leica DMI6000 microscope. Percentages of GFAP, DCX, O4, nestin, or β III-tubulin immunoreactive cells were determined from counts in 15 fields of view in each coverslip with a 40 \times objective, by an observer blind to the assay (more than 250 cells were counted per coverslip).

Proliferative symmetric (SOX2+/SOX2+), asymmetric (SOX2+/SOX2-), and differentiative symmetric divisions (SOX2-/SOX2-) were counted with a spectral confocal FV-1000 station installed on an inverted microscope IX-81 (Olympus). Percentages of each type of cell pairs were determined from 20 to 60 cell pair counts in each coverslip with a 60 \times objective, by an observer blind to the assay.

For in vivo experiments, numbers of Ki67 and percentages of Ki67/SOX2 or BrdU/Ki67 labeled cells within the SVZ were determined for each mouse, on 13 brain sections collected at regular intervals from 1.42 mm anterior relative to Bregma to 0.1 mm posterior relative to Bregma (according to Franklin and Paxinos, The mouse brain in stereotaxic coordinates, 3rd Edition, 2008), with a 60 \times objective, by an observer blind to the assay.

Statistical significance of differences was examined by one-way analysis of variance followed by the post hoc Bonferroni test for multiple comparisons or by non-parametric Mann and Whitney test for comparison by pairs (Statview 5.00 software). Statistical significance level was set for p values < .05 and represented on the figures by: * for $p < .05$, ** for $p < .01$, *** for $p < .001$.

RESULTS

SVZ Cells Possess Functional SOC

SOC are mainly formed of Orai1 and/or TRPC1 calcium channels of the plasma membrane. STIM1, a sensor of calcium levels in the ER, activates SOC. To investigate if SVZ cells possess the machinery required for SOCE, we cultured SVZ cells derived from adult mice brains as neurospheres and analyzed on these cultures the presence of TRPC1, Orai1, and STIM1. RT-PCR (Fig. 1A) together with Western blotting (Fig. 1B) and immunostaining analysis (Fig. 1C–1E) showed that SVZ cells express TRPC1, Orai1, and STIM1. Possible physiological relevance of these in vitro data was assessed on mice brain sections and established that TRPC1, Orai1, and STIM1 are also found in SVZ cells in vivo (Fig. 1F–1H).

Next we determined whether SOC are functional in SVZ cells by measuring with calcium imaging their ability to support calcium entries in response to the depletion of ER calcium stores. To induce a decrease of the amount of free calcium in ER, we applied CPA, a blocker of calcium uptake in ER through the sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase. We found that SVZ cells treated with CPA display a release of calcium in the cytoplasm (Fig. 2A; first peak), due to inhibition of calcium uptake and to a basal leak of calcium from ER. This passive store depletion is known to activate SOC at the plasma membrane. Although SOC open a few tenths of second after this calcium discharge, no calcium entry can occur as long as cells are maintained in a calcium-free buffer solution. Figure 2A illustrates that addition of calcium to the extracellular medium induces a calcium influx in SVZ cells (second peak, SOCE). For the quantitative analysis of SOCE, we focused on initial influx rates that are typical from SOCE while the maximal value of the second peak depends both on calcium entry through SOC and on processes that extrude calcium from cells. Thus, we measured the initial slopes from the calcium concentration traces obtained in Figure 2A. In addition, we used YM-58483 (10 $\mu\text{mol l}^{-1}$) or SKF-96365 (40 $\mu\text{mol l}^{-1}$) to block SOCE. Results reported in Figure 2B show that both YM-58483 and SKF-96365 drastically diminish SOCE induced by passive calcium depletion in SVZ cells.

Physiologically, SOCE are usually activated after stimulation of receptors coupled to PLC/IP3 pathway that promotes calcium release from the ER and secondary activation of STIM1. Figure 2C depicts that carbachol (10 $\mu\text{mol l}^{-1}$), an agonist of cholinergic receptors, triggers in SVZ cells a biphasic intracellular rise of calcium formed of a rapid rising phase depending on calcium release from ER, followed by a sustained plateau. In cells placed in a calcium-free buffer solution, carbachol still induces the first calcium peak confirming that it is related to calcium release from internal stores, while the long-lasting plateau is lost (Fig. 2C), indicating that it depends on calcium entries. Moreover, addition of YM-58483 slightly decreases the maximum peak but markedly impairs the plateau phase (Fig. 2D), showing that SOCE supports in SVZ cells a long-lasting calcium response after ligand-evoked calcium release. In addition to ligand-induced calcium responses, SVZ cells can display an oscillatory calcium activity when maintained in their culture medium containing EGF and FGF (Fig. 2E). Known to stimulate specific cellular processes including cell proliferation, these calcium oscillations are abolished by SKF-96365 (Fig. 2F) or YM-58483 (not shown), suggesting that this oscillatory calcium signaling pattern also depends on SOC.

Altogether, our data demonstrate that SVZ cells possess SOC that support calcium entry in response to calcium store depletion induced by signals of the microenvironment.

SOC Regulate Proliferation of SVZ Cells Without Affecting Their Differentiation

First, we determined if SOC regulate SVZ cell proliferation. To this aim, we allowed SVZ cells to form neurospheres during 4 days and then added the SOC inhibitors SKF-96365 or YM-58483. Neurospheres were maintained in these conditions for five additional days, and then dissociated in order to count the cells by using the Trypan blue exclusion assay. Our data showed that both SKF-96365 (1 $\mu\text{mol l}^{-1}$) and YM-58483 (5 $\mu\text{mol l}^{-1}$) significantly reduce SVZ cell culture growth as

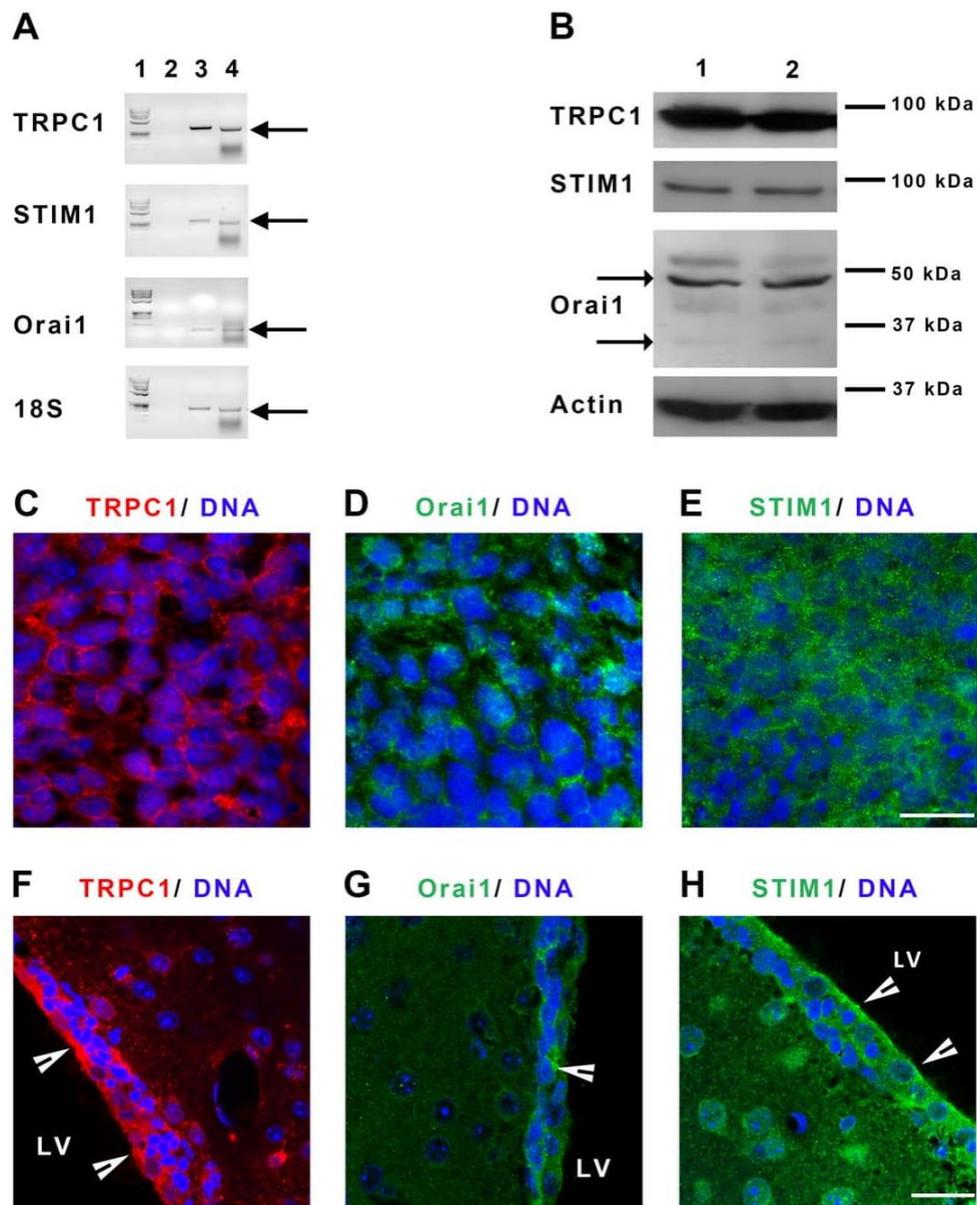


Figure 1. Subventricular zone (SVZ) cells express store-operated channels, TRPC1 and Orai1, and the endoplasmic reticulum calcium sensor STIM1. **(A):** RT-PCR detection of TRPC1, STIM1, and Orai1 transcripts in SVZ cells cultured as neurospheres (lane 3). Lane 1 corresponds to DNA molecular weight markers (PHI174 DNA/HaeIII). Lane 2 represents RT-PCR performed in the absence of reverse transcription (negative control). Lane 4 depicts RT-PCR products obtained using RNA from C2C12 myotubes known to express the transcripts (positive control). 18S ribosomal RNA was used as a positive control. Arrows point to the transcripts. **(B):** Western blot analysis of TRPC1, Orai1, and STIM1 proteins obtained from two different SVZ cell cultures (lanes 1 and 2). Molecular weights of the markers are given on the right of the figure. Arrows point to the two bands obtained for Orai1 that correspond to unglycosylated (35 kDa) and glycosylated (50 kDa) forms of Orai1. Micrographs representing immunostainings of TRPC1 (red, **C, F**), Orai1 (green, **D, G**) or STIM1 (green, **E, H**) on SVZ cell cultures (**C–E**) or on mice brain sections (**F–H**). Cell nuclei were labeled with TOPRO-3 (blue). Arrowheads indicate SVZ. Scale bars: 20 μm . Abbreviations: LV, lateral ventricle; STIM1, stromal interaction molecule 1; TRPC1, transient receptor potential canonical 1.

compared to their controls (Supporting Information Fig. S1). This decrease of SVZ cell numbers does not seem related to an increase of cell death, as neither SKF-96365 at $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ nor YM-58483 at $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ affect the proportions of dead (Supporting Information Fig. S1) or of apoptotic cells (Fig. 3A).

BrdU cell proliferation assay indicates that the reduction in SVZ cell number induced by SKF-96365 or YM-58483 is

due to an impairment of cell proliferation by SOC inhibitors. As shown in Figure 3B, SKF-96365 and YM-58483 dose-dependently decrease BrdU incorporation for concentrations ranging from 0.1 to $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ and 1 to $20 \mu\text{mol l}^{-1}$, respectively.

SVZ cell cultures contain progenitors that have the ability to differentiate as neurons and as glial cells. Exposing SVZ cell

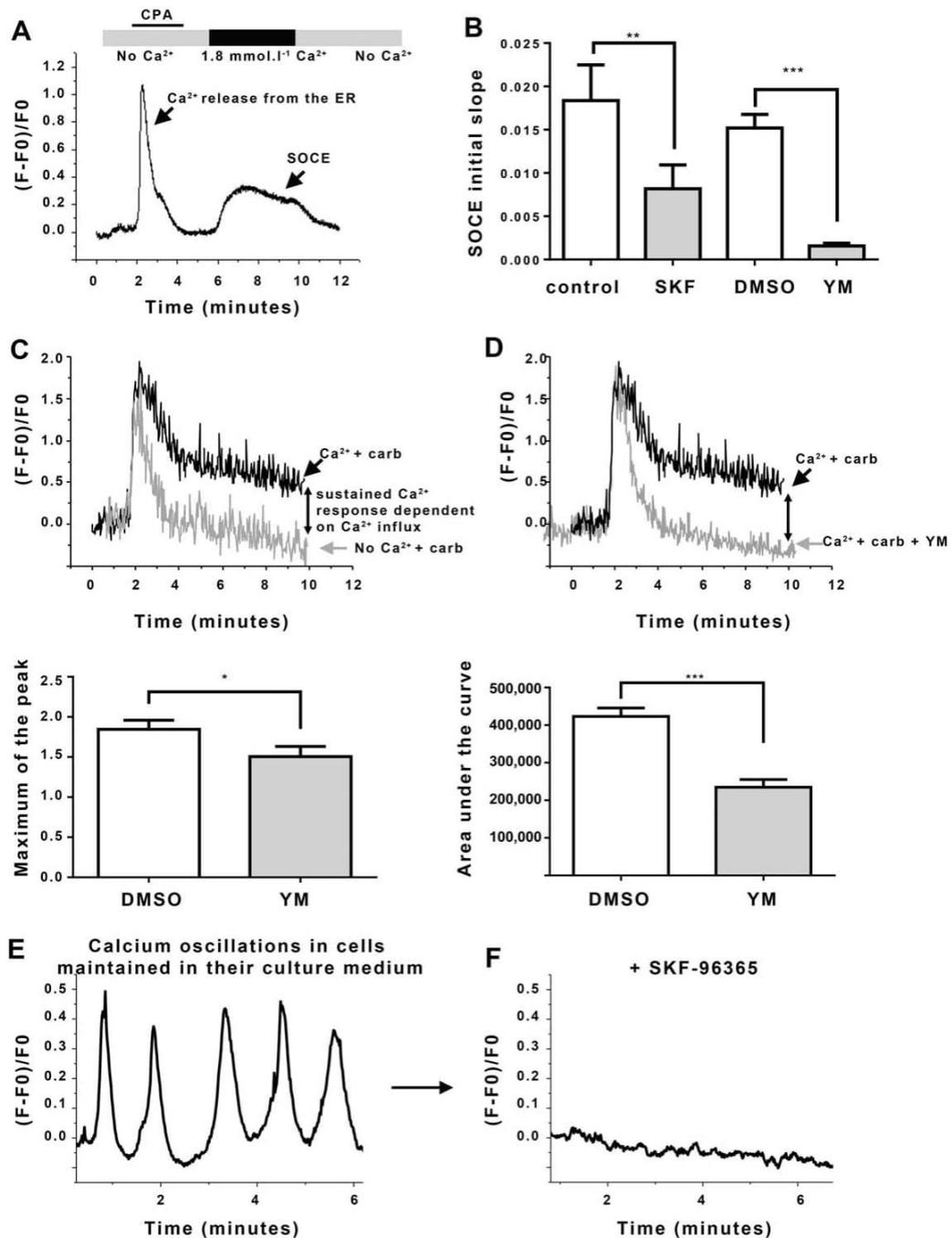


Figure 2. Living subventricular zone (SVZ) cells display SOCE. **(A):** A representative trace of SOCE recording in SVZ cells. SVZ cells loaded with Fluo8 were transferred to a zero calcium solution and to $15 \mu\text{mol l}^{-1}$ CPA leading to the release of calcium from the ER (first peak). Replacement of zero calcium solution by a $1.8 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ physiological buffer induced a calcium entry through SOC (second peak, SOCE). When cells were washed in a zero calcium solution, the fluorescent signal returned to initial level. **(B):** Bar graphs representing mean initial slope of the rising phase during the second peak. SOCE were recorded in control $1.8 \text{ mmol l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ or with addition of SKF-96365 (SKF, $40 \mu\text{mol l}^{-1}$), or YM-58483 (YM, $10 \mu\text{mol l}^{-1}$) or DMSO. Data represented as means \pm SEM were obtained from recordings on at least 20 different cells per condition. **, $p = .0023$; ***, $p < .001$. **(C, D):** Representative traces of intracellular biphasic calcium signal in response to $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ carbachol (carb). The black trace was obtained in control conditions and displayed a sustained plateau phase due to SOC activation. The gray trace was obtained either (C) in an extracellular medium without calcium (No Ca^{2+}) or in presence of $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ YM-58483 (D) and displayed a transient calcium signal without the plateau phase. Bar graphs represent the maximum peak of the first phase (left panel) and the area under curve of the complete response to carbachol (right panel) after carbachol stimulation in control conditions (DMSO) or with YM-58483. These data are represented as means \pm SEM and were obtained from recordings on at least 20 different cells per condition. *, $p = .0119$; ***, $p < .001$. **(E, F):** Representative traces of intracellular calcium oscillations recorded in SVZ cells maintained at 37°C , in their culture medium alone (E) or supplemented with $40 \mu\text{mol l}^{-1}$ SKF-96365 (F). Abbreviations: CPA, cyclopiazonic acid; DMSO, dimethylsulfoxide; ER, endoplasmic reticulum; SOCE, store-operated calcium entry.

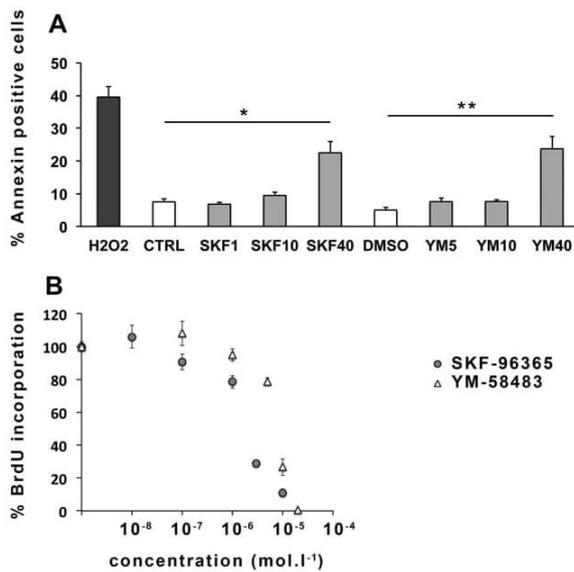


Figure 3. Pharmacological inhibition of store-operated channels inhibits subventricular zone (SVZ) cell proliferation. **(A):** Percentages of apoptotic Annexin V positive cells in SVZ cell cultures maintained for 24 hours in the presence of increasing concentrations of SKF-96365 or YM-58483 indicated on the figure in $\mu\text{mol l}^{-1}$ (e.g., SKF1 means SKF-96365 at $1 \mu\text{mol l}^{-1}$). Neither SKF-96365 nor YM-58483 induced apoptosis in SVZ cells up to $10 \mu\text{mol l}^{-1}$. Exposure of SVZ cells to SKF-96365 nor YM-58483 at $40 \mu\text{mol l}^{-1}$ for 24 hours increased the percentage of apoptotic cells from 6% in control condition to about 20% with SKF-96365 or YM-58483. H_2O_2 at 20mmol l^{-1} was used as a positive control. Data represent means \pm SEM from three independent experiments, each condition being assessed in duplicate per experiment. *, $p = .02$; **, $p = .0039$. **(B):** Percentages of BrdU incorporation in SVZ cells maintained for 24 hours in the presence of increasing concentrations of SKF-96365 or YM-58483. Data represent means \pm SEM from four independent experiments, each condition being assessed in quadruplicate per experiment. Abbreviations: BrdU, bromodeoxyuridine; DMSO, diméthylsulfoxyde.

cultures to SKF-96365 or YM-58483 affects neither percentages of cells in the neuronal lineage assessed by DCX immunostaining of neuroblasts (Fig. 4A, 4B) and by β III-tubulin labeling of neurons (Fig. 4C, 4D), nor those of GFAP expressing astrocytes (Fig. 4E, 4F), O4 labeled oligodendrocytes (Fig. 4G, 4H) or nestin immature cells (Supporting Information Fig. S2), suggesting that SOC are not involved in SVZ cell lineage orientation.

SOC Regulate Self-Renewal and Type of Division of SVZ NSC

SVZ neurospheres are formed of NSC but mainly of their progenies. As we found that SVZ cells possess functional SOC (Figs. 1, 2), we stained the nuclear epitope SOX2 to identify neural stem-like cells. Figure 5A–5C illustrate that SOX2-positive cells all express TRPC1 and STIM1 and part of them also express Orai1. Additional immunolabeling of combinations of NSC markers confirmed that NSC express SOC proteins (Supporting Information Fig. S3), suggesting that, within the different subpopulations of cells in SVZ cultures, NSC possess the machinery required for SOCE.

NSC are characterized *in vitro* by both their capacity to give rise to neurospheres and to self-renew when cultured in

the presence of mitogens. To address possible regulatory role of SOC on NSC activation, we exposed SVZ cultures to SKF-96365 or YM-58483 during 7 days and then, counted the primary neurospheres (Fig. 5D, SPHERE I), which reflect activated stem cells. Primary neurospheres contain both stem cells and their progenies. To quantify stem cells in the neurospheres and thus gain insight into the self-renewal process, we determined the number of cells capable of forming new neurospheres [44]. To this aim, we dissociated the cells of the primary neurospheres and plated them without the inhibitors to allow the formation of secondary neurospheres (Fig. 5D, SPHERE II). For this assay, we chose concentrations of SKF-96365 ($1 \mu\text{mol l}^{-1}$) and YM-58483 ($5 \mu\text{mol l}^{-1}$) that had only modest effects on SVZ cell proliferation (Fig. 3B) in order to let mitotic activity occur for the development of neurospheres. As shown in Figure 5E, both SKF-96365 and YM-58483 significantly decrease the number of primary neurospheres, which was confirmed with a neural colony formation assay (Supporting Information Fig. S4), suggesting that SOC are involved in NSC activation. When dissociated and plated without the inhibitors, primary neurospheres that had been exposed to SOC inhibitors for a week generate significantly less secondary neurospheres in comparison with control SVZ cultures (Fig. 5F), implying that SOC are also involved in NSC self-renewal.

The role of SOC in NSC was further explored through analysis of the type of cell division in SVZ cell cultures exposed to SOC inhibitors. To this aim, SVZ cells isolated from mice brains were plated for 18 hours with or without SKF-96365 ($1 \mu\text{mol l}^{-1}$) or YM-58483 ($5 \mu\text{mol l}^{-1}$) in culture medium containing low levels of EGF and FGF-2 to allow formation of cell pairs. The cultures were then labeled for the NSC marker SOX2 along with α -tubulin to accurately identify cell pairs (Fig. 5G). Three types of cell pairs corresponding to three types of divisions were distinguished: SOX2 positive-SOX2 positive pairs corresponding to symmetric proliferative divisions, SOX2 positive-SOX2 negative pairs corresponding to asymmetric divisions and SOX2 negative-SOX2 negative pairs corresponding to symmetric differentiative divisions. Results represented in Figure 5H show that both SKF-96365 and YM-58483 significantly diminish symmetric proliferative divisions for the benefit of asymmetric divisions, implying that SOC inhibition decreases the NSC population by shifting the type of division from symmetric proliferative to asymmetric.

Physiological Relevance of SOC Roles in NSC

Physiological relevance of the regulatory role of SOC on NSC population observed *in vitro* was then investigated *in vivo*. Immunostaining of mice brain sections shows that TRPC1, Orai1, and STIM1 are expressed by SOX2 positive NSC (Fig. 6A–6C). Additional immunodetection of NSC with either SOX2 and GFAP or nestin and GFAP (Fig. 6D) along with TRPC1, Orai1 or STIM1 shows that NSC express SOC proteins (Fig. 6E–6M).

Involvement of SOC on SVZ cell proliferation was then investigated by injecting *in vivo* a single dose of a solution containing EGF with either SKF-96365 or saline in the left lateral brain ventricle (Fig. 7A). Detection of proliferating cells by Ki67 immunostaining shows that SVZ from mice injected with EGF and SKF-96365 display significantly less Ki67 positive cells as compared to EGF-injected mice (173.0 ± 13.2 Ki67 positive cells per section in EGF+ SKF-96365 compared to 251.5 ± 29.8 in EGF condition), indicating that SOC regulate SVZ cell proliferation (Fig. 7B,

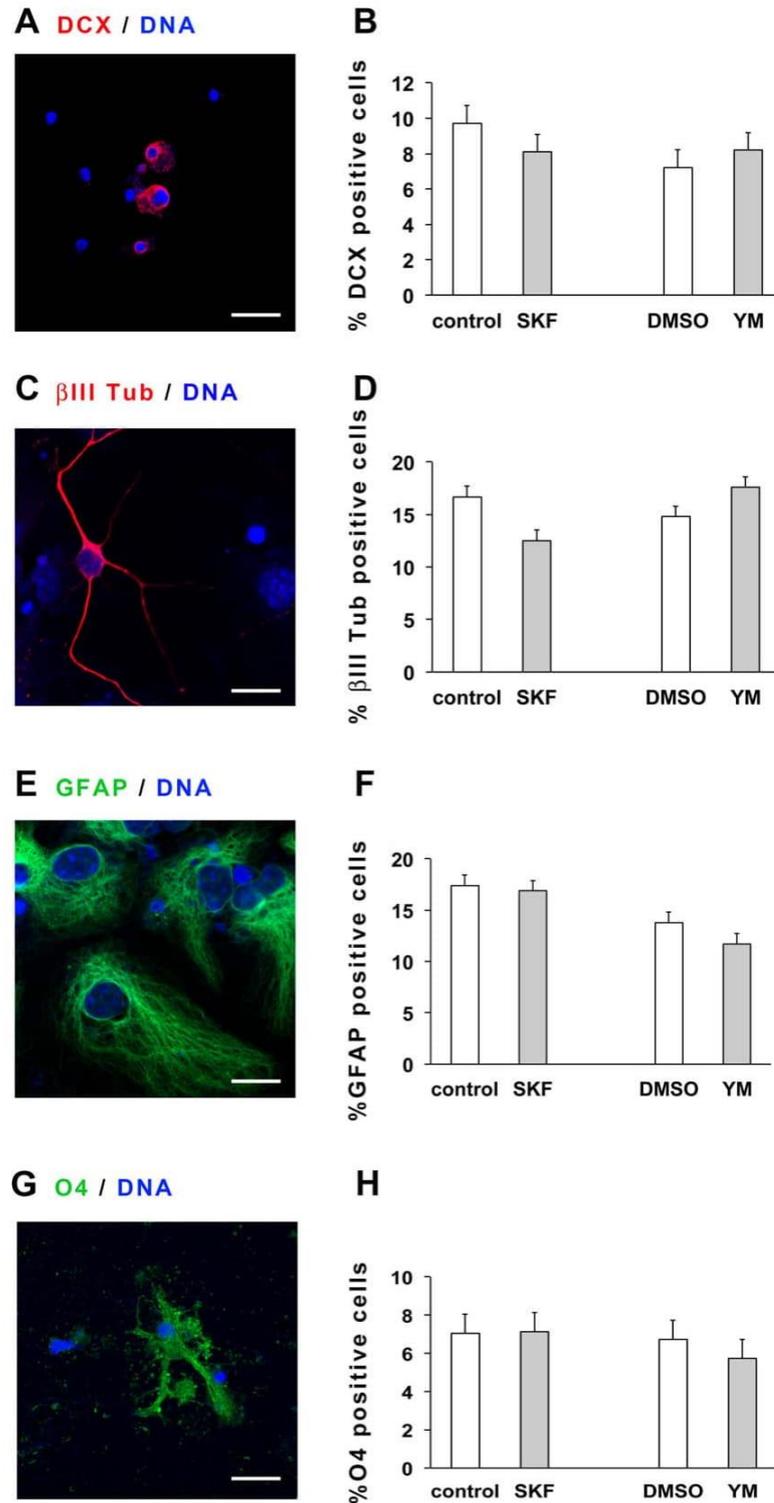


Figure 4. Pharmacological inhibition of store-operated channels does not affect subventricular zone (SVZ) cell differentiation. Micrographs (A, C, E, G) and illustrations of the proportions (B, D, F, H) of DCX expressing neuroblasts (red, A, B) or of βIII-tubulin (βIII Tub) expressing neurons (red, C, D) or of GFAP expressing astrocytes (green, E, F) or of O4 expressing oligodendrocytes (green G, H) in SVZ cell cultures maintained for 7 days in their culture medium without growth factor supplemented or not (control) with either 1 μmol l⁻¹ SKF-96365 (SKF), or 5 μmol l⁻¹ YM-58483 (YM) or DMSO (control of YM-58483). Cell nuclei were labeled with DAPI (blue). Scale bars: 15 μm. Data represent means ± SEM from three independent experiments, each condition being assessed in triplicate per experiment. Differences were significant neither between results from control versus SKF-96365 treated cultures ($p = .391$ for DCX experiments, $p = .149$ for βIII-tubulin experiments, $p = .770$ for GFAP experiments, $p = .752$ for O4 experiments), nor between results from DMSO versus YM-58483 treated cultures ($p = .847$ for DCX experiments, $p = .110$ for βIII-tubulin experiments, $p = .260$ for GFAP experiments, $p = .233$ for O4 experiments). Abbreviations: DCX, doublecortin; DMSO, diméthylsulfoxyde.

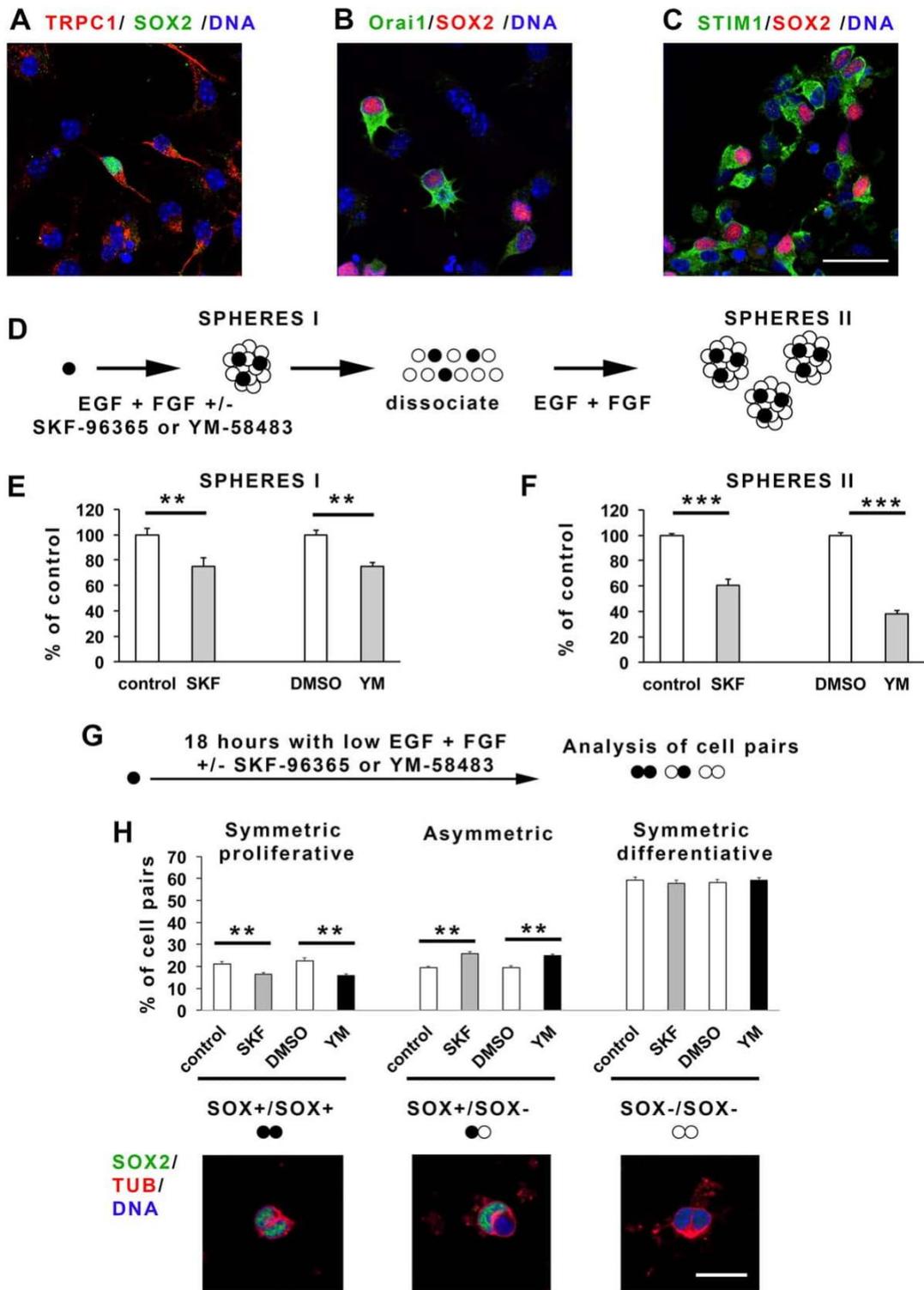


Figure 5. Pharmacological inhibition of store-operated channels inhibits subventricular zone (SVZ) stem cell self-renewal. Micrographs representing SVZ cells labeled with TRPC1 (red, **A**), Orai1 (green, **B**) or STIM1 (green, **C**) antibodies along with SOX2 antibody (A, green; B and C, red). Cell nuclei were labeled with TOPRO-3 (blue). Scale bar: 25 μm. **(D):** Scheme of the neurosphere assay used to obtain data in **(E, F)**. Stem cells are represented as black-colored circles and progenitors as white-colored circles. Numbers of primary neurospheres (**E**, SPHERES I) or secondary neurospheres (**F**, SPHERES II) obtained following 1 week of culture with either 1 μmol l⁻¹ SKF-96365 or 5 μmol l⁻¹ YM-58483 or DMSO. Data are expressed as percent of control and represent means ± SEM from eight independent experiments, each condition being assessed in triplicate per experiment. **, *p* < .01 (*p* = .0055 between control and SKF-96365; *p* = .0014 between DMSO and YM-58483), ***, *p* < .001. **(G):** Scheme of the cell pair assay used to obtain data in **(H)**. **(H)** Percentages of symmetric proliferative (SOX2 positive/SOX2 positive), asymmetric (SOX2 positive/SOX2 negative), or symmetric differentiative (SOX2 negative/SOX2 negative) cell pairs in cultures maintained for 18 hours with either 1 μmol l⁻¹ SKF-96365, or 5 μmol l⁻¹ YM-58483, or DMSO. Examples of cell pairs are depicted. Scale bar: 15 μm. Data represent means ± SEM from three independent experiments, each condition being assessed in triplicate per experiment. **, *p* < .01 (between control and SKF-96365, *p* = .008 for SOX2+/SOX2+ pairs and *p* = .0013 for SOX2+/SOX2- pairs; between DMSO and YM-58483, *p* = .0035 for SOX2+/SOX2+ pairs and *p* = .0017 for SOX2+/SOX2- pairs). Abbreviations: DMSO, dimethylsulfoxide; EGF, epidermal growth factor; STIM1, stromal interaction molecule 1; TRPC1, transient receptor potential canonical.

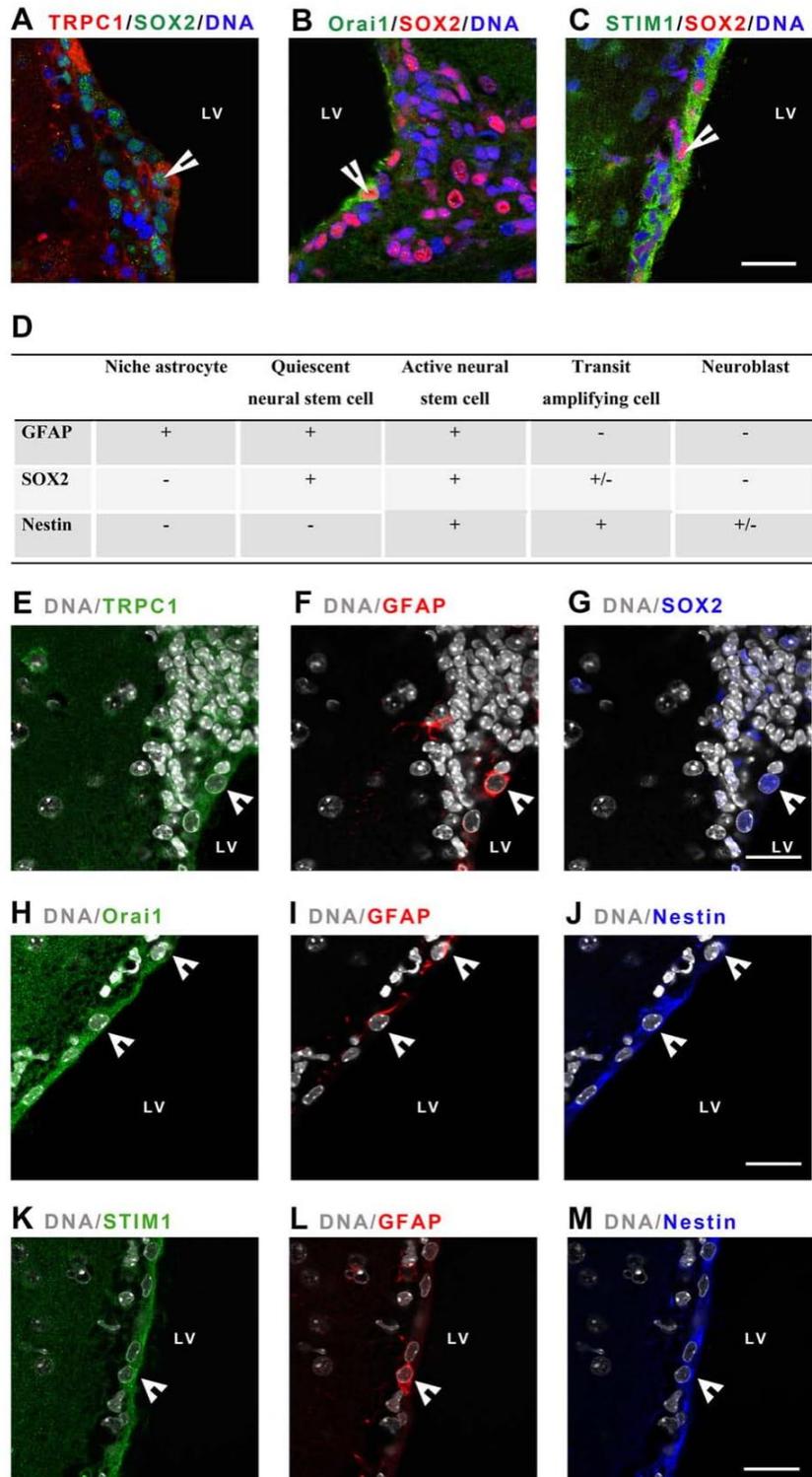


Figure 6. Store-operated channels are expressed by subventricular zone (SVZ) stem cells in vivo. Micrographs representing mice brain sections labeled with TRPC1 (red, **A**), Orai1 (green, **B**), or STIM1 (green, **C**) antibodies along with SOX2 antibody (**A**, green; **B** and **C**, red). Cell nuclei were stained with TOPRO-3 (blue). Arrowheads point to SVZ. The stem cell population was further characterized with combinations of either GFAP/SOX2 or GFAP/nestin immunostainings. Expression of the markers by the different cell populations of SVZ is given in **(D)**. **(E–G)**: Represent micrographs of the same region of a brain section immunolabeled with both TRPC1 (green, **E**), GFAP (red, **F**) and SOX2 (blue, **G**) antibodies along with DAPI to stain nuclei (gray). The arrow points to a cell that coexpresses TRPC1, GFAP, and SOX2. **(H–J)**: Represent micrographs of the same region of a brain section immunolabeled with both Orai1 (green, **H**), GFAP (red, **I**) and nestin (blue, **J**) antibodies along with DAPI to stain nuclei (gray). The arrow points to a cell that coexpresses Orai1, GFAP, and nestin. **(K–M)**: Represent micrographs of the same region of a brain section immunolabeled with both STIM1 (green, **K**), GFAP (red, **L**) and nestin (blue, **M**) antibodies along with DAPI to stain nuclei (gray). The arrow points to a cell that coexpresses STIM1, GFAP, and nestin. Scale bars: 20 μ m. Abbreviations: LV, lateral ventricle; STIM1, stromal interaction molecule 1; TRPC1, transient receptor potential canonical.

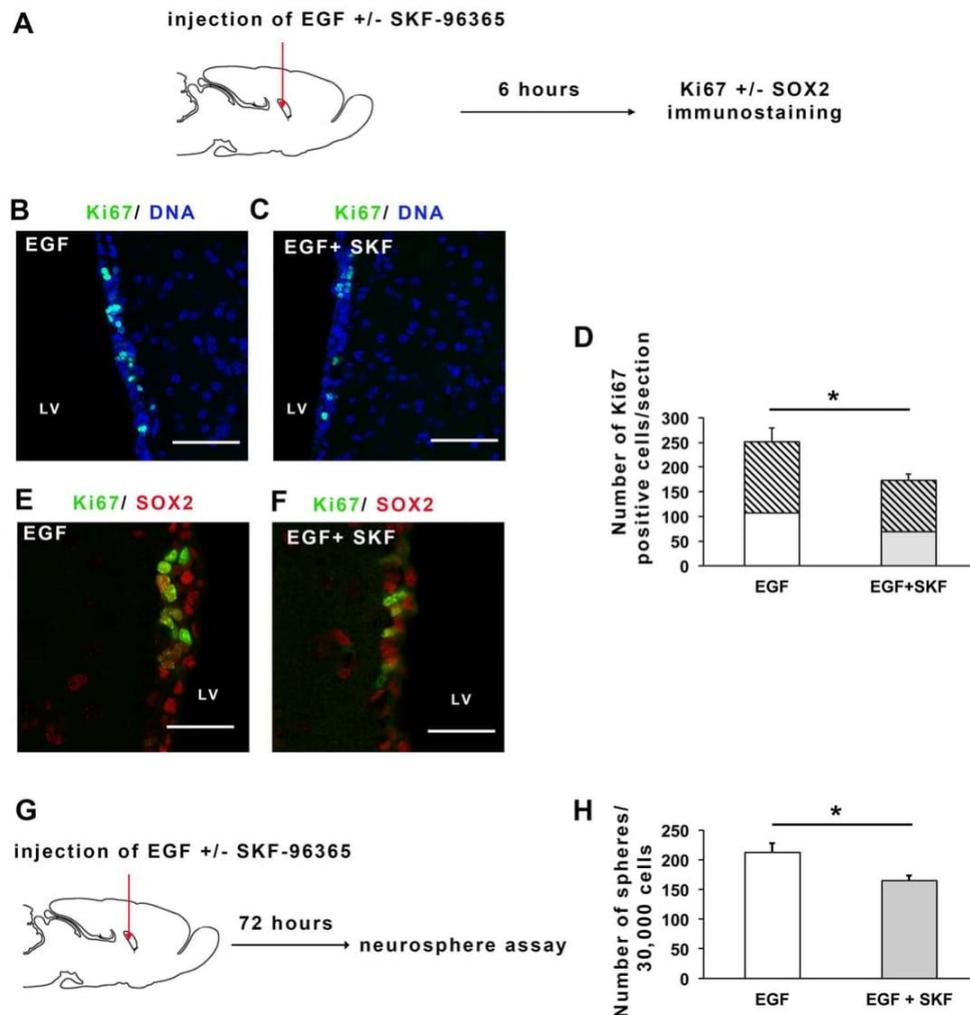


Figure 7. Store-operated channels regulate subventricular zone (SVZ) cell activity in vivo. **(A):** Scheme of the assay used for injections of EGF or EGF+SKF-96365 in a lateral ventricle of the brain to obtain data from **(C)** to **(F)**. Micrographs of Ki67 immunostaining (in green) of brain sections from mice injected with either EGF **(B)** or EGF combined with SKF-96365 **(C)**. Nuclei were labeled with TOPRO-3 (blue). Scale bars: 60 μ m. **(D)** Number of Ki67 positive cells per brain section in the SVZ of mice injected with either EGF or EGF combined with SKF-96365. Data represent means \pm SEM from six animals per condition. *, $p = .0161$. Micrographs of coimmunostaining of Ki67 (in green) and SOX2 (in red) of brain sections from mice injected with either EGF **(E)** or EGF combined with SKF-96365 **(F)**. Scale bars: 20 μ m. Percentages of SOX2 positive cells among Ki67 positive cells were determined in EGF and EGF+SKF-96365 injected brains ($60\% \pm 6.7\%$ of SOX2 positive cells among Ki67 positive cells in EGF + SKF-96365 injected brains as compared to $57\% \pm 5.4\%$ in EGF injected brains, $p = .75$) and are represented as hatched lines on figure **(D)**. **(G)** Scheme of the assay used to obtain data represented in **(H)**. **(H)** Number of neurospheres obtained from SVZ microdissected from mice brain that had been injected with either EGF or EGF+ SKF-96365. Data represent means \pm SEM from seven animals per condition. *, $p = .0127$. Abbreviation: EGF, epidermal growth factor.

7C, 7D). Furthermore, TUNEL-labeling of brain sections shows that although SKF-96365 increases cell death in the SVZ (8.8 ± 1.7 TUNEL positive cells per section in EGF+ SKF-96365 compared to 1.1 ± 0.3 in EGF injected mice), the numbers of dead cells is much lower than the numbers of proliferating cells, suggesting that SKF-96365 major effect occurs through a reduction of cell proliferation. The proliferating cells were further analyzed for SOX2 expression (Fig. 7E, 7F). Injection of SKF-96365 along with EGF does not affect the percentage of SOX2 positive cells among the proliferating Ki67 positive cells. But, as the total number of proliferating cells decreases in the presence of SKF-96365, the number of SOX2 positive proliferating cells also diminishes in injected SKF-96365 brain (Fig. 7D hatched lines), suggesting that SKF-96365 reduces NSC population. In addition

to expressing SOX2, NSC possess an ability to generate neurospheres. Thus, we assessed if the in vivo injection of EGF with SKF-96365 could affect the SVZ NSC population that we characterized with the neurosphere assay (Fig. 7G). We found that SVZ cells derived from animals injected with SKF-96365 and EGF display a decreased capacity to form neurospheres as compared to EGF-injected animals (Fig. 7H), which suggests that SOC regulate the SVZ cell population with stem cell properties in vivo.

DISCUSSION

Using multiple approaches, our study shows that SVZ cells from the adult brain possess functional SOC and demonstrates that

calcium entries supported by these channels in addition to regulating cell proliferation, control NSC self-renewal by acting on the balance of symmetric versus asymmetric stem cell divisions. Thus, our study identifies SOC as key players for activation and expansion of the NSC population. As SOC trigger calcium entry in cells, our data not only provide support to the hypothesis of a major role of calcium in NSC that had been formulated on the basis of transcriptome analysis [22, 23], but also specify mechanisms underlying calcium effects in NSC.

In the process of this study, we observed that SVZ cells express TRPC1, Orai1, and their regulator STIM1 and we found that SVZ cells display SOCE, demonstrating that SVZ cells possess functional SOC. A previous study reported that SVZ cells express Orai1 and STIM1 [40]. Our study not only confirms the existence of SOCE in SVZ cells, but also shows that in addition to Orai1, SVZ cells also possess TRPC1, as do embryonic brain stem cells from which adult NSC derive [39, 45]. In addition to supporting calcium entries, SOC have been shown to activate voltage-gated channels in vascular cells [46]. A previous electrophysiological study [47] and our recordings (data not shown) indicate that SVZ stem cells are highly polarized and fail to produce action potentials. Thus, the effects of SOC on SVZ cells may mostly be related to calcium entries through SOC and subsequent signaling induced by these long-lasting calcium entries evoked by ligands of the microenvironment. Analysis of adult mice brain sections indicated that SOC molecular components are also present *in vivo*. Furthermore, we showed that SOX2 positive NSC express SOC, implying that NSC may be sensitive to calcium alterations and that those modifications in calcium signaling might affect NSC activities. Indeed, we found that exposing SVZ cells to SOC inhibitors reduce the capacity of NSC cells to activate and to self-renew, arguing for a major regulatory role of SOC and calcium signaling over NSC population.

Phenotypes observed following SOC inhibition or genetic alteration of Orai1 or TRPC1 assign a role for SOC in proliferation, survival, differentiation, or migration of various cell types including T cells, myoblasts, skin, or neural progenitors. During our study, we observed that pharmacological inhibition of SOC reduces SVZ cell proliferation as had been already shown for neural and other progenitors [28, 29, 38, 40, 48, 49]. In addition, we demonstrated that SOC inhibition decreases NSC self-renewal not only *in vitro* in SVZ cell cultures but also *in vivo*, following SOC inhibitor injection. This impairment of stem cell self-renewal caused by SOC inhibitors is correlated with a reduction in the proportion of symmetric proliferative for the benefit of asymmetric NSC division, resulting in an overall reduction of the NSC population. Our data thus provide evidence for the first time that SOC control stem cell population by acting on the fate of the daughter cells during division of stem cells. Although the mechanisms whereby SOC orient cell division remain hypothetical, it is interesting to mention that STIM1 and Orai1 can be localized to the cleavage furrow during cytokinesis [50]. These effects of SOC inhibition on cell proliferation and on self-renewal occur without any apparent change in cell differentiation, which is in accordance with previous studies [51].

Recently, it has been reported that brain tissue injury triggers calcium waves that activate NSC [51]. In our study, we observed that SOC support oscillatory calcium activities in SVZ cells maintained in their culture medium containing growth

factors, suggesting that SOC could be relevant targets for recruitment of NSC by brain lesions. Indeed, a shift from asymmetric to symmetric cell division of NSC, that in our study was regulated by SOC, had also been described to be impacted by brain injuries [52], arguing for a central role of SOC in NCS activation during brain tissue repair and would merit further investigation in future dedicated studies. In addition, we found that SOCE could support long-lasting calcium responses following stimulation by the cholinergic agonist carbachol. Our data showing cholinergic-induced SOCE and involvement of SOC in NSC proliferation and self-renewal are interesting to reconcile with the fact that the activity of cholinergic neurons controls proliferation in the SVZ [53] and that cholinergic agonists promote self-renewal of SVZ stem cells (Supporting Information Fig. S5). Thus, SOC, owing to their recruitment by a wide range of extracellular signals and because of their capacity to control stem cell proliferation and self-renewal, appear as critical actors for the adaptation of NSC activities to physiological signals, which would be interesting to deeply decipher in subsequent studies.

Genetic deletion of Orai1 or TRPC1 has been related to alterations in the immune system as well as to impairments in skin integrity, muscle function and regeneration or intestinal mucosa restitution after wounding [32, 33, 36, 37]. In the brain, ablation of TRPC1 or STIM1 in knockout mice results in memory deficiencies [54, 55]. Interestingly, adult neurogenesis has been implicated in learning and memory in both rodents and humans [56, 57] and learning defects induced by impairment of neurogenesis could be reversed by restoring neurogenesis [58–61]. The decreases of NSC proliferation and self-renewal induced by SOC inhibitors that we observed *in vitro* and *in vivo* after direct unilateral intracerebroventricular injection, suggest that SOCE could contribute to learning and memory not only by acting on synaptic remodeling of dendritic spines [62–65], but also by modulating NSC activities. In accordance, the Orai1 gene has been reported as one of the six candidate genes that could be responsible of the neurological phenotypes found in inherited microdeletion syndromes caused by a 445 kb chromosomal deletion [66]. Also, defective SOCE have been associated to severe brain disorders where stem cell dysfunctions have been reported like neurodegenerative Alzheimer's disease [67–69]. Conversely, increased SOC and STIM expression occurs in brain cancer cells that could arise from mutated NSC [70–73]. These data along with the demonstration we provide for a role of SOC in SVZ cell stemness regulation underline the importance of investigating SOC within the brain in physiological and pathological conditions and open new perspectives for further examining the physiological significance of the presence of SOC within the SVZ and other stem cell systems.

CONCLUSION

Our study assigns to SOC and store-operate calcium entries a key role in the regulation of NSC activation and self-renewal, and in the control of the balance of symmetric versus asymmetric cell divisions. As pathological alterations of calcium signaling lead to brain disorders wherein NSC dysfunctions have been described as leading events, a better understanding of

the mechanisms governing NSC activities is required for a further step toward brain repair.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Anne Cantereau for her advices with confocal microscopy and Laetitia Cousin for technical assistance with brain section immunostaining and ELISA experiments. We thank Image UP microscopy core facilities and PREBIOS facilities for animal handling. This work was supported by La Ligue Contre le Cancer Grand Ouest Comités de la Vienne et des Deux Sèvres, Région Poitou-Charentes, FEDER HABISAN and ACI from Universities of Tours and of Poitiers. E. Terrié holds a Ph.D. fellowship from Région Nouvelle-Aquitaine.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.D.: collection, assembly, analysis and interpretation of data on cell differentiation, cell division; E.T.: collection, assembly

and interpretation of data on cell differentiation, cell death, neural colony forming assay and on calcium imaging; P.A.: collection, assembly, analysis and interpretation of *in vivo* data, manuscript writing; T.H.: design, analysis and interpretation of Western blot data; C.M.: collection, assembly, analysis and interpretation of RT-PCR data; P.B.: analysis and interpretation of RT-PCR data, manuscript writing; B.C.: conception and design, collection, assembly, analysis and interpretation of calcium imaging data, manuscript writing; V.C.: conception and design, financial support, collection, assembly, analysis and interpretation of data, manuscript writing; F.D., E.T., P.A., T.H., C.M., P.B., B.C., and V.C.: final approval of manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- Lim DA, Alvarez-Buylla A. The adult ventricular-subventricular zone (V-SVZ) and olfactory bulb (OB) neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8:a018820.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 1994;264:1145–1148.
- Sailor KA, Schinder AF, Lledo P-M. Adult neurogenesis beyond the niche: Its potential for driving brain plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2017;42:111–117.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C et al. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* 2006;26:7907–7918.
- Gonzalez-Perez O, Romero-Rodriguez R, Soriano-Navarro M et al. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *STEM CELLS* 2009;27:2032–2043.
- Nait-Oumesmar B, Picard-Riera N, Kerninon C et al. Activation of the subventricular zone in multiple sclerosis: Evidence for early glial progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:4694–4699.
- Jin K, Minami M, Lan JQ et al. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:4710–4715.
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P et al. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 2006;26:6627–6636.
- Wang X, Mao X, Xie L et al. Conditional depletion of neurogenesis inhibits long-term recovery after experimental stroke in mice. *PLoS One* 2012;7:e38932.
- Xing YL, Röth PT, Stratton JAS et al. Adult neural precursor cells from the subventricular zone contribute significantly to oligodendrocyte regeneration and remyelination. *J Neurosci* 2014;34:14128–14146.
- Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004;427:740–744.
- Ayuso-Sacido A, Roy NS, Schwartz TH et al. Long-term expansion of adult human brain subventricular zone precursors. *Neurosurgery* 2008;62:223–229; discussion 229–231.
- Westerlund U, Svensson M, Moe MC et al. Endoscopically harvested stem cells: A putative method in future autotransplantation. *Neurosurgery* 2005;57:779–784; discussion 779–784.
- Jin K, Wang X, Xie L et al. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:13198–13202.
- Martí-Fàbregas J, Romaguera-Ros M, Gómez-Pinedo U et al. Proliferation in the human ipsilateral subventricular zone after ischemic stroke. *Neurology* 2010;74:357–365.
- Bergmann O, Liebl J, Bernard S et al. The age of olfactory bulb neurons in humans. *Neuron* 2012;74:634–639.
- Ernst A, Alkass K, Bernard S et al. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* 2014;156:1072–1083.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U et al. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 2007;315:1243–1249.
- Nogueira AB, Sogayar MC, Colquhoun A et al. Existence of a potential neurogenic system in the adult human brain. *J Transl Med* 2014;12:75.
- Sanai N, Nguyen T, Ihrle RA et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature* 2011;478:382–386.
- Macas J, Nern C, Plate KH et al. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci* 2006;26:13114–13119.
- Beckervordersandforth R, Tripathi P, Ninkovic J et al. *In vivo* fate mapping and expression analysis reveals molecular hallmarks of prospectively isolated adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7:744–758.
- Sandberg CJ, Vik-Mo EO, Behnan J et al. Transcriptional profiling of adult neural stem-like cells from the human brain. *PLoS One* 2014;9:e114739.
- Berridge M, Lipp P, Bootman M. Calcium signalling. *Curr Biol* 1999;9:R157–R159.
- Prakriya M, Lewis RS. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2015;95:1383–1436.
- Albarran L, Lopez JJ, Salido GM et al. Historical overview of store-operated Ca(2+) entry. *Adv Exp Med Biol* 2016;898:3–24.
- Louis M, Zanou N, Van Schoor M et al. TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J Cell Sci* 2008;121:3951–3959.
- Kuang C, Yu Y, Wang K et al. Knockdown of transient receptor potential canonical-1 reduces the proliferation and migration of endothelial progenitor cells. *Stem Cells Dev* 2012;21:487–496.
- Dragoni S, Laforenza U, Bonetti E et al. Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular Ca²⁺ concentration. *STEM CELLS* 2011;29:1898–1907.
- Darbellay B, Arnaudeau S, König S et al. STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. *J Biol Chem* 2009;284:5370–5380.
- Peng H, Hao Y, Mousawi F et al. Purinergic and store-operated Ca(2+) signaling mechanisms in mesenchymal stem cells and their roles in ATP-induced stimulation of cell migration. *STEM CELLS* 2016;34:2102–2114.
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 2006;441:179–185.
- Vandenbergh M, Raphaël M, Lehen'kyi V et al. Orai1 calcium channel orchestrates skin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:E4839–E4848.
- McCarl C-A, Picard C, Khalil S et al. Orai1 deficiency and lack of store-operated Ca²⁺ entry cause immunodeficiency, myopathy, and ectodermal dysplasia. *J Allergy Clin Immunol* 2009;124:1311–1318.e7.

- 35 Gwack Y, Srikanth S, Oh-Hora M et al. Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORA1. *Mol Cell Biol* 2008;28:5209–5222.
- 36 Rao JN, Rathor N, Zou T et al. STIM1 translocation to the plasma membrane enhances intestinal epithelial restitution by inducing TRPC1-mediated Ca²⁺ signaling after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299:C579–C588.
- 37 Zanou N, Schakman O, Louis P et al. Trpc1 ion channel modulates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway during myoblast differentiation and muscle regeneration. *J Biol Chem* 2012;287:14524–14534.
- 38 Li M, Chen C, Zhou Z et al. A TRPC1-mediated increase in store-operated Ca²⁺ entry is required for the proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells. *Cell Calcium* 2012;51:486–496.
- 39 Fiorio Pla A, Maric D, Brazer S-C et al. Canonical transient receptor potential 1 plays a role in basic fibroblast growth factor (bFGF)/FGF receptor-1-induced Ca²⁺ entry and embryonic rat neural stem cell proliferation. *J Neurosci* 2005;25:2687–2701.
- 40 Somasundaram A, Shum AK, McBride HJ et al. Store-operated CRAC channels regulate gene expression and proliferation in neural progenitor cells. *J Neurosci* 2014;34:9107–9123.
- 41 Ginisty A, Gély-Pernot A, Abaamrane L et al. Evidence for a subventricular zone neural stem cell phagocytic activity stimulated by the vitamin K-dependent factor protein S. *STEM CELLS* 2015;33:515–525.
- 42 Kiviluoto S, Decuypere J-P, De Smedt H et al. STIM1 as a key regulator for Ca²⁺ homeostasis in skeletal-muscle development and function. *Skelet Muscle* 2011;1:16.
- 43 Azari H, Louis SA, Shariffar S et al. Neural-colony forming cell assay: An assay to discriminate bona fide neural stem cells from neural progenitor cells. *J Vis Exp* 2011;49:e2639.
- 44 Hamilton LK, Dufresne M, Joppé SE et al. Aberrant lipid metabolism in the forebrain niche suppresses adult neural stem cell proliferation in an animal model of Alzheimer's disease. *Cell Stem Cell* 2015;17:397–411.
- 45 Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM et al. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17528–17532.
- 46 Ávila-Medina J, Calderón-Sánchez E, González-Rodríguez P et al. Orai1 and TRPC1 proteins co-localize with CaV1.2 channels to form a signal complex in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2016;291:21148–21159.
- 47 Lai B, Mao XO, Xie L et al. Electrophysiological properties of subventricular zone cells in adult mouse brain. *Brain Res* 2010;1340:96–105.
- 48 Wong C-K, So W-Y, Law S-K et al. Estrogen controls embryonic stem cell proliferation via store-operated calcium entry and the nuclear factor of activated T-cells (NFAT). *J Cell Physiol* 2012;227:2519–2530.
- 49 Chen H-C, Wang C-H, Shih C-P et al. TRPC1 is required for survival and proliferation of cochlear spiral ganglion stem/progenitor cells. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2015;79:2290–2294.
- 50 Chan CM, Aw JTM, Webb SE et al. SOCE proteins, STIM1 and Orai1, are localized to the cleavage furrow during cytokinesis of the first and second cell division cycles in zebrafish embryos. *Zygote* 2016;24:880–889.
- 51 Kraft A, Jubal ER, von Laer R et al. Astrocytic calcium waves signal brain injury to neural stem and progenitor cells. *Stem Cell Reports* 2017;8:701–714.
- 52 Zhang R, Zhang Z, Zhang C et al. Stroke transiently increases subventricular zone cell division from asymmetric to symmetric and increases neuronal differentiation in the adult rat. *J Neurosci* 2004;24:5810–5815.
- 53 Paez-Gonzalez P, Asrican B, Rodriguez E et al. Identification of distinct ChAT⁺ neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nat Neurosci* 2014;17:934–942.
- 54 Garcia-Alvarez G, Shetty MS, Lu B et al. Impaired spatial memory and enhanced long-term potentiation in mice with forebrain-specific ablation of the Stim genes. *Front Behav Neurosci* 2015;9:180.
- 55 Xing R, Zhang Y, Xu H et al. Spatial memory impairment by TRPC1 depletion is ameliorated by environmental enrichment. *Oncotarget* 2016;7:27855–27873.
- 56 Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult neurogenesis in the hippocampus: From stem cells to behavior. *Cell* 2016;167:897–914.
- 57 Coras R, Siebzehrnubel FA, Pauli E et al. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. *Brain J Neurol* 2010;133:3359–3372.
- 58 Alonso M, Lepousez G, Sebastien W et al. Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nat Neurosci* 2012;15:897–904.
- 59 Morales-García JA, Echeverry-Alzate V, Alonso-Gil S et al. Phosphodiesterase7 inhibition activates adult neurogenesis in hippocampus and subventricular zone in vitro and in vivo. *STEM CELLS* 2017;35:458–472.
- 60 Arruda-Carvalho M, Akers KG, Guskjolen A et al. Posttraining ablation of adult-generated olfactory granule cells degrades odor-reward memories. *J Neurosci* 2014;34:15793–15803.
- 61 Wang JM, Singh C, Liu L et al. Allopregnanolone reverses neurogenic and cognitive deficits in mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:6498–6503.
- 62 Dhar M, Wayman GA, Zhu M et al. Leptin-induced spine formation requires TrpC channels and the CaM kinase cascade in the hippocampus. *J Neurosci* 2014;34:10022–10033.
- 63 Moccia F, Zuccolo E, Soda T et al. Stim and Orai proteins in neuronal Ca(2+) signaling and excitability. *Front Cell Neurosci* 2015;9:153.
- 64 Tshuva RY, Korkotian E, Segal M. ORA1-dependent synaptic plasticity in rat hippocampal neurons. *Neurobiol Learn Mem* 2017;140:1–10.
- 65 Korkotian E, Oni-Biton E, Segal M. The role of the store-operated calcium entry channel Orai1 in cultured rat hippocampal synapse formation and plasticity. *J Physiol* 2017;595:125–140.
- 66 Labonne JDJ, Lee K-H, Iwase S et al. An atypical 12q24.31 microdeletion implicates six genes including a histone demethylase KDM2B and a histone methyltransferase SETD1B in syndromic intellectual disability. *Hum Genet* 2016;135:757–771.
- 67 Vigont V, Kolobkova Y, Skopin A et al. Both Orai1 and TRPC1 are involved in excessive store-operated calcium entry in striatal neurons expressing mutant huntingtin exon 1. *Front Physiol* 2015;6:337.
- 68 Tong BC-K, Lee CS-K, Cheng W-H et al. Familial Alzheimer's disease-associated presenilin 1 mutants promote γ -secretase cleavage of STIM1 to impair store-operated Ca²⁺ entry. *Sci Signal* 2016;9:ra89.
- 69 Demars M, Hu Y-S, Gadadhar A et al. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res* 2010;88:2103–2117.
- 70 Motiani RK, Hyzinski-García MC, Zhang X et al. STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch* 2013;465:1249–1260.
- 71 Marumoto T, Tashiro A, Friedmann-Morvinski D et al. Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors. *Nat Med* 2009;15:110–116.
- 72 Barami K, Sloan AE, Rojiani A et al. Relationship of gliomas to the ventricular walls. *J Clin Neurosci* 2009;16:195–201.
- 73 Jiang Y, Marinescu VD, Xie Y et al. Glioblastoma cell malignancy and drug sensitivity are affected by the cell of origin. *Cell Rep* 2017;18:977–990.



See www.StemCells.com for supporting information available online.

**Store-operated calcium entries control neural stem cell self-renewal in the adult brain
subventricular zone.**

Florence Domenichini, Elodie Terrié, Patricia Arnault, Thomas Harnois, Christophe Magaud,
Patrick Bois, Bruno Constantin and Valérie Coronas

Supplementary Table 1, Table 2, Figure 1, Figure 2, Figure 3, Figure 4 and Figure 5

**Supplementary Table 1: Primers and annealing temperature used for RT-PCR of
TRPC1, Orai1 and STIM1**

mRNA	Reference of the sequence	Primers	Amplicon (bp)	Annealing temperature (°C)
TRPC1	NM_011643 NM_001311123	CAAGATTTTGGGAAATTTCTGG TTTATCCTCATGATTTGCTAT	372	57
STIM1	NM_009287	AGGAGGGGGCTGAGAAAATA CCTCATCCATGTCATCCACA	318	60
ORAI1	NM_175423	CTAACACCGGGCACCCACTA AAGGGCATAAGGCCAAGGC	75	60
18s (Mrps6)	NM_080456	TTTGATTCTGAAAGCCATGCG CCAGTATGTTCTCCACAGCA	218	57

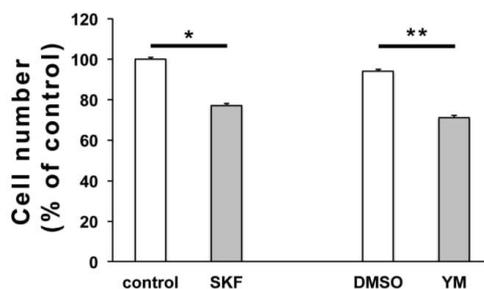
Supplementary Table 2: Primary antibodies used in the study

Antigen	Cell type specificity (when appropriate)	Source	Dilution
GFAP	Glial cell	polyclonal rabbit (Dako)	1.45 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
SOX2	Stem cell	polyclonal goat (Santa Cruz Biotechnology)	0.3-2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
nestin	Stem cell/progenitor	monoclonal mouse (Milipore)	4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
O4	Oligodendrocyte	monoclonal mouse (R&D System)	1.5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
β III-tubulin	Neuron	monoclonal mouse (Sigma Aldrich)	10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
doublecortin	Neuroblast	polyclonal goat (Santa Cruz Biotechnology)	0.7 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
TRPC1		monoclonal mouse (Santa Cruz Biotechnology)	2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Orai 1		polyclonal rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
STIM1		polyclonal rabbit (Santa Cruz Biotechnology)	2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
α -tubulin		monoclonal mouse (Sigma Aldrich)	1.3 $\mu\text{g.ml}^{-1}$

Supplementary Figure 1. Effect of SKF-96365 and YM-58483 on SVZ cell culture growth.

SVZ cell cultures were maintained for 5 days in their cell culture medium alone (control) or supplemented with either 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ SKF-96365 (SKF), or 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ YM-58483 (YM), or DMSO (solvent of YM-58483). At the end of the session, the cells were counted using the Trypan blue exclusion assay. Data represent mean of total cell numbers \pm s.e.m from 3 experiments in triplicates. *: $P = 0.0378$; **: $P = 0.0054$.

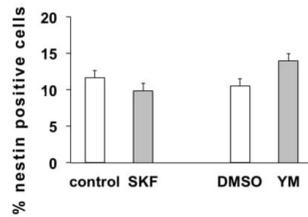
Additionally, Trypan blue staining indicated that proportions of dead cells were significantly increased neither by SKF-96365 ($P = 0,62$ compared to control), nor by YM-58483 ($P = 0,12$ compared to control).



Supplementary Figure 2

SVZ cell cultures maintained for 7 days in their culture medium without growth factor supplemented or not (control) with either 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ SKF-96365 (SKF), or 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ YM-58483 (YM) or DMSO (control of YM-58483). At the end of the session, the cultures were stained with a nestin antibody and percentages of nestin positive cells were determined. Data represent means \pm s.e.m from 3 independent experiments, each condition being assessed in triplicate in every experiment. Differences were significant neither between results from

control versus SKF-96365 treated cultures ($P= 0.566$), nor between results from DMSO versus YM-58483 treated cultures ($P= 0.171$).

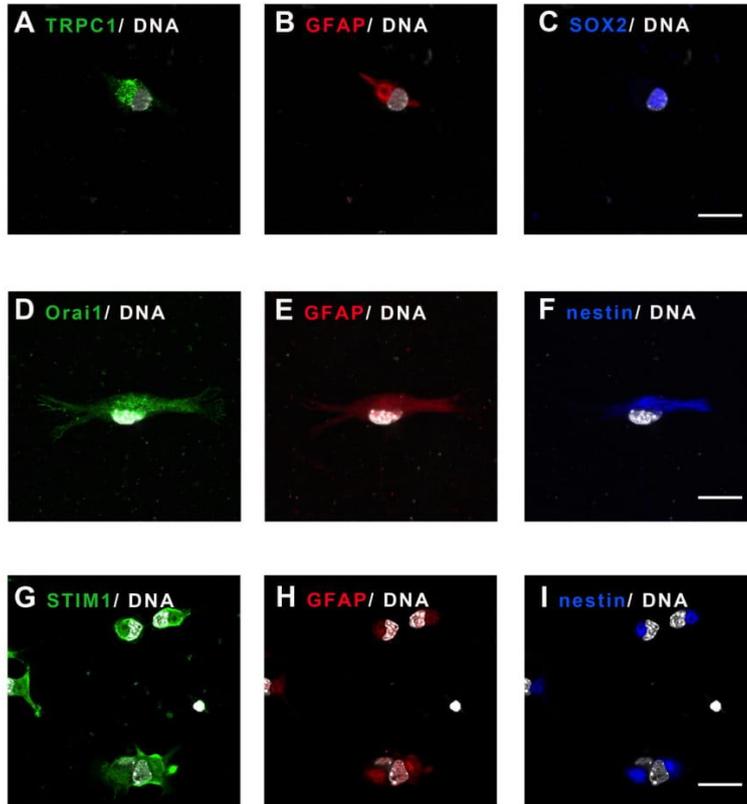


Supplementary Figure 3

SVZ cells were labeled with either GFAP and SOX2 or GFAP and nestin (see the table here below).

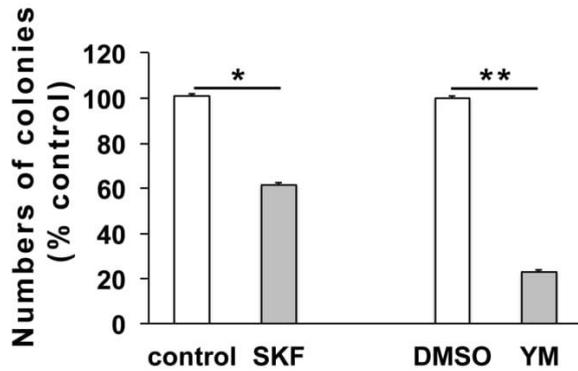
	Niche astrocyte	Quiescent neural stem cell	Active neural stem cell	Transit amplifying cell	Neuroblast
GFAP	+	+	+	-	-
SOX2	-	+	+	+/-	-
Nestin	-	-	+	+	+/-

A-C represent micrographs of a SVZ cell immunolabeled with both TRPC1 (green, **A**), GFAP (red, **B**) and SOX2 (blue, **C**) antibodies along with DAPI to stain nuclei (grey). **D-F** represent micrographs of a SVZ cell immunolabeled with both Orail (green, **D**), GFAP (red, **E**) and nestin (blue, **F**) antibodies along with DAPI to stain nuclei (grey). **G-I** represent micrographs of SVZ cells immunolabeled with both STIM1 (green, **G**), GFAP (red, **H**) and nestin (blue, **I**) antibodies along with DAPI to stain nuclei (grey). Scale bars: 20 μm .



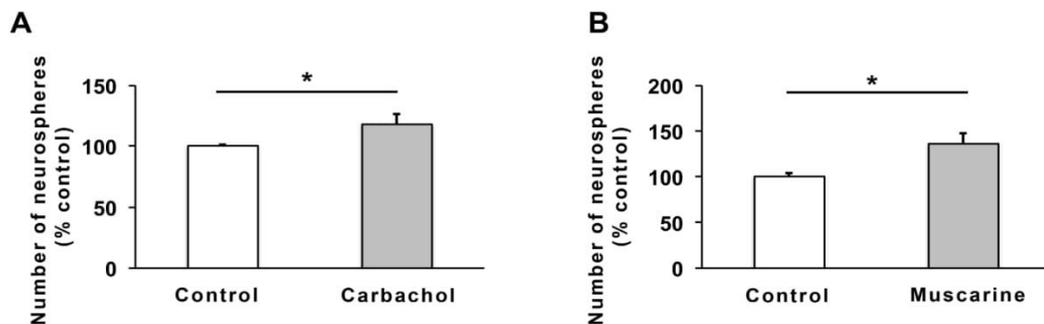
Supplementary Figure 4

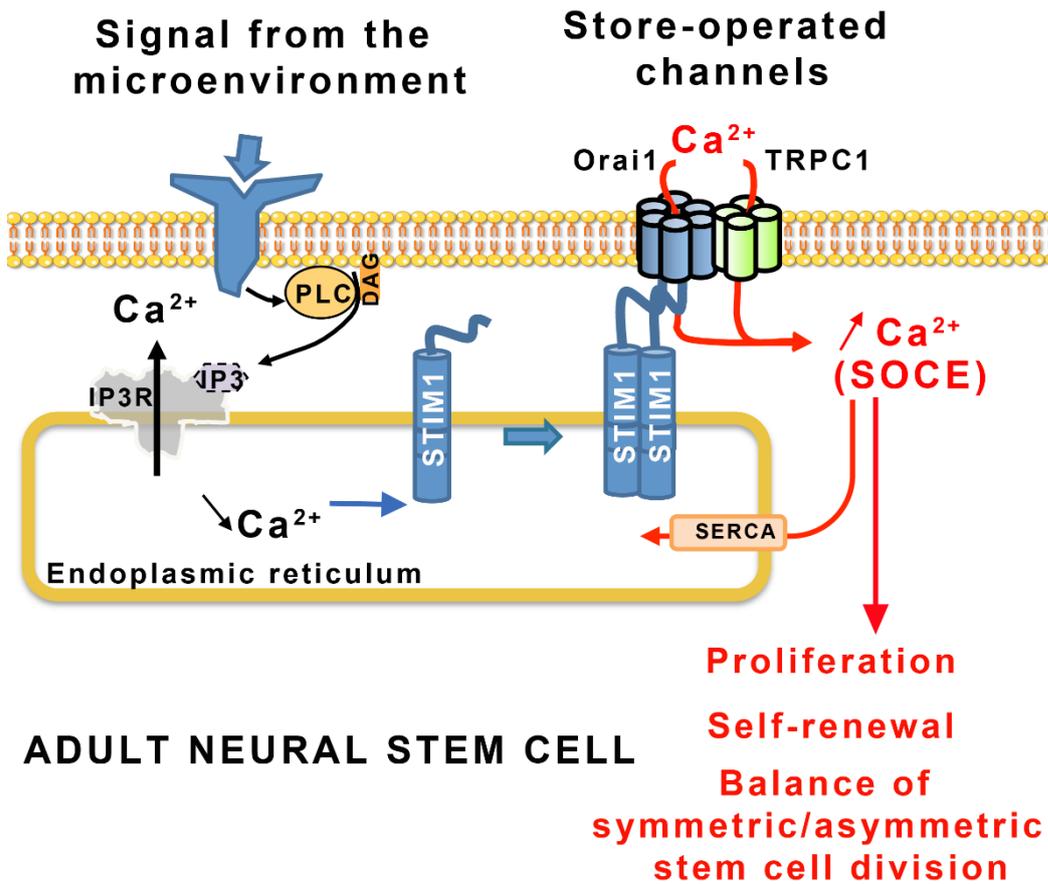
SVZ were microdissected from mice brains, dissociated and subjected to the neural colony forming assay performed in their culture medium supplemented or not (control) with either $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ SKF-96365 (SKF), or $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ YM-58483 (YM) or DMSO (control of YM-58483). Following 3 weeks *in vitro*, the colonies with a diameter more than 2 mm were counted. Data represent means \pm s.e.m from 3 independent experiments, each condition being assessed in duplicate in every experiment. *: $P= 0.0245$, **: $P= 0.0039$.



Supplementary Figure 5. Effect of cholinergic agonists (carbachol and muscarine) on SVZ neural stem cell self-renewal.

SVZ cell cultures were maintained in their cell culture medium alone (control) or supplemented with either $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ carbachol or with $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ muscarine. After one week, neurospheres were collected, dissociated and reseeded to form secondary neurospheres that were counted in order to assess neural stem cell self-renewal ability. Data are expressed as percent of control and represent means \pm s.e.m from 2 experiments in triplicate for carbachol or 5 experiments in triplicate for muscarine. $P = 0.019$ between control and carbachol; $P = 0.011$ between control and muscarine.





Graphical Abstract: Numerous signals from the microenvironment, following interaction with their receptors, can trigger a signal transduction cascade that leads to IP3 production and calcium release from the endoplasmic reticulum (ER). STIM1 senses the reduction of calcium concentration in the ER, oligomerizes and activates storeoperated channels to induce a store-operated calcium entry (SOCE). This calcium entry 1) allows the refilling of calcium stores via the ER calcium pump (SERCA) and 2) triggers a signaling cascade that promote adult neural stem cell proliferation and self-renewal by acting on the balance of symmetric versus asymmetric division of stem cells.

2. Rôle des canaux SOC dans les cellules souches neurales de l'*area postrema*

En plus de la SVZ, le cerveau adulte présente d'autres sites qui abritent des cellules souches/progénitrices capables d'assurer une neurogenèse. Parmi ces régions figure l'*area postrema*, un organe circumventriculaire localisé dans le tronc cérébral, au sein duquel la collaboration entre notre équipe et celle Pr Moysse avait permis d'identifier des CSN dans de précédents travaux (Charrier et al., 2006; Moysse et al., 2006).

Compte tenu du rôle essentiel des SOC dans les CSN adultes de SVZ, nous avons cherché à déterminer si ce rôle des SOC était retrouvé dans des CSN provenant d'une autre niche neurogénique, à savoir l'*area postrema* (AP). En effet, les CSN des différentes niches neurogéniques peuvent avoir des réponses spécifiques aux signaux du microenvironnement. Notre étude avait pour but de déterminer si les SOC étaient un mécanisme de régulation commun aux CSN du cerveau.

L'article en préparation se trouve en annexe de la thèse (Annexe 2), je n'exposerai ici que les résultats que j'ai fournis.

Résultats :

Dans un premier temps, les co-auteurs de l'étude ont montré par RT-PCR, Western blot et immunocytochimie au moyen d'un comarquage avec le marqueur souche SOX2, que les CSN de l'*area postrema* expriment des acteurs du SOC, à savoir TRPC1 Orai1 et STIM1.

Afin de déterminer si les SOC exprimés par les cellules de l'*area postrema* sont fonctionnels, nous avons testé la capacité des cellules isolées de l'*area postrema* et mises en culture, à engendrer un influx calcique après une libération des réserves contenues dans le RE. Pour cela, les cellules ont été incubées avec la sonde ratiométrique Fura-2 capable de se lier au Ca²⁺ libre. La thapsigargine a été utilisée afin de libérer les réserves de Ca²⁺ du RE et ainsi activer les canaux store-operated à la membrane plasmique. Cette libération des réserves induit une première augmentation du taux de Ca²⁺ cytosolique (figure 14A premier pic). Ceci s'accompagne d'une activation des SOC, mais les cellules

étant placées dans un milieu sans Ca^{2+} , l'entrée calcique dépendante des SOC (SOCE) ne peut avoir lieu. L'ajout de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire met en évidence l'influx calcique SOCE (Figure 14A second pic) dont la pente initiale et le maximum (max) du pic permettent de quantifier l'amplitude. Le max étant aussi dépendant des systèmes d'extrusion du Ca^{2+} de la cellule, l'élément le plus représentatif du SOCE est la pente initiale du pic. Cette technique nous a permis de montrer que les cellules de *l'area postrema* ont des canaux fonctionnels, et que l'ajout de YM-58483 à 1 μM ou de GSK-7975A à 5 μM réduisait la pente ainsi que le maximum du SOCE sans inhiber complètement cet influx (Figure 14B et C).

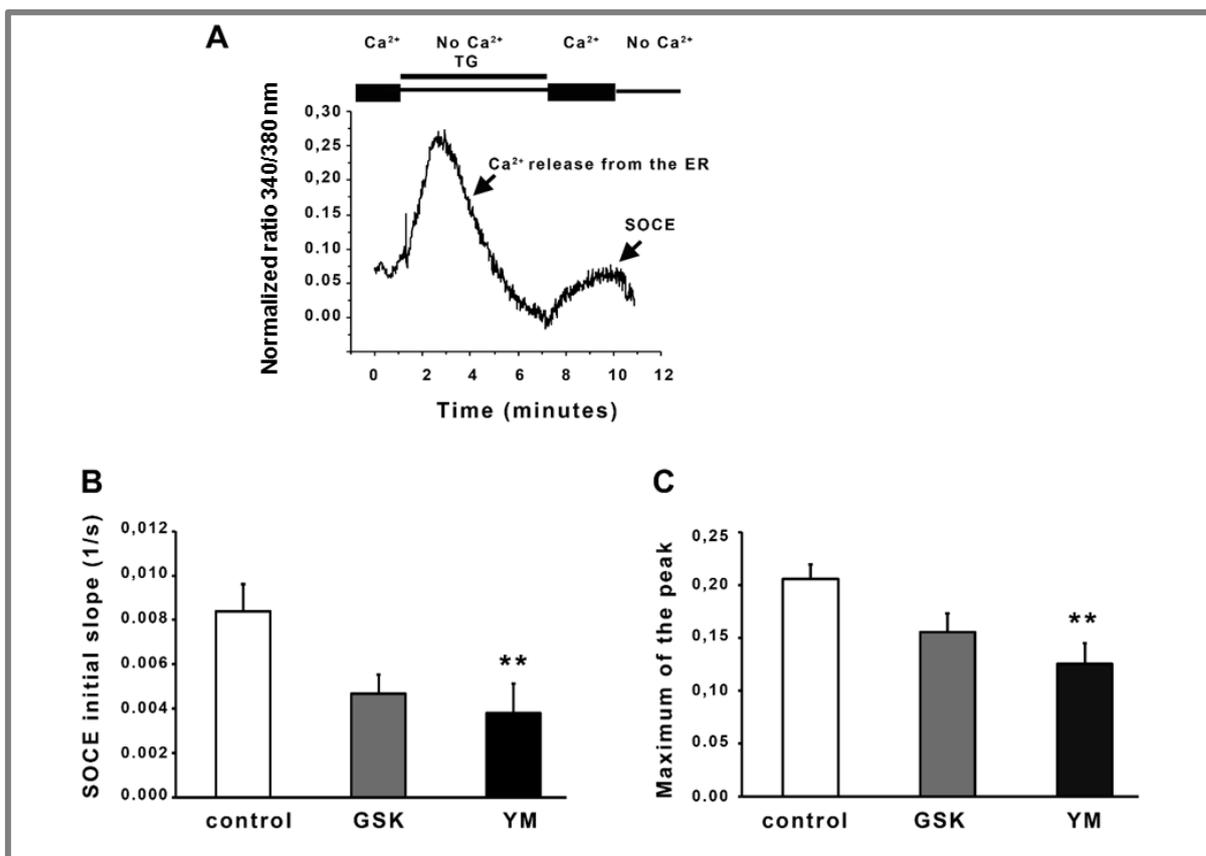


Figure 14 : Les CSN de l'area postrema sont capables de générer un SOCE.

A : Un tracé SOCE représentatif. Les cellules chargées en Fura-2 ont été placées dans une solution à zéro calcium avec 4 μ M de thapsigargine qui a provoqué la libération des réserves calciques du réticulum endoplasmique (premier pic). Le remplacement de la solution zéro calcium par une solution à 1,8 mM de calcium induit un influx calcique par les SOC (deuxième pic).

*B/C : Graphes représentant la moyenne des pentes à l'origine (B) et la moyenne des maximums du deuxième pic (C). Le SOCE a été enregistré avec l'addition de DMSO pour la condition contrôle (control) ou l'ajout de GSK-7975A 5 μ M ou de YM-58483 1 μ M. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm s.e.m et ont été obtenu avec l'enregistrement d'au minimum 20 cellules différentes par condition pour la condition DMSO et YM-58483. **: $P < 0.01$ (B. $P=0,0019$, C. $P=0,0031$). Pour la condition GSK-7975A, nous n'avons pour l'instant pu enregistrer que 12 cellules.*

L'équipe du Pr Moyses a par la suite montré que l'inhibition pharmacologique des SOC réduisait la prolifération ainsi que l'autorenouvellement des CSN de l'*area postrema* comme nous l'avions observé dans les CSN de la SVZ.

L'*area postrema* est un centre de régulation majeur de l'homéostasie énergétique et une cible centrale de la leptine, une hormone libérée principalement par les adipocytes et impliquée dans la satiété et le stockage des graisses (pour revue : (Kelesidis et al., 2010)). Cette hormone est connue pour réguler l'influx calcique dans des neurones (Morrison, 2009; Shanley et al., 2001), ce qui nous a amené à rechercher son potentiel impact sur le SOCE.

La préincubation des cellules avec une concentration physiologique de leptine (6,25 nM) entraîne une diminution du SOCE, tant sa pente que son maximum (Figure 15A). Par ailleurs, les CSN issues de l'*area postrema* de souris transgéniques invalidées pour le gène codant le récepteur à la leptine (souris obèse), présentent un SOCE plus élevé que les souris sauvages (Figure 15B). Ces données ne sont pas significatives à cause du faible échantillonnage enregistré à ce stade de nos travaux.

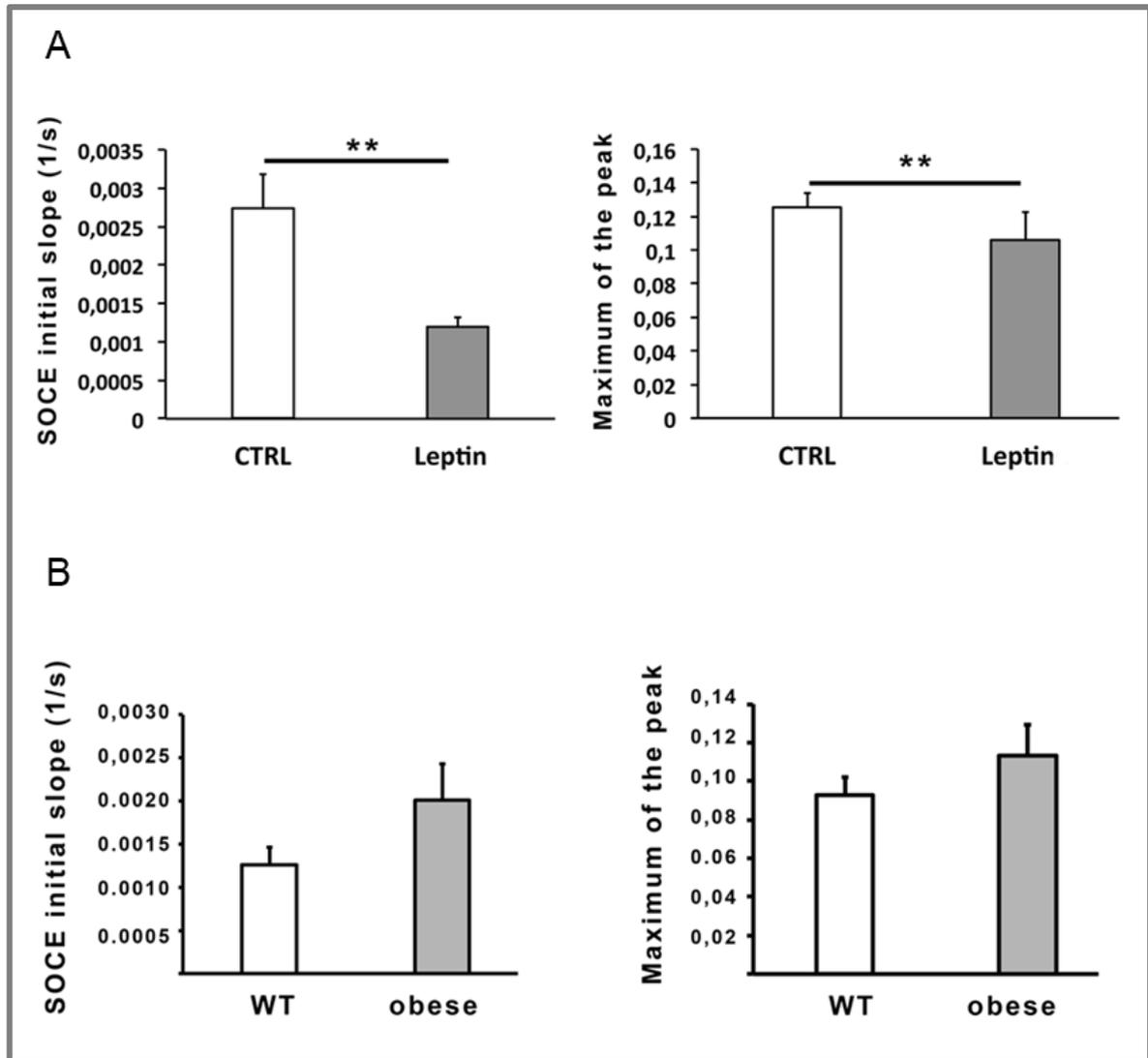


Figure 15 : La leptine induit une diminution du SOCE dans les CSN de l'area postrema.

A : L'ajout de leptine à 6.25 nM, 30 minutes avant l'enregistrement, entraîne une diminution significative de la pente et du max du SOCE. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm s.e.m et ont été obtenus avec l'enregistrement d'au minimum 30 cellules différentes par condition. **: $P < 0.01$ (slope. $P=0,0011$, max $P=0,0083$).

B : Les souris déficientes pour le récepteur de la leptine (obese) ont un SOCE plus important que les souris sauvages (WT). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm s.e.m et ont été obtenus avec l'enregistrement de 9 (WT) et 13 (obese) cellules différentes.

Parallèlement à ces données, l'équipe du Pr Moyses a montré que la leptine induit une diminution de l'autorenouvellement des CSN de l'*area postrema*.

En conclusion, les résultats de cet article établissent que les CSN de l'*area postrema* expriment des SOC fonctionnels qui contrôlent la prolifération et l'autorenouvellement de ces cellules, tout comme dans les CSN de la SVZ. De plus, nos résultats démontrent que la leptine, une hormone dérivée des adipocytes dont l'activité sur l'homéostasie énergétique dépend de l'*area postrema*, diminue le SOCE et réduit l'autorenouvellement des CSN de l'*area postrema*. Nos données suggèrent que les canaux SOC peuvent être recrutés par un signal physiologique, la leptine, pour adapter l'activité de la population de cellules souches aux besoins de l'organisme.

Bibliographie SOC et CSN de l'*area postrema*

Charrier, C., Coronas, V., Fombonne, J., Roger, M., Jean, A., Krantic, S., and Moyses, E. (2006). Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat by in vivo proliferation labeling and in vitro neurosphere assay. *Neuroscience* 138, 5–16.

Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S., and Mantzoros, C.S. (2010). Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Ann. Intern. Med.* 152, 93–100.

Morrison, C.D. (2009). Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1792, 401–408.

Moyse, E., Bauer, S., Charrier, C., Coronas, V., Krantic, S., and Jean, A. (2006). Neurogenesis and neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brain: New vistas about autonomic regulations—a review. *Auton. Neurosci.* 126–127, 50–58.

Shanley, L.J., Irving, A.J., and Harvey, J. (2001). Leptin Enhances NMDA Receptor Function and Modulates Hippocampal Synaptic Plasticity. *J. Neurosci.* 21, RC186.

Partie II : Rôle de la signalisation calcique passant par les canaux store-operated dans les cellules souches de glioblastomes

Article 2 en préparation : Store-operated calcium channels control proliferation and self-renewal of cancer stem cells from glioblastoma

Les gliomes sont des tumeurs primaires du cerveau dont la forme la plus agressive et la plus létale est le glioblastome. Malgré les traitements de cette pathologie, plus de 90 % des patients présentent des récurrences de la tumeur et l'espérance de vie moyenne n'excède pas 15 mois. Une sous-population de cellules retrouvée au sein des tumeurs de glioblastomes, les cellules souches de glioblastomes (CSG), sont très résistantes aux traitements et sont par conséquent, suspectées d'être à l'origine des rechutes observées chez la plupart des patients.

Des analyses transcriptomiques de GBM ont suggéré un rôle majeur de la signalisation calcique dans ce cancer. Parmi les éléments assurant cette signalisation intracellulaire, les Store-Operated Channels (SOC) sont des canaux calciques constituant une des voies d'entrée majeure du calcium dans la cellule. Activés par de nombreux signaux du microenvironnement, les SOC sont souvent modifiés en expression ou activité ce qui favorise la progression tumorale. Nous avons de plus montré que les entrées calciques dépendante des SOC régulent les cellules souches neurales, les cellules suspectées d'être à l'origine des CSG. Ces données nous ont donc conduit à explorer l'expression et les rôles des SOC dans les CSG.

Nous avons montré dans 5 cultures primaires de CSG issues de GBM provenant de 5 patients différents, une expression des SOC, Orai1 et TRPC1, ainsi que de leur activateur STIM1. L'imagerie calcique nous a permis de confirmer que ces canaux sont fonctionnels dans ces cellules. L'inhibition pharmacologique de l'entrée calcique dépendante des SOC entraîne une diminution de la prolifération ainsi que de l'autorenouvellement des CSG et induit une diminution de l'expression du marqueur de pluripotence SOX2.

Nos travaux montrant la capacité des inhibiteurs des SOC à altérer l'autorenouvellement des CSG, une caractéristique essentielle au maintien de leur stock, ouvrent une piste thérapeutique dans la lutte contre les cellules à l'origine des rechutes de la tumeur.

Article 2

**Store-operated calcium channels
control proliferation and self-renewal
of cancer stem cells from glioblastoma**

Article en préparation

Title: Store-operated calcium channels control proliferation and self-renewal of cancer stem cells from glioblastoma

Running head: SOCE and glioblastoma stem cells

Authors: Elodie TERRIÉ¹, Nadine DELIOT¹, Yassine BENZIDANE¹, Thomas HARNOIS¹, Laëtitia COUSIN¹, Patrick BOIS², Lisa OLIVER³, Patricia ARNAULT¹, François VALLETTE^{3,4}, Bruno CONSTANTIN^{1,4}, Valérie CORONAS^{1,4}.

Institutions:

1. University of Poitiers, CNRS ERL 7003, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, 86073 Poitiers cedex 09, FRANCE.
2. University of Poitiers, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, 86073 Poitiers cedex 09, FRANCE.
3. CRCINA- UMR Inserm 892-CNRS 6299-Université de Nantes, 44007 Nantes Cedex 01, FRANCE.
4. CNRS GDR Micronit 3697, FRANCE.

Author contribution:

Elodie Terrié: Collection, assembly, analysis and interpretation of data on calcium imaging, self-renewal and limit dilution assays, cell death assay, western blot, manuscript writing.

Nadine Deliot: Collection, assembly, analysis and interpretation of calcium imaging data, manuscript writing. **Yassine Benzidane:** Collection, assembly and interpretation of patch-clamp experiments, manuscript writing.

Thomas Harnois: Design, analysis and interpretation of Western blot data. **Laetitia Cousin:** Collection and assembly of cell proliferation data.

Patrick Bois: Analysis and interpretation of patch-clamp data, manuscript writing. **Lisa**

Oliver: Production of glioblastoma cancer stem cells derived from patients, manuscript writing. **Patricia Arnault:** Collection, assembly, analysis and interpretation of data on cell differentiation and immunostaining, manuscript writing.

François Vallette: Production of glioblastoma cancer stem cells derived from patients, analysis and interpretation of data, manuscript writing.

Bruno Constantin: Conception and design, collection, assembly, analysis and interpretation of calcium imaging data, manuscript writing. **Valérie Coronas:** Conception and design, financial support, collection, assembly, analysis and interpretation of data,

manuscript writing. **All the authors have approved the manuscript.**

Corresponding Author: Prof Valérie Coronas (PhD), University of Poitiers, CNRS ERL 7003, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Bat B36, 1 rue Georges Bonnet- TSA 51 106, 86073 Poitiers cedex 09, FRANCE

valerie.coronas@univ-poitiers.fr,

tel: 33 (0)5 49 45 36 55; fax: 33 (0)5 49 45 40 14

Grants acknowledgements: This work was supported by La Ligue Contre le Cancer Grand Ouest Comités de la Vienne et des Deux-Sèvres, and by Calscreen project from FEDER HaBisan program. E. Terrié holds a Ph.D. fellowship from Région Nouvelle-Aquitaine.

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and deadliest form of primary brain tumors. Despite multimodal treatment, GBM remains an incurable tumor with a median survival of only 15 months with 90 % of patients experiencing tumor relapse. GBM is a heterogeneous tumor that is composed of tumor cells and a small subpopulation of cells, called cancer stem cells (CSC) that are highly resistant to treatment and may therefore be responsible for tumor relapse. Transcriptomic analysis underlined an enrichment of calcium signaling transcripts in CSC from GBM. Being one of the major ways of calcium influx into the cell, Store-Operated Channels (SOC) are mobilized in response to a wide range of extracellular factors. Since these channels regulate self-renewal of neural stem cells, the cells considered as the cell of origin of CSC from GBM, and because SOC are often hijacked in cancers to promote tumor progression, we analyzed the expression and roles of SOC in CSC from five different primary CSC cultures derived from patient tumors. Immunoblotting and immunocytochemistry experiments show that CSC from GBM express Orai1 and TRPC1, two core proteins of SOC, along with their activator STIM1. Calcium imaging demonstrated that SOC are functional in CSC. Pharmacological inhibition of SOC dependent calcium entries decreases proliferation, impairs self-renewal and reduces expression of pluripotency proteins of CSC from GBM. Our data showing the ability of SOC inhibitors to impede CSC self-renewal pave the way for a strategy to target the cells considered as responsible for conveying GBM resistance to treatment and tumor relapse.

Introduction

Glioblastoma (GBM) is the most frequent and lethal of malignant primary brain tumors in adults. The current standard care of patients includes maximal tumor resection followed by radiotherapy with concomitant chemotherapy with temozolomide. Despite this multimodal treatment, recurrence of the tumor occurs in more than 90 % of patients and the average life expectancy does not exceed 15 months (Stupp et al., 2005). In addition to being highly infiltrative, GBM exhibit complex cellular and molecular heterogeneity, both between patients and within individual tumors, which represents a major hinder for an effective treatment and leads to nearly systematic recurrence. In an effort to facilitate the development of more effective therapies, large-scale molecular studies classified GBM in three major subtypes according to their molecular profiles associated with prognostic values: the mesenchymal, pro-neural/neural, and proliferative/classical subtypes (Teo et al., 2019; Verhaak et al., 2010). Pro-neural is the most favorable subtype for patients compared to the mesenchymal and classical subtypes (Phillips et al., 2006). At the cellular level, the poor response of GBM to treatment as well as tumor relapse has been ascribed to the persistence of a rare population of cells that are similar to stem cells and that have therefore been called “cancer stem cells” (CSC). Resistant to the current treatments, CSC possess self-renewal capacities and can rebuild the large spectrum of cells that form the tumor. Accordingly, complete recovery from GBM would require eradication of these tumor-initiating and -propagating cells (Singh et al., 2004).

Transcriptomic analysis identified an enrichment of Ca^{2+} signaling genes in GBM cells displaying stem cells characteristics, suggesting a crucial role of calcium signaling in these CSC (Wee et al., 2014). Calcium ion (Ca^{2+}) is a ubiquitous second messenger whose variations of its cytosolic concentration regulate a wide range of cellular processes including proliferation, migration or cell death (Berridge et al., 2003). Numerous extracellular signals from the

microenvironment induce Ca^{2+} responses by promoting Ca^{2+} release from the internal stores and/or Ca^{2+} influx from the extracellular environment. In non-excitabile cells, store-operated channels (SOC) are the predominant pathway for Ca^{2+} entry. SOC are formed of Orai and TRPC proteins- mainly Orai1 and TRPC1 (Transient Receptor Potential Canonical 1). They are activated by STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1), the Ca^{2+} sensor from the endoplasmic reticulum (ER) (Parekh and Putney, 2005); Supplementary Figure 1). Stimulation of diverse plasma membrane receptors such as G-protein-coupled receptors activates phospholipase C that, in turn, hydrolyzes phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) into diacylglycerol (DAG) and inositol trisphosphate (IP3). IP3 binds to IP3 receptor on ER membrane and induces Ca^{2+} release from the stores into the cytosol. Sensing a drop in ER Ca^{2+} levels, STIM1 undergoes conformational changes and opens SOC, triggering a Ca^{2+} influx from the extracellular space into the cell cytosol, that is essential both for the cell to replenish the Ca^{2+} content in the ER and for signal transduction (Parekh and Putney, 2005).

Transcriptomic analysis of biopsies from patients suffering from GBM revealed an overexpression of SOC (TRPC1, Orai1) and their ER activator STIM1. Furthermore studies on commercial GBM cell lines showed that SOC promotes proliferation and invasion (Alptekin et al., 2015; Bomben et al., 2011; Liu et al., 2011; Motiani et al., 2013; Scrideli et al., 2008) although some possible controversy persists (Liu et al., 2018). Yet, there are no studies addressing the possible role of SOC in CSC population of GBM, the subset of cells considered as responsible for resistance to cancer treatment and tumor relapse. Because our previous work demonstrated that SOC regulate self-renewal of neural stem cells, the cells that share properties with- and that represent a possible cell of origin for- CSC (Domenichini et al., 2018), we set-up the present study to examine the role of SOC in CSC from GBM.

Material and methods

Solutions and chemicals. SKF-96365 and YM-58483 (BTP2) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA) and dissolved in water and DMSO respectively. GSK-7975A was purchased from AOBIIOUS and dissolved in DMSO. Cell culture media and growth factors were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

CSC cell culture. Primary GBM cultures were derived from patients (Oizel et al., 2017) and grown in defined medium (DMEM/HAM-F12, 2 mmol.l⁻¹ glutamine, N2 and B27 supplement, 2 µg.ml⁻¹ heparin, 20 ng.ml⁻¹ EGF and 25 ng.ml⁻¹ bFGF, 100 U.ml⁻¹ penicillin and 100 µg.ml⁻¹ streptomycin). These conditions allowed development of spheres that were collected, dissociated, and reseeded every week. All experiments were performed with cells that were subjected to less than 10 passages.

Immunoblotting. For western blotting analysis, 10⁶ cells were lysed in Laemmli loading buffer (Sigma Aldrich). Cell lysates were separated by SDS-PAGE using 9% Bis-Tris polyacrylamide gels. Proteins were transferred to Amersham Protran nitrocellulose membranes (0.20 µm-pore size; GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Immunoblots were probed overnight at 4°C in TBSTween (100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, 150 mmol.l⁻¹ NaCl and 0.1% Tween-20, pH 7.6) with 3% fat milk with one of the antibodies listed in supplementary table 1. Membranes were washed and incubated for 1 h at 4°C with anti-rabbit or anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:5000, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). After rinsing with TBS-Tween, the membranes were revealed with ECL chemiluminescent substrate (Immobilon, Millipore, Billerica, MA, USA). Results were analyzed with GeneGnome XRQ (SYNGENE Ozyme, Cambridge, UK). Quantification was performed using GeneTools from syngene.

Immunostaining. For immunostaining, GBM spheres were thrown on coverslips with a cytospin and fixed in methanol at -20°C for 10 min. After permeabilization and blockade of non-specific binding sites, the preparations were stained using one of the antibodies listed in Supplementary Table 1 and then incubated with the appropriate Alexa fluor 555 or Alexa fluor 488 conjugated antibodies before analysis with a spectral confocal FV-1000 station installed on an inverted microscope IX-81 (Olympus). DAPI was used to label nuclei. The emitted fluorescence was detected through spectral detection channels between 425-475 nm, 500-530 nm and 550-625 nm, for UV, green and red fluorescence respectively and through a 650 nm long pass filter for far red fluorescence.

Intracellular calcium measurements. Cells were plated at 75000 to 125000 cells.ml⁻¹ on glass coverslips coated with fibronectin. After 2 hours, the cells were incubated for 30 minutes at 37°C with 6 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ of the ratiometric calcium sensitive probe Fura-2-AM (Santa Cruz Biotechnology). Assays were performed in a standard external buffer solution (130 mmol.l⁻¹ NaCl, 5.4 mmol.l⁻¹ KCl, 0.8 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 10 mmol.l⁻¹ HEPES, 5.6 mmol.l⁻¹ D-glucose, pH 7.4) completed with 1.8 mmol.l⁻¹ Ca²⁺ or 0.1 mmol.l⁻¹ EGTA for the Ca²⁺-free solution. SOCE was triggered with thapsigargin (Sigma Aldrich, 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) or sphingosine-1-phosphate (Sigma Aldrich, 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$). Fluorescence images were recorded using a lambda 421 coupled with an inverted microscope Olympus IX73 and Zyla sCMOS camera 4.2 PLUS. Fluorescence signal was collected at 37°C through the control software Metafluor. Fura-2- AM was excited at 340 nm and 380 nm and the emitted fluorescence was detected at 505 nm. The ratio 340/380 of fluorescence emission was measured over time in selected regions of interest (ROI) on several cells, normalized to basal fluorescence obtained before stimulation.

Cell proliferation assays. Cell proliferation was evaluated by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in DNA using an ELISA assay. GBM spheres dissociated as single cells were

plated at the concentration of 30000 cells.ml⁻¹ in polylysine-coated 96 well plates and treated for 24 hours with SKF-96365, YM-58483, GSK-7975A or DMSO. BrdU was added to the medium for the last 4 hours of the assay before quantification of BrdU incorporated in DNA according to manufacturer's instructions (Roche diagnostics, Meylan, France).

Cell death assessment. Cell death was evaluated using the staining markers Calcein-AM and Ethidium homodimer-1 (EthD-1) for living and dead cells respectively (Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA)). GBM spheres were dissociated, seeded in a 96 well-plate at 10000, 5000 or 2000 cells per well and treated with the SOC inhibitors for 24 hours, 72 hours or 7 days. At the end of the treatment period, cells were stained with 3.10⁻⁶ mol.l⁻¹ Calcein-AM and 1.10⁻⁵ mol.l⁻¹ EthD-1. Fluorescences were read separately using FleXstation: for Calcein-AM excitation was at 485 nm and emission at 530 nm and for EthD-1, excitation was at 530 nm and emission at 645 nm.

Sphere forming and self-renewal assays. GBM spheres were dissociated and seeded at 1000 cells per well in 24 well plates in the cell culture medium alone or supplemented with either SKF-96365 (3 μmol.l⁻¹), YM-58483 (10 μmol.l⁻¹), GSK-7975A (20 μmol.l⁻¹) or DMSO (the dilution buffer of the drugs, used as control). After a 7-day incubation period, primary spheres were counted under the microscope. For self-renewal assays, spheres were collected, centrifuged and reseeded at 1000 cells per well in the culture medium to obtain secondary spheres.

Limit dilution assays. Limit dilution assays were performed as previously described (Tropepe et al., 1999). GBM spheres were dissociated and seeded in 200 μl of culture medium at decreasing concentrations (from 400 to 1 cell per well) into 96-well plate. After 7 days, the number of wells without spheres were counted and plotted against the number of cells plated

per well. Based upon a Poisson distribution of cells, the frequency of CSC corresponds to the number of cells where 37% of wells are empty (Tropepe et al., 1999).

Pluripotency assay. GBM spheres dissociated as single cell were treated for 7 days with 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ YM-58483 or 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSK-7975A or their solvent used as control (DMSO). After this period, immunoblotting was realized as described above.

Statistics. Statistics were performed using GraphPad prism. Mann & Whitney tests were used for 2 by 2 comparison and ANOVA for proliferation assay. Statistical significance level was set for p values <0.05 and represented on the figures by: * for $p<0.05$, ** for $p<0.01$, *** for $p<0.001$.

Results

Cancer stem cells derived from patient glioblastoma express functional SOC

The study was performed on five different CSC cultures derived from patient tumors. All CSC cultures expressed the stem cell marker SOX2. GBM1, GBM2 and GBM3 that display a mesenchymal phenotype were in addition, positive for CD44 whereas GBM4 and GBM5 expressed CD133, as expected for non-mesenchymal GBM cells (Figure 1 B and supplementary Figure 2).

Store-operated calcium entries rely on the presence of SOC, mainly formed of Orai1 and TRPC1, and on their ER activator STIM1. To investigate if CSC from GBM cells possess functional SOC, we analyzed on these cells grown as spheres the presence of TRPC1, Orai1 and STIM1. Western blot analysis showed that all cultures expressed Orai1, TRPC1 and STIM1 (Figure 1A). Immunostainings of CSC cultures confirmed the expression of these SOC actors and showed that Orai1 and TRPC1 labeling can be found at the plasma membrane in SOX2 expressing CSC, whereas STIM1 staining is intracellular and often displays a punctuated form that is characteristic of localization within the endoplasmic reticulum (ER) (Figure 1B).

The ability of SOC to sustain a store-operated Ca^{2+} entry was next assessed through Ca^{2+} imaging with the ratiometric probe Fura-2 that can go through the plasma membrane and bind to free cytosolic Ca^{2+} . Thapsigargin, an irreversible inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase (SERCA), was used to induce Ca^{2+} store depletion in the ER. Figure 2A illustrates that CSC from GBM respond to thapsigargin by an increase of cytosolic Ca^{2+} concentration corresponding to Ca^{2+} release from the ER, due to inhibition of Ca^{2+} reuptake by SERCA and to a basal leak of Ca^{2+} release from ER. This passive store depletion is known to activate SOC. Although these channels open a few tenths of second after this Ca^{2+} drop in the ER, no Ca^{2+} entry can occur as long as cells are maintained in a Ca^{2+} -free buffer solution. Figure

2A shows that addition of Ca^{2+} to the extracellular medium triggers a Ca^{2+} influx in CSC from GBM (second peak, SOCE: calcium entry through SOC). To quantify SOCE, we focused on initial Ca^{2+} influx rates, through measurement of initial slopes that are typical from SOCE (figure 2B) while the maximal values are determined by both Ca^{2+} entry through SOC and mechanisms that extrude Ca^{2+} from cells (figure 2C). Results reported in Figure 2B-C show that all CSC cultures display SOCE although with variable amplitude. In addition, we used YM-58483 (1 or 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) or GSK-7975A (1 or 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) to block SOCE. Figure 2B and C reports that both YM-58483 and GSK-7975A substantially diminish SOCE, demonstrating that SOC expressed by CSC from GBM support Ca^{2+} entries.

Physiologically, SOC activation mainly occurs after activation of receptor coupled with PLC leading to the formation of IP3 that interacts with its receptor and promotes Ca^{2+} release from the ER (Supplementary Figure 1). Figure 2D depicts that sphingosine-1-phosphate (S1P), a molecule that induces the production of IP3 and DAG, leads to an increase of intracellular Ca^{2+} concentration. The use of YM-58483 or GSK-7975A significantly diminishes this Ca^{2+} augmentation (Supplementary Figure 3), showing the involvement of SOCE in S1P-triggered Ca^{2+} entry and demonstrating that SOC can be recruited by physiological signals.

Inhibition of SOCE reduces glioblastoma CSC proliferation

First, we assessed the effects of SOC inhibitors on the growth of the CSC culture, using viability assays based on Calcein-AM to detect living cells and Ethidium homodimer-1 (EthD-1) for dead cells. Figures 3A (data in progress) illustrates that SKF-96365, YM-58483 and GSK-7975A did affect neither the number of dead cells, nor that of living cell after 24 hours of treatment. Following three days of treatment, the population of living cells was significantly reduced and the population of dead cells was slightly enhanced for YM-58483 and GSK-7975A

treatments. After a week of treatment, the population of living cells was dramatically reduced while the population of dead cells remained only slightly impacted by SKF-96365 and GSK-7975A treatments (as compared to the positive control of cell death, digitonin). This data led us to evaluate SOCE involvement in glioblastoma CSC proliferative activity. To this aim, GBM cells were subjected to BrdU incorporation assays after 24h of treatment with SKF-96365, YM-58483 or GSK-7975A. Figure 3B shows that all SOC inhibitors dose-dependently reduced CSC proliferation in all GBM cultures with a maximal effect being observed at the concentration of $30 \mu\text{mol.l}^{-1}$ for SKF-96365 and YM-58483, and $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ for GSK-7975A. These results combined with those from viability assays (Figure 3A) showed that inhibition of SOCE leads to a decrease of glioblastoma CSC proliferation.

Inhibition of SOCE reduces glioblastoma CSC self-renewal and promotes their differentiation

CSC are able to form spheres *in vitro* when cultivated in a defined medium containing the growth factors EGF and FGF. To determine if SOC are involved in the ability of CSC to form spheres, we exposed CSC during 7 days to SKF-96365, YM-58483 or GSK-7975A. At the end of this period, the numbers of primary spheres were counted (figure 4A SPHERES I), which reflects the ability of CSC to form spheres. While a CSC is at the origin of a sphere, each sphere is composed of CSC and of more differentiated cells. To quantify the number of CSC in primary spheres that have been exposed to SOC inhibitors and thus have insight into CSC self-renewal ability, we collected the primary spheres obtained under the different conditions, dissociated them, reseeded the cells in fresh culture medium without any SOC inhibitor. After a 7 days period, we determined the number of cells capable of forming new spheres (figure 4A SPHERES II).

For this assay, we chose concentrations of SKF-96365 ($3 \mu\text{mol.l}^{-1}$), YM-58483 ($10 \mu\text{mol.l}^{-1}$) and GSK-7975A ($20 \mu\text{mol.l}^{-1}$) that had only modest effects on proliferation (Fig. 2B). As shown in Figure 4B, all SOC inhibitors decreased the formation of primary spheres and thus substantially restrained stem-like cell activity of CSC. Specifically, whereas SKF-96365 and YM-58483 displayed dramatic effects in nearly all GBM cultures, GSK-7975A, that preferentially targets Orai1 (Derler et al., 2013), exerted less pronounced effects (figure 3B spheres I).

When dissociated and plated without inhibitors, cells dissociated from the primary spheres formed less secondary spheres than their control, indicating that there are less CSC in spheres that had been treated with SOC inhibitors. These data establish that SOC inhibition hampers CSC self-renewal ability.

In order to more accurately quantify the number of CSC resulting from treatment with SOC inhibitors, we performed a limit dilution assay. Based on the ability of CSC to form spheres, this assay allows CSC frequency estimation in cultures. Figure 5 A illustrates that YM-58483 and GSK-7975A reduce CSC frequency in all GBM cultures. The fact that SOX2 expression, a protein signing stemness, is decreased upon treatments with SOC inhibitors (Figure 5B), further confirms a role of SOC in CSC maintenance. This decrease in SOX2 expression induced by pharmacological inhibitors of SOC was accompanied by an increased expression of the differentiation markers neuronal β 3-tubulin or glial GFAP, suggesting that SOC inhibition decreases stemness by inducing CSC differentiation.

Discussion

Using five different cultures from patient derived tumors, we demonstrate that CSC from GBM express SOC proteins that functionally sustain calcium entries. Pharmacological blockade of SOC diminishes proliferation and substantially reduces CSC self-renewal capacities. Thus, our

study identifies a pivotal role of SOC in the maintenance or expansion of CSC pool in GBM. Previous transcriptomic analysis underlined a major role of calcium signaling in these cells (Wee et al., 2014). Our study specifies a calcium entry mechanism involved in stemness maintenance of CSC from GBM.

In our study, we showed that CSC from patient derived tumors express Orai1 and TRPC1 along with STIM1, as do neural stem cells from which CSC can originate (Domenichini et al., 2018; Lee et al., 2018). These data are in accordance with previous transcriptomic analysis reporting an overexpression of STIM1 and TRPC1 in GBM and of Orai1 in CSC from GBM compared to normal tissue (Alptekin et al., 2015; Robil et al., 2015; Scrideli et al., 2008). Using calcium-imaging approaches, we established that SOC are functional within CSC as they are capable to produce a calcium entry after store depletion. In order to determine if SOC identified in CSC from GBM can be recruited by physiological signals, we exposed the cells to sphingosine-1-phosphate, a signal that can recruit PLC and lead to the formation of IP3 that in turn triggers Ca^{2+} release from ER and SOC activation. Our data showed that S1P induces a Ca^{2+} entry that is reduced by use of SOC inhibitors, demonstrating that CSC from GBM possess SOC that can be activated by physiological signals.

To gain insight in their physiopathological role, SOC were inhibited with pharmacological drugs, which resulted in impaired proliferation within the cultures. Such an effect has also been described in GBM cell lines (Li et al., 2013; Liu et al., 2011; Motiani et al., 2013) and in primary cultures of CSC derived from GBM of patients that had been maintained with growth factors and without foetal bovine serum (Aulestia, 2018). In this latter study SOC inhibition with SKF-96365 led to a shift of CSC toward a quiescent state (Aulestia, 2018). Interestingly, primary cultures from patients that had been cultivated in FBS (fetal bovine serum), a culture condition known to induce differentiation of stem cells, were unaffected by SOC inhibitors, suggesting

that SOC may target CSC in the culture (Motiani et al 2013). In line with this hypothesis, our study provides evidence that SOC inhibition activity and impairs self-renewal of glioblastoma CSC, a process that is accompanied by a decrease of stem cell marker expression and a concurrent increase of differentiation markers. Collectively, these data support that SOC play a key role in maintaining the CSC pool in GBM as they do in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma (Lee et al., 2016). Along with a recent study identifying calcium as a guardian of pluripotency in embryonic stem cells (McDougall 2019), our results showing a reduction of stem cell markers expression and self-renewal in CSC exposed to SOC inhibitors, suggest that SOC may represent an essential calcium handling mechanism involved in CSC population maintenance.

Since the identification of CSC in cell cultures of GBM, much progress has been made in characterizing the extracellular signals that influence their proliferation and stemness but the mechanisms involved in signal transduction and integration remain unidentified. Being endowed with a capacity to mobilize long-lasting calcium influx in response to multiple cell surface receptor stimulations, SOC that we found essential for CSC in GBM can be recruited by various extracellular signals as for example, HGF or S1P signaling pathways that are involved regulation of CSC from GBM (Joo et al., 2012; Marfia et al., 2014). Our data, along with previous studies demonstrating a crucial role of SOC in neural stem cells (Domenichini et al., 2018; Somasundaram et al., 2014), the cells that are considered as possible cell of origin of CSC (Alcantara Llaguno et al., 2009; Chen et al., 2012; Jacques et al., 2010; Lee et al., 2018; Marumoto et al., 2009), support that SOC are critical for the adaptation of both neural stem cells and CSC responses to microenvironment signals. It will be interesting to assess in future studies, if the ability of SOC to regulate self-renewal is conserved in other physiological and cancer stem cell populations.

To conclude, our study based on multiple approaches demonstrates that CSC in primary cultures derived from patients with GBM express functional SOC whose pharmacological blockade impairs proliferation as well as self-renewal ability. As CSC are responsible for GBM treatment resistance and as treatment with molecules that target a wide range of calcium channels are tolerated by- and ameliorate survival of- patients with GBM (Omuro et al., 2018), our study will help to nurture the framework for the identification of new therapies against this deadly pathology.

Acknowledgments

We thank Anne Cantereau for her advices with confocal microscopy and Image UP microscopy core facilities. This work was supported by La Ligue Contre le Cancer Grand Ouest Comités de la Vienne et des Deux Sèvres. E. Terrié holds a Ph.D. fellowship from Région Nouvelle-Aquitaine, and by Calscreen project from FEDER HaBisan program.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors indicate no potential conflict of interest.

Figures and their legends

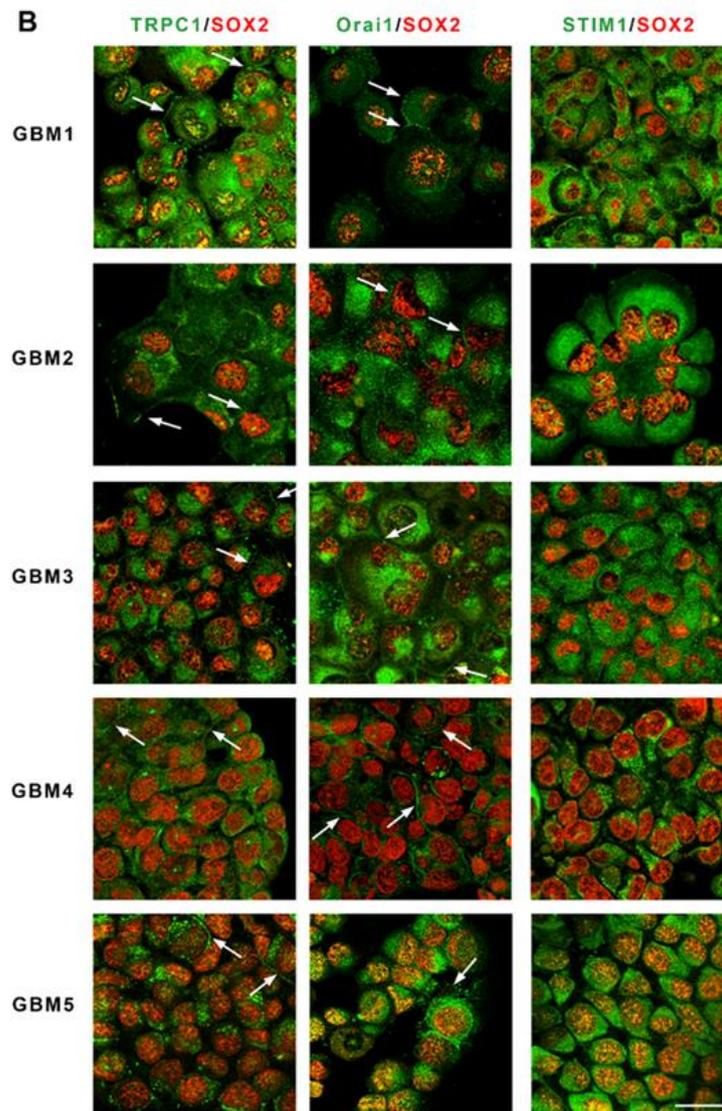
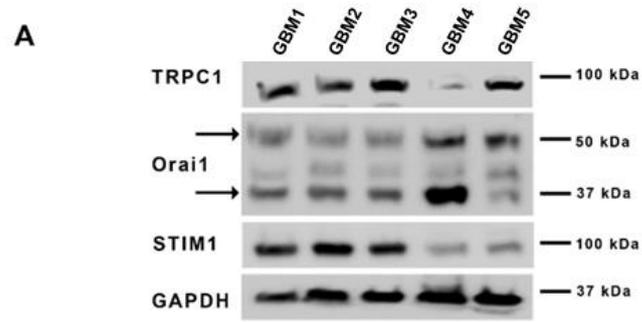


Figure 1: Glioblastoma (GBM) cancer stem cells (CSC) from patients express store-operated channels Orai1 and TRPC1 and their activator STIM1.

A: Immunoblotting of TRPC1, Orai1 and STIM1 proteins from GBM1 to GBM5 primary cultures derived from patient with GBM. Arrows point to the two bands obtained for Orai1 that correspond to the unglycosylated form (33 kDa) or the glycosylated form (50 kDa) of Orai1.

B: Micrographs representing co-labeling of TRPC1, Orai1 or STIM1 (in green) with SOX2 a stem cell marker (in red) in the five GBM cultures. Arrows point to labeling characteristic of membrane localization.

Scale bar: 25 μm . Abbreviations: STIM1, stromal interaction molecule 1; TRPC1, transient receptor potential canonical 1; kDa, kiloDalton

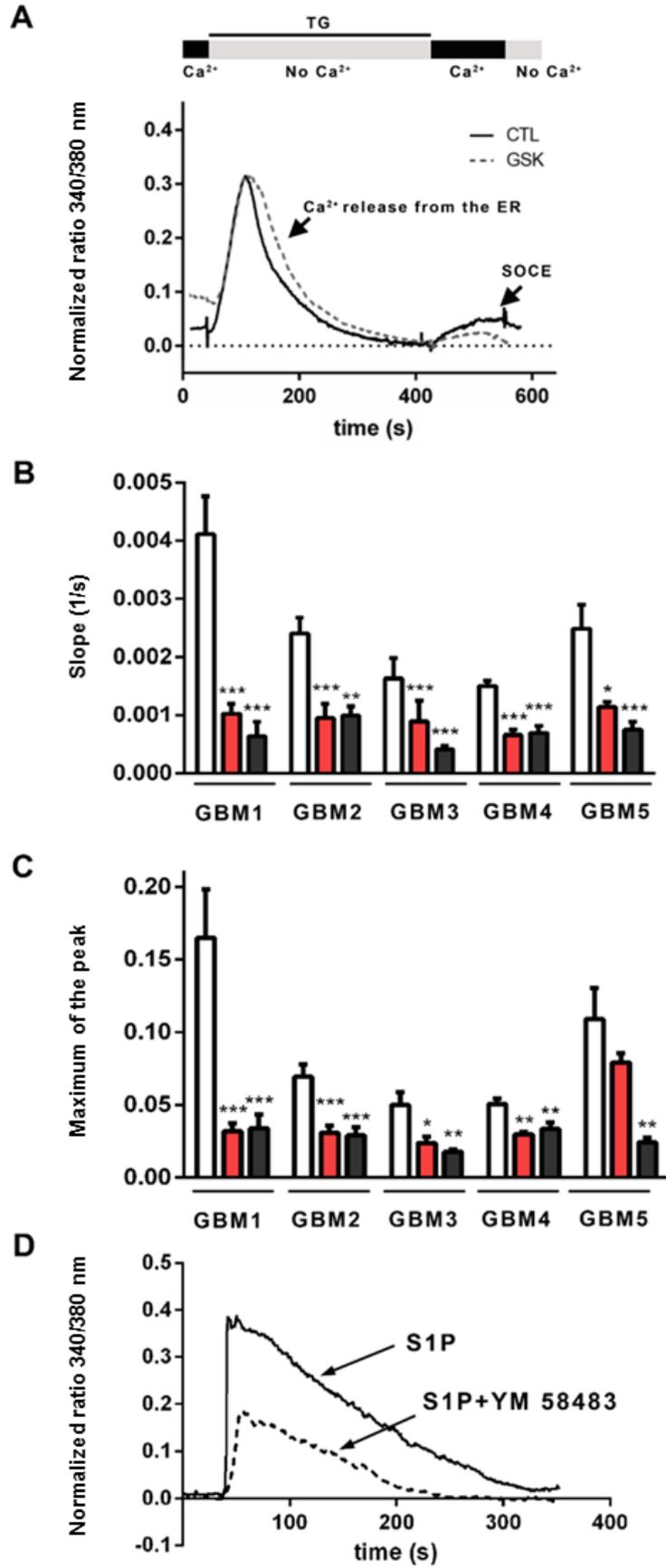


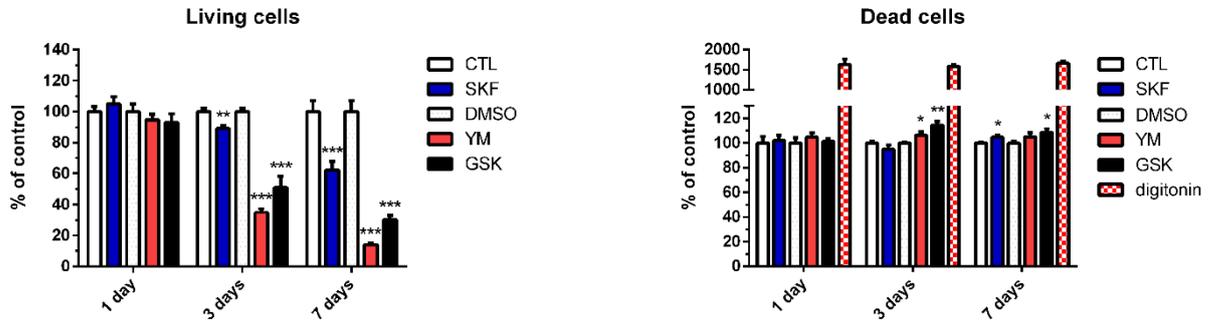
Figure 2: Cancer stem cells from GBM display SOCE.

A: A representative trace of SOCE recording in primary CSC cultures of patient tumors. Cells loaded with Fura-2 were transferred to a zero calcium solution and to $4 \mu\text{mol.l}^{-1}$ thapsigargin leading to the release of calcium from the ER (first peak). Replacement of zero calcium solution by a $1.8 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ physiological buffer induced a calcium entry through SOC (second peak, SOCE).

B, C: Bar graphs representing mean initial slope of the rising phase during the second peak (B) or mean maximum of the second peak (C). SOCE were recorded in control $1.8 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$ or with addition of GSK-7975A (GSK, 1 to $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$, black bars), or YM-58483 (YM, 1 to $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ red bars) or DMSO (white bars). Data represented as means \pm s.e.m were obtained from recordings on at least 20 different cells per condition.

D: A representative trace of response to an agonist sphingosine 1-phosphate (S1P) $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ in the absence (full line) or presence (dashed line) of YM-58483 $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

A



B

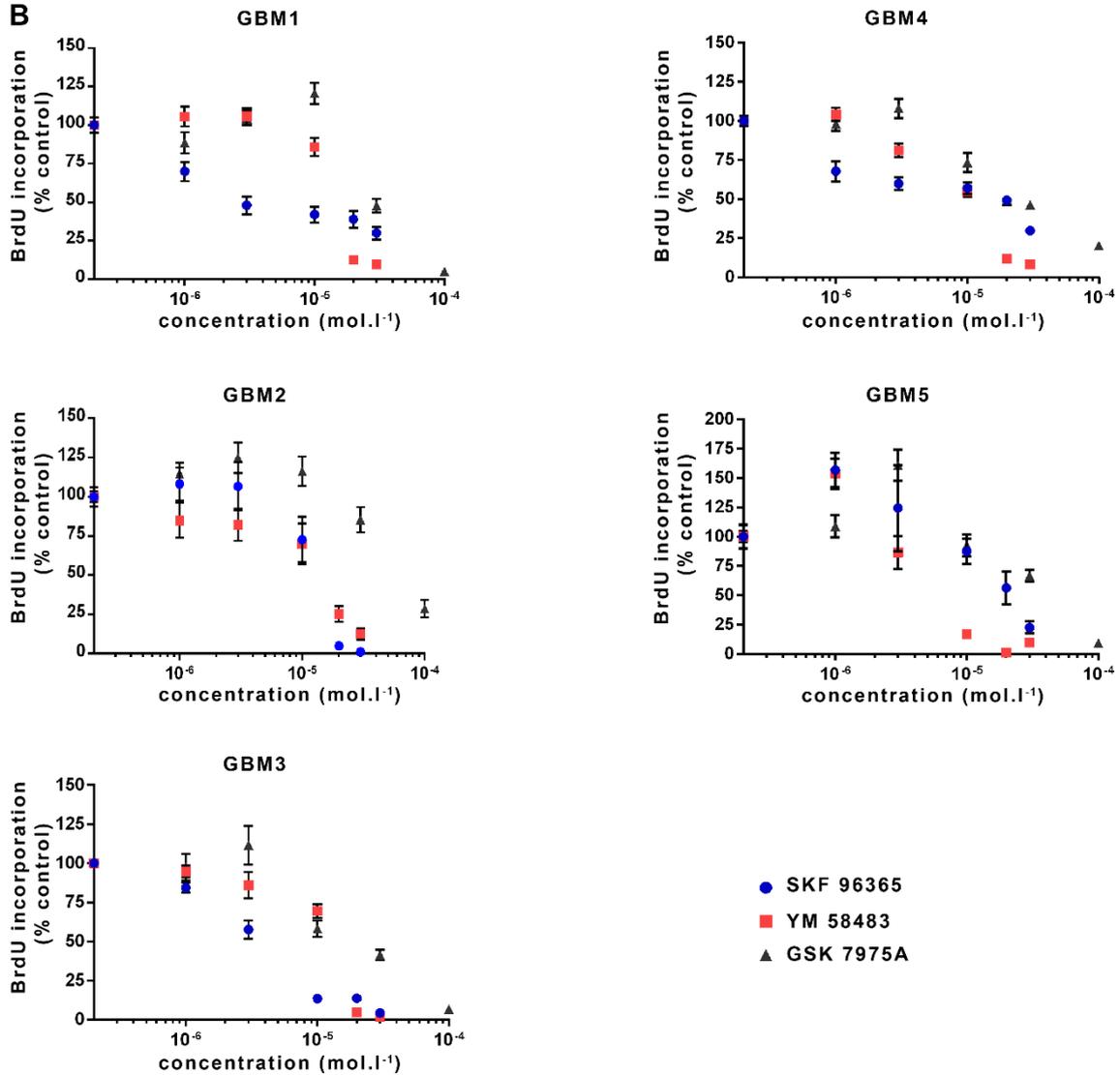


Figure 3: Pharmacological inhibition of SOC inhibits GBM CSC proliferation without affecting cell death.

A: (Data in progress) Live-dead assay on GBM1. Percentage of living (Calcein positive) or dead (Ethidium bromide positive) cells compared to control on cultures maintained 1 day, 3 days or 7 days with 3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ SKF-96365 (blue), 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ YM-58483 (red), 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSK-7975A (black) or their control conditions (CTL for SKF and DMSO for YM and GSK)(white). Digitonin at 5 mmol.l^{-1} was added to the cells during the last hour of the culture as positive control of cell death (red and white squares). Data represent means \pm s.e.m from three independent experiments for 1 day and 7 days and from two for 3 days, each condition being assessed in triplicate per experiment. Living cells **P=0.0056, Dead cells left to right *P=0.0260, **P=0.0022, *P=0.0314, *P=0.0142

B: Percentages of BrdU incorporation in GBM CSC cultures maintained for 24h in increasing concentrations of SKF-96365, YM-58483 or GSK-7975A. Data represent means \pm s.e.m from four independent experiments, each condition being assessed in quadruplicate per experiment. Abbreviations: BrdU, bromodeoxyuridine; DMSO, dimethylsulfoxyde.

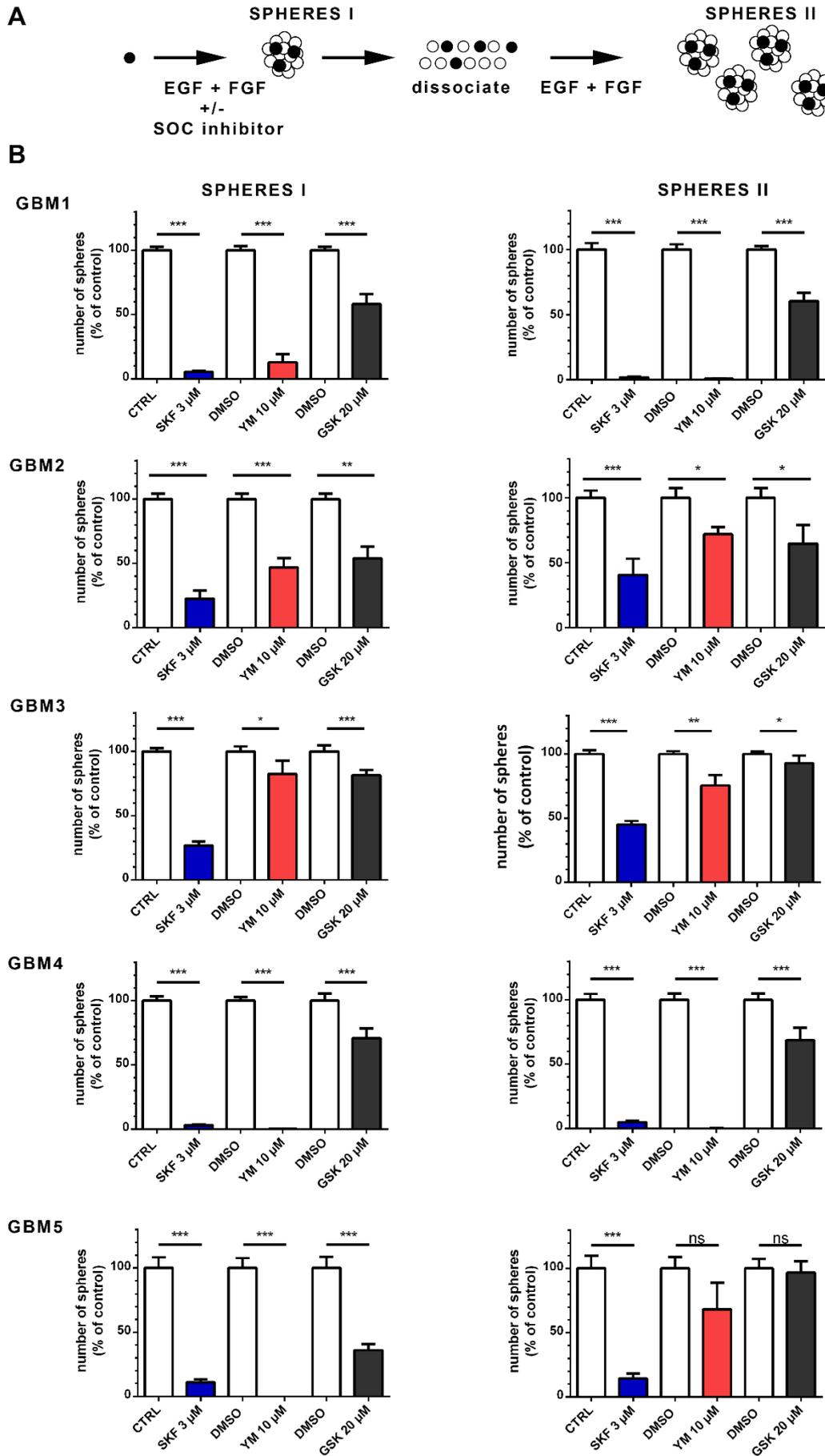
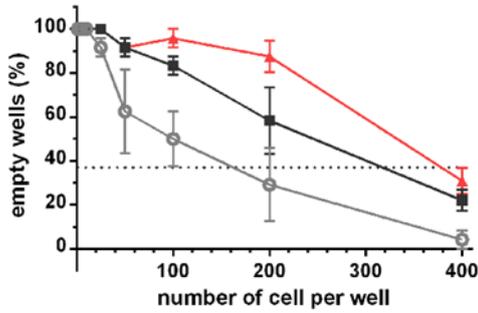


Figure 4: Pharmacological inhibition of SOC impairs GBM CSC ability to form sphere as well as their self-renewal capacities.

A: Scheme of the sphere assay and clonogenicity assay used to obtain data in B.

B: Stem cells are represented as black-colored circles and progenitors as white-colored circles. Numbers of primary spheres (B, SPHERES I) or secondary spheres (B, SPHERES II) obtained following 1 week of culture with either 3 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ SKF-96365, 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ YM-58483 or 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ GSK-7975A. Data are expressed as percent of control and represent means \pm s.e.m from 3 independent experiments, each condition being assessed in triplicate per experiment. GBM2 SPHERES I ** P=0.0014, SPHERES II *P=0.338 for YM and *P=0.0487 for GSK GBM3 SPHERES I *P=0.0267, SPHERES II **P=0.0036 *P=0.0372

A



	CTL	YM-58483	GSK-7975A
GBM1	1/17	< 1/200	1/36
GBM2	1/162	1/379	1/317
GBM3	1/2	1/9	1/4
GBM4	1/6	< 1/200	1/10
GBM5	1/72	< 1/200	1/92

B

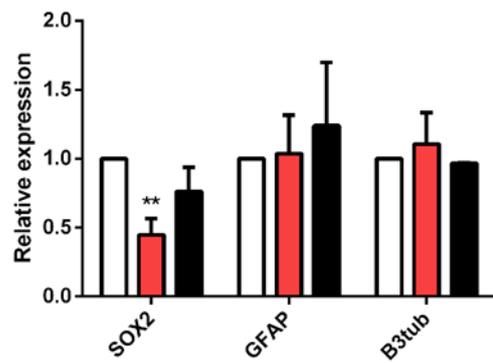
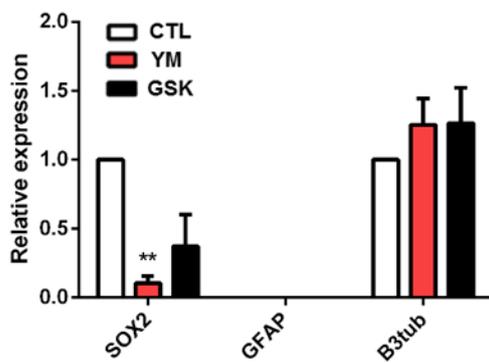
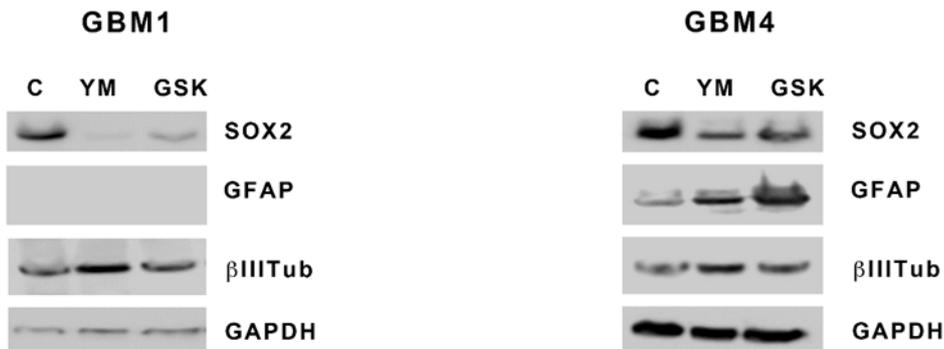


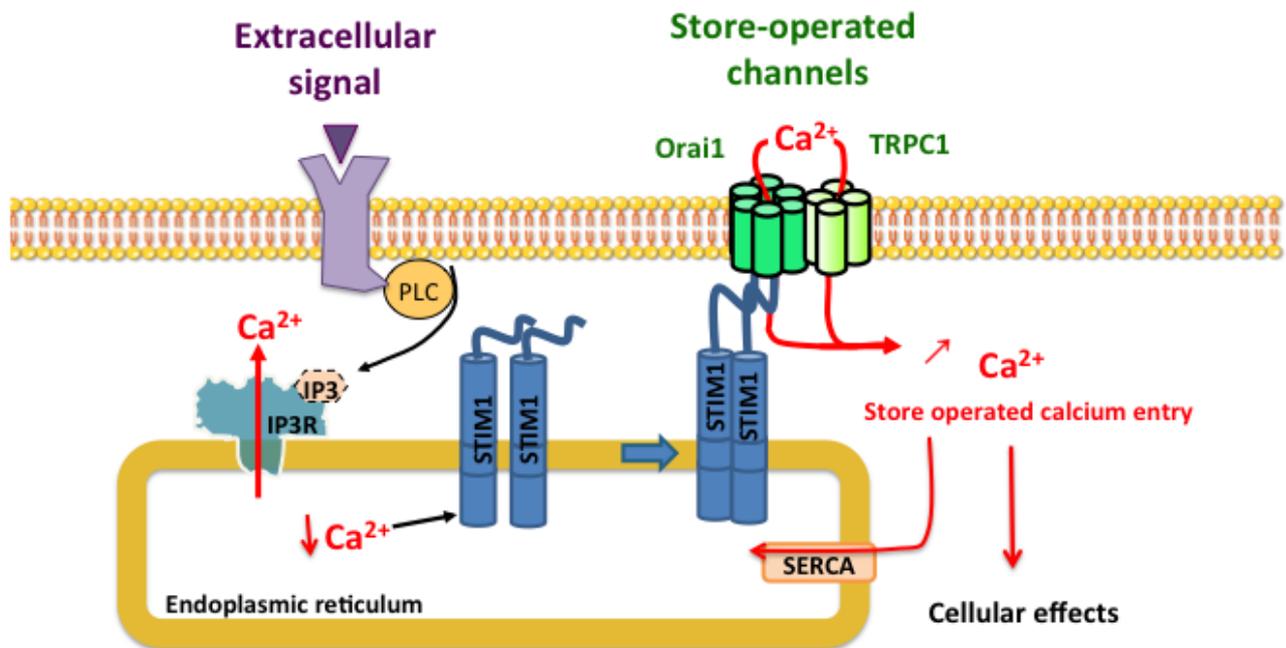
Figure 5: Pharmacological inhibition of SOC diminishes the number of GBM CSC by inducing their differentiation.

A: CSC frequency evaluated by limit dilution assay. The cells were grown in their medium for 7 days with $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ YM-58483, $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ GSK-7975A, or DMSO at concentration of 400 to 1 cell per well. After one week, wells without spheres were counted for each cell density (graph A). According to Poisson law, the number of cells per well where 37% of wells are empty corresponds to CSC frequency (table in A).

B: Quantification of stem cell marker SOX2 and differentiation markers GFAP and β 3-tubulin by immunoblotting on GBM1 and GBM4 cells maintained during 7 days with $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ YM-58483, $20 \mu\text{mol.l}^{-1}$ GSK-7975A, or DMSO. A representative blots and quantifications obtained on 3 experiments are shown. GBM1 ****P=0.0079**, GBM4 ****P=0.0079**

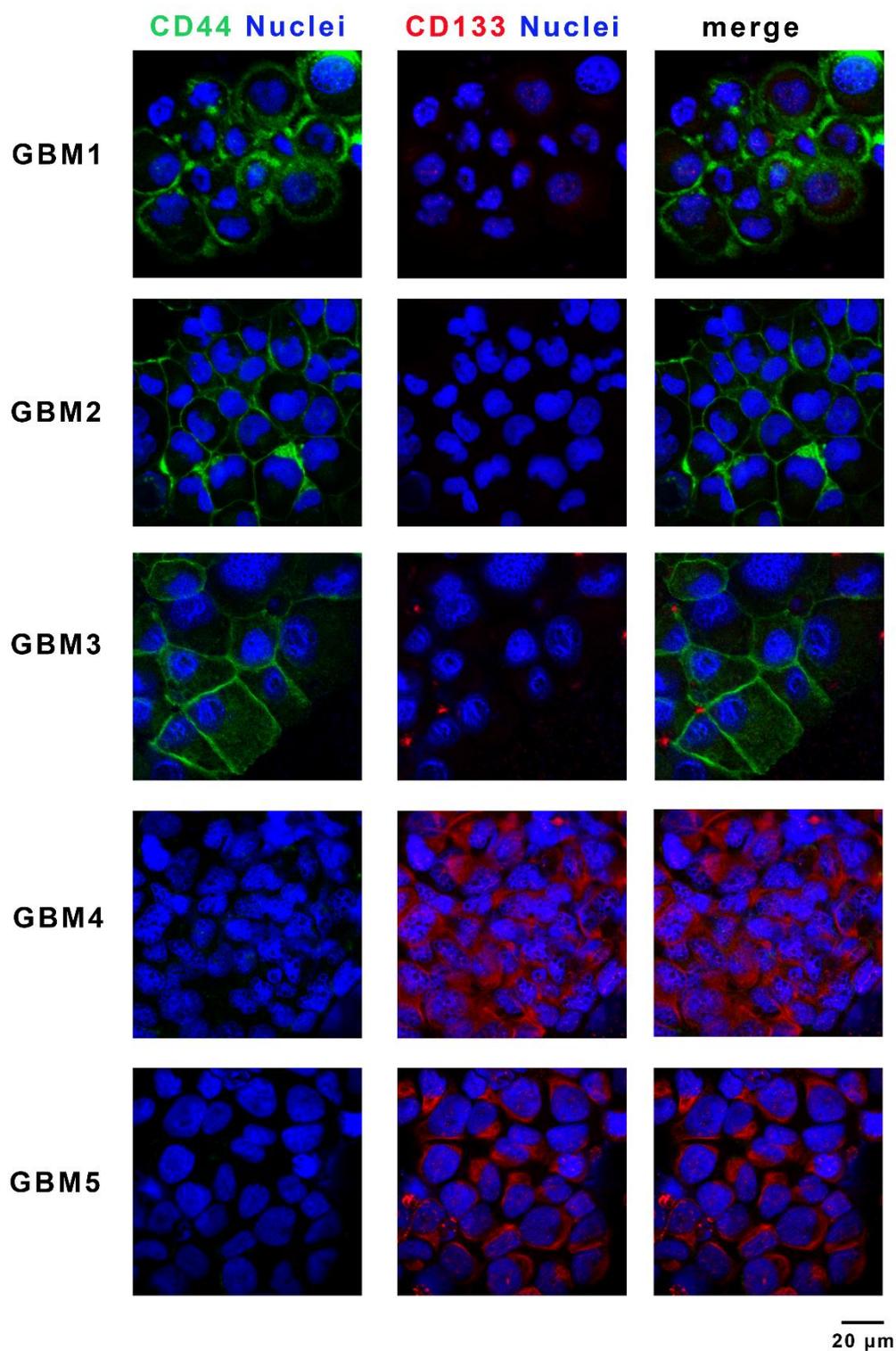
Antigen	Source	Origin	Reference	Dilution	
				WB	IF
TRPC1	Santa Cruz Biotechnology	mouse monoclonal	sc-133076	0.2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
Orai 1	Santa Cruz Biotechnology	rabbit polyclonal	sc-68895	0.2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	0.4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
STIM1	BD Biosciences	mouse monoclonal	610954	0.25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
SOX2	Santa Cruz Biotechnology	mouse monoclonal	sc-365964	0.2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
SOX2	Santa Cruz Biotechnology	goat polyclonal	sc-17320		1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
CD133	Merck Millipore	mouse monoclonal	MAB4399-I		10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
CD44	BD Biosciences	mouse monoclonal conjugated with FITC	347943		1.25 $\mu\text{g.ml}^{-1}$
GFAP	Dako	rabbit polyclonal	ZO334	2.9 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	
β 3tubulin	Sigma Aldrich	mouse monoclonal	T8660	4.6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	
GAPDH	Santa Cruz Biotechnology	mouse monoclonal	sc-32233	0.1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$	

Supplementary Table 1: Primary antibodies used in the study.

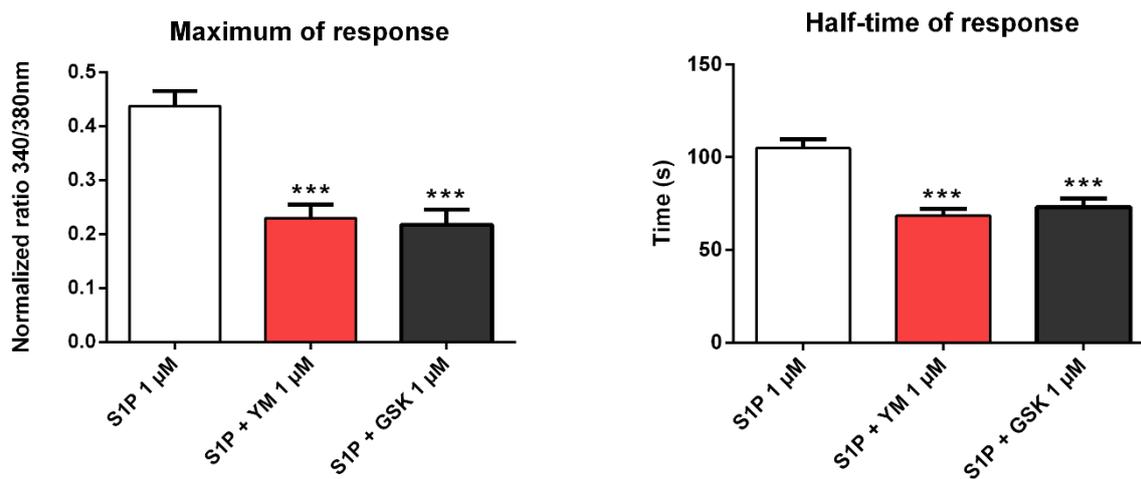


Supplementary Figure 1: Scheme of store-operated channels (SOC) recruitment by signals from the microenvironment

Numerous signals can trigger a transduction cascade that leads to IP₃ production and calcium release from the endoplasmic reticulum (ER). The consecutive reduction of calcium concentration in the ER is sensed by STIM that undergoes oligomerization and then activates SOC to induce a store-operated calcium entry (SOCE). This long-lasting calcium entry allows the refilling of calcium stores *via* the ER calcium pump (SERCA) and activates signaling cascades that trigger cellular effects.



Supplementary Figure 2: Expression of CD44 (green) or CD133 (red) in glioblastoma cancer stem cells used in the study. Nuclei are labelled in blue with TOPRO-3.



Supplementary Figure 3: Parameters of the CSC response to S1P alone or to S1P along with SOC inhibitors (YM or GSK)

Bibliography

Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L.F. (2009). Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell* 15, 45–56.

Alptekin, M., Eroglu, S., Tutar, E., Sencan, S., Geyik, M.A., Ulasli, M., Demiryurek, A.T., and Camci, C. (2015). Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. *Tumor Biol.* 36, 9209–9213.

Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 517–529.

Bomben, V.C., Turner, K.L., Barclay, T.-T.C., and Sontheimer, H. (2011). Transient receptor potential canonical channels are essential for chemotactic migration of human malignant gliomas. *J. Cell. Physiol.* 226, 1879–1888.

Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488, 522–526.

Derler, I., Schindl, R., Fritsch, R., Heftberger, P., Riedl, M.C., Begg, M., House, D., and Romanin, C. (2013). The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium* 53, 139–151.

Domenichini, F., Terrié, E., Arnault, P., Harnois, T., Magaud, C., Bois, P., Constantin, B., and Coronas, V. (2018). Store-Operated Calcium Entries Control Neural Stem Cell Self-Renewal in the Adult Brain Subventricular Zone: SOCE and Neural Stem Cells. *STEM CELLS* 36, 761–774.

Jacques, T.S., Swales, A., Brzozowski, M.J., Henriquez, N.V., Linehan, J.M., Mirzadeh, Z., Malley, C.O., 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.

Joo, K.M., Jin, J., Kim, E., Kim, K.H., Kim, Y., Kang, B.G., Kang, Y.-J., Lathia, J.D., Cheong, K.H., Song, P.H., et al. (2012). MET Signaling Regulates Glioblastoma Stem Cells. *Cancer Res.* 72, 3828–3838.

Lee, J.H., Lee, J.E., Kahng, J.Y., Kim, S.H., Park, J.S., Yoon, S.J., Um, J.-Y., Kim, W.K., Lee, J.-K., Park, J., et al. (2018). Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* 560, 243–247.

Lee, S.H., Rigas, N.K., Lee, C.-R., Bang, A., Srikanth, S., Gwack, Y., Kang, M.K., Kim, R.H., Park, N.-H., and Shin, K.-H. (2016). Orai1 promotes tumor progression by enhancing cancer stemness via NFAT signaling in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7.

- Li, G., Zhang, Z., Wang, R., Ma, W., Yang, Y., Wei, J., and Wei, Y. (2013). Suppression of STIM1 inhibits human glioblastoma cell proliferation and induces G0/G1 phase arrest. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 32, 1.
- Liu, H., Hughes, J.D., Rollins, S., Chen, B., and Perkins, E. (2011). Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* 91, 753–760.
- Liu, Z., Wei, Y., Zhang, L., Yee, P.P., Johnson, M., Zhang, X., Gulley, M., Atkinson, J.M., Trebak, M., Wang, H.-G., et al. (2018). Induction of store-operated calcium entry (SOCE) suppresses glioblastoma growth by inhibiting the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ. *Oncogene.*
- Marfia, G., Campanella, R., Navone, S.E., Di Vito, C., Riccitelli, E., Hadi, L.A., Bornati, A., de Rezende, G., Giussani, P., Tringali, C., et al. (2014). Autocrine/paracrine sphingosine-1-phosphate fuels proliferative and stemness qualities of glioblastoma stem cells: S1P Prompts Growth and Stemness of GSCs. *Glia* 62, 1968–1981.
- Marumoto, T., Tashiro, A., Friedmann-Morvinski, D., Scadeng, M., Soda, Y., Gage, F.H., and Verma, I.M. (2009). Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors. *Nat. Med.* 15, 110–116.
- Motiani, R.K., Hyzinski-García, M.C., Zhang, X., Henkel, M.M., Abdullaev, I.F., Kuo, Y.-H., Matrougui, K., Mongin, A.A., and Trebak, M. (2013). STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 465, 1249–1260.
- Oizel, K., Chauvin, C., Oliver, L., Gratas, C., Geraldo, F., Jarry, U., Scotet, E., Rabe, M., Alves-Guerra, M.-C., Teusan, R., et al. (2017). Efficient Mitochondrial Glutamine Targeting Prevails Over Glioblastoma Metabolic Plasticity. *Clin. Cancer Res.* 23, 6292–6304.
- Omuro, A., Beal, K., McNeill, K., Young, R.J., Thomas, A., Lin, X., Terziev, R., Kaley, T.J., DeAngelis, L.M., Daras, M., et al. (2018). Multicenter Phase IB Trial of Carboxyamidotriazole Orotate and Temozolomide for Recurrent and Newly Diagnosed Glioblastoma and Other Anaplastic Gliomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 36, 1702–1709.
- Parekh, A.B., and Putney, J.W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 85, 757–810.
- 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.
- Robil, N., Petel, F., Kilhoffer, M.-C., and Haiech, J. (2015). Glioblastoma and calcium signaling - analysis of calcium toolbox expression. *Int. J. Dev. Biol.* 59, 407–415.

- Scrideli, C.A., Carlotti, C.G., Okamoto, O.K., Andrade, V.S., Cortez, M.A.A., Motta, F.J.N., Lucio-Eterovic, A.K., Neder, L., Rosemberg, S., Oba-Shinjo, S.M., et al. (2008). Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J. Neurooncol.* 88, 281–291.
- 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.
- Somasundaram, A., Shum, A.K., McBride, H.J., Kessler, J.A., Feske, S., Miller, R.J., and Prakriya, M. (2014). Store-operated CRAC channels regulate gene expression and proliferation in neural progenitor cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 9107–9123.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., 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.
- Teo, W.-Y., Sekar, K., Seshachalam, P., Shen, J., Chow, W.-Y., Lau, C.C., Yang, H., Park, J., Kang, S.-G., Li, X., et al. (2019). Relevance of a TCGA-derived Glioblastoma Subtype Gene-Classifer among Patient Populations. *Sci. Rep.* 9, 1–10.
- Tropepe, V., Sibilina, M., Ciruna, B.G., Rossant, J., Wagner, E.F., and van der Kooy, D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev. Biol.* 208, 166–188.
- Verhaak, R.G.W., 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.
- Wee, S., Niklasson, M., Marinescu, V.D., Segerman, A., Schmidt, L., Hermansson, A., Dirks, P., Forsberg-Nilsson, K., Westermarck, B., Uhrbom, L., et al. (2014). Selective Calcium Sensitivity in Immature Glioma Cancer Stem Cells. *PLoS ONE* 9.

***Discussion
et perspectives***

1. Rôle des SOC dans les cellules souches neurales

Les CSN permettent d'assurer la formation de nouveaux neurones et cellules gliales durant toute la vie de l'individu. Cette capacité repose sur la multipotentialité des CSN c'est-à-dire leur aptitude à se différencier en plusieurs types cellulaires mais nécessite aussi le maintien d'un stock suffisant de CSN. Le maintien de la population de CSN est lié à leur capacité de prolifération quasi-illimitée ainsi qu'à leur capacité d'autorenouvellement.

L'ion calcium est un second messager ubiquitaire dont les variations de concentration cytosolique (amplitude, durée, localisation, ...) régulent une grande variété de processus cellulaires (Berridge et al., 2000). Constituant une des voies d'entrées principales du calcium dans les cellules, nous nous sommes intéressés au rôle des SOC dans les CSN.

SOC et CSN

Les travaux de cette thèse ont permis de montrer que les CSN de la SVZ et de l'*area postrema* de souris adultes expriment *in situ* les canaux SOC, Orai1 et TRPC1, ainsi que leur activateur STIM1, tout comme les CSN embryonnaires dont elles dérivent (Merkle et al., 2004; Pla et al., 2005). Par ailleurs, les CSN isolées et mises en culture conservent l'expression de ces protéines et l'imagerie calcique a confirmé que ces canaux sont fonctionnels après une déplétion expérimentale des réserves calciques du RE.

Nous avons montré que l'inhibition pharmacologique de l'entrée calcique dépendante des SOC, le SOCE, réduit la prolifération et l'autorenouvellement des CSN de la SVZ et de l'*area postrema in vitro*. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans la SVZ, après injection intracérébroventriculaire de l'inhibiteur des SOC SKF-96365 (car dilué dans de l'eau alors que les autres inhibiteurs sont dans du DMSO dont les effets *in vivo* pourraient être délétères). La diminution de l'autorenouvellement des CSN de la SVZ est corrélée avec une diminution des divisions symétriques prolifératives (une CSN donne deux CSN) au bénéfice des divisions asymétriques (une CSN donne une CSN et un progéniteur). Toutefois, nous n'avons pas constaté d'impact de l'inhibition des SOC sur la différenciation

des cellules, ce qui confirme des travaux antérieurs effectués sur des CSN de la SVZ (Kraft et al., 2017).

Nos travaux ont été réalisés sur le modèle souris qui nous permettait d'avoir des cultures primaires d'individus différents et de confirmer *in vivo* nos résultats obtenus *in vitro*. Il serait intéressant de valider ces résultats sur des CSN humaines étant donné que nous travaillons sur des CSG humaines. Cependant, l'étude, chez l'Homme, des CSN saines est assez compliquée, car on ne prélève que rarement chez des patients sains et de plus, la qualité des cellules issues de tissus obtenus post-mortem dépend des paramètres du prélèvement. Une alternative utilisée par certaines équipes, est l'emploi de CSN dérivées de cellules souches embryonnaires ou d'IPS humaines, même si ces modèles présentent aussi leurs limites.

Quelques mois après notre publication, ces résultats, obtenus chez la souris, ont été confirmés dans des précurseurs neuronaux dérivés de cellules souches embryonnaires humaines à la suite d'une suppression d'expression partielle (knockdown ou KD) de STIM1, l'activateur des SOC. Des analyses transcriptomiques ont montré que ce KD engendrait une diminution de la transcription de gènes relatifs à la prolifération et la réplication, et augmentait l'expression de gènes associés à la différenciation neuronale. En adéquation, les tests fonctionnels ont révélé que le KD de STIM1 entraînait une diminution de la prolifération, de l'autorenouvellement et, contrairement à nos travaux ou ceux de Kraft et coll, une différenciation des cellules (Gopurappilly et al., 2018). Cette différence peut être due au mode d'inhibition : dans les travaux de Gopurappilly, il s'agit d'un KD stable de STIM1, alors que nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques du SOCE à l'ensemencement et en milieu d'incubation. Mais surtout, nous pensons que c'est la différence de modèle qui peut expliquer cette différence de résultat : ils utilisent des CSN dérivées de cellules souches embryonnaires humaines alors que nous utilisons des CSN adultes de souris. Par ailleurs, leurs cellules sont utilisées jusqu'à 25 passages alors que nous travaillons sur des cultures primaires.

CSN, SOC et microenvironnement physiologique et pathologique

L'activité des CSN est dépendante des signaux du microenvironnement qu'elles reçoivent, tant ceux provenant de la niche que ceux issus de territoires plus lointains et circulant dans le LCR. Rappelons que les CSN de la SVZ possèdent un long cil baignant en permanence dans le ventricule (Lim and Alvarez-Buylla, 2016). D'autre part, le SOCE est déclenché par de très nombreux signaux du microenvironnement, dès lors qu'ils stimulent un récepteur couplé à l'activation d'une PLC et la production d'IP3 qui résulte en une déplétion transitoire des réserves calciques du RE. Ainsi, le SOCE a une place de choix dans la régulation de la réponse des CSN aux signaux extracellulaires.

Dans notre étude, nous avons montré que l'utilisation de carbachol, un agoniste de l'acétylcholine, entraîne dans les CSN une réponse calcique intracellulaire dont la phase plateau est nettement dépendante d'un influx calcique. Par ailleurs, nos résultats indiquent que le carbachol favorise la prolifération des CSN, ce qui est en adéquation avec le rôle pro-prolifératif des neurones cholinergiques de la SVZ (Paez-Gonzalez et al., 2014), et qu'il augmente l'autorenouvellement des CSN. Ces données, combinées au fait que les SOC sont activés par une grande variété de signaux du microenvironnement et régulent l'autorenouvellement et la prolifération des CSN, semblent désigner ces canaux comme des acteurs majeurs de l'adaptation des CSN aux signaux du microenvironnement. Des études plus poussées sur ce rôle d'adaptation au microenvironnement seraient intéressantes.

Dans notre travail collaboratif avec le Pr Moyse sur les CSN de l'*area postrema*, nous avons montré que la leptine, une hormone impliquée dans la balance énergétique, diminuait l'autorenouvellement des CSN de l'*area postrema*. En adéquation avec ces résultats, des souris transgéniques déficientes pour le récepteur à la leptine, ont une prolifération plus importante des CSN de la SVZ (Ramos-Rodriguez et al., 2014). A l'inverse, un niveau élevé de leptine, par exemple à la suite d'un régime riche en matières grasses, induit une diminution de la neurogenèse hippocampique sans perte neuronale (Park et al., 2010), ainsi qu'une diminution des capacités souches des CSN de la SVZ (Segura et al., 2015). Nous avons montré, dans des neurosphères issues de l'*area postrema*, que la leptine diminue le SOCE, et que, dans des souris transgéniques déficientes pour le récepteur à la

leptine, les CSN de l'*area postrema* ont un SOCE augmenté comparé à leurs homologues sauvages. Un effet inhibiteur de la leptine sur les entrées calciques, à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, avait déjà été observé dans des cellules du pancréas (Seufert et al., 1999) et de l'hippocampe (Shanley et al., 2002). Le fait que la leptine diminue le SOCE et altère les capacités souches des CSN, suggère que les SOC contribuent à la transduction des effets de la leptine dans l'*area postrema* en réduisant la prolifération ainsi que l'autorenouvellement des CSN. Les dérégulations de la leptine étant associées à l'obésité, ces données soulignent l'importance d'étudier le rôle des SOC dans le cerveau en conditions physiologiques et pathologiques.

Les atteintes cérébrales ischémiques déclenchent des oscillations calciques à l'origine du recrutement des CSN (Kraft et al., 2017). Lors de ce recrutement il a été montré un changement du mode de division d'asymétrique à symétrique (Zhang et al., 2004). Dans notre étude, nous avons montré, dans les CSN, que les SOC supportaient les oscillations calciques spontanées et régulaient la balance entre divisions symétrique et asymétrique, suggérant un rôle prépondérant des SOC dans le recrutement des CSN lors d'accidents vasculaires cérébraux (AVC). Par ailleurs, une étude a montré que les SOC sont impliqués dans la réponse à l'ischémie des neurones corticaux. Chez le rat, un AVC, induit par l'occlusion transitoire de l'artère médiane du cerveau, provoque la formation d'une zone d'infarctus (zone de neurones nécrosés) et des déficits neurologiques. Ceci s'accompagne d'une diminution de l'expression de Orai1 et de STIM1 mais pas de TRPC1. En adéquation, le SOCE et le courant I_{CRAC} (dépendant exclusivement de Orai1 et STIM1) sont diminués mais pas le I_{SOCE} (passant par TRPC1). Ces résultats suggèrent un rôle important des SOC dans la réponse à l'ischémie (Secondo Agnese et al., 2019). De plus, les rats préconditionnés, c'est-à-dire ayant subi un épisode ischémique sub-léthal 72h avant l'AVC provoqué, sont protégés des effets néfastes de cet incident : le volume de l'infarctus ainsi que les déficits neuronaux sont inférieurs à ceux observés chez les rats n'ayant pas subi de préconditionnement. Dans les neurones corticaux préconditionnés, l'accident ischémique n'entraîne pas de diminution ni de l'expression de Orai1 et STIM1, ni du SOCE ou de I_{CRAC} . La diminution de l'expression par siRNA de Orai1 ou de STIM1 supprime l'effet protecteur du préconditionnement. Ces résultats montrent que Orai1 et STIM1 sont impliqués dans la physiopathologie des AVC mais aussi dans les mécanismes de tolérance

à l'ischémie (Secondo Agnese et al., 2019). Par ailleurs, il a été montré sur des modèles expérimentaux que le recrutement des CSN est important pour la récupération fonctionnelle suite à un AVC (Wang et al., 2012). Sachant que les SOC sont modulés par l'ischémie et que les CSN, dont l'activité est essentielle pour une récupération fonctionnelle suite à un AVC, sont contrôlées par les SOC, il serait intéressant d'évaluer les SOC dans les CSN dans cette pathologie.

Dans les neurones différenciés, le SOCE régule l'expression de gènes ainsi que la maturation et le maintien des épines dendritiques (Korkotian et al., 2017; Lalonde et al., 2014; Sun et al., 2014). Des déficiences en SOCE dans le cerveau adulte ont été associées à de nombreuses pathologies notamment neurodégénératives comme la chorée de Huntington (Nekrasov et al., 2016), la maladie d'Alzheimer (Leissring et al., 2000), ou encore la maladie de Parkinson (Zhou et al., 2016). Outre des modifications au niveau neuronal, des altérations des CSN ont été rapportées dans ces pathologies. Ainsi, dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, les CSN de la SVZ prolifèrent moins et sont incapables de terminer leur différenciation en neurones matures (Scopa et al., 2019). Ces résultats ont été corroborés chez l'Homme où il a été observé une diminution de la quantité de neuroblastes dès l'apparition de troubles cognitifs légers (Tobin et al., 2019). Comprendre comment le SOCE régule les CSN et leurs cellules filles est d'intérêt majeur pour mieux comprendre et soigner ces différentes pathologies.

2. Rôle des SOC dans la régulation des cellules souches de glioblastomes

Nos travaux sur les cellules souches de glioblastomes nous ont permis de montrer que ces cellules expriment des SOC fonctionnels dont l'inhibition altère la prolifération et l'autorenouveaulement de ces cellules.

Le modèle cellulaire utilisé

Pour réaliser ces travaux, nous avons commencé à travailler sur la lignée humaine U87 ainsi que des lignées de rat et souris, respectivement C6 et GL261. Ces lignées ont pour avantage de proliférer rapidement et de fournir des résultats fortement reproductibles. De façon intéressante, les cellules U87, classiquement cultivées en milieu contenant du SVF et proliférant en formant une monocouche adhérente, peuvent également, lorsqu'elles sont cultivées dans un milieu riche en facteur de croissance mais sans SVF, former des sphères non adhérentes (Wee et al., 2016). Nous avons observé dans nos expériences initiales que ces cellules (U87) expriment les acteurs du SOCE : Orai1, TRPC1 et STIM1, et que l'inhibition pharmacologique du SOCE réduit leurs capacités de prolifération et de formation de sphères. Toutefois, nous avons préféré aux résultats obtenus sur les lignées commerciales de GBM, dont la dérive est possible, des travaux sur des cellules provenant de patients, des cellules considérées plus proches de ce qui se passe dans la tumeur.

La collaboration avec l'équipe du Dr Vallette à Nantes, nous a permis de disposer de cellules issues de cultures primaires dérivées de patients. Nous avons choisi de nous concentrer sur ces cultures primaires qui reflètent davantage le GBM. Ces cultures primaires sont maintenues dans un milieu favorisant la population souche, population qui est minoritaire dans les tumeurs (en général < à 5%). Cette condition, bien que différente de la tumeur d'origine car enrichie en CSG, est très utile pour l'observation des effets de traitements/molécules sur la population de CSG. L'utilisation de CSG issues de cultures primaires dérivées de GBM de patients nécessite cependant de reproduire davantage les expériences du fait de leur forte hétérogénéité intra- et inter- cultures.

SOC et CSG

Des analyses transcriptomiques ont montré une surreprésentation des transcrits de TRPC1 et STIM1 dans les glioblastomes (Alptekin et al., 2015; Scrideli et al., 2008) ainsi qu'une transcription plus importante de Orai1 dans les CSG (Robil et al., 2015). Nos travaux ont permis de confirmer cette expression au niveau protéique dans cinq CSG issues de cultures primaires dérivées de GBM de patients. L'imagerie calcique a montré, qu'après induction de la déplétion des réserves calciques par la thapsigargine, les CSG présentaient une entrée calcique dépendante des réserves caractéristique des SOCE.

L'inhibition du SOCE par des agents pharmacologiques réduit la prolifération des CSG, ce qui a déjà été montré dans des lignées de GBM mais aussi dans des cultures primaires de cellules de patients maintenues dans un milieu favorisant la population souche, comme dans notre étude (Aulestia et al., 2018; Li et al., 2013; Liu et al., 2011). Toutefois, l'inhibition des SOC dans des cultures primaires maintenues en présence de SVF n'a que peu d'effet sur la prolifération des cellules (Motiani et al., 2013). Il serait intéressant de déterminer si cette différence de résultat est due à la teneur des cultures en CSG. En effet des cultures primaires placées en milieu SVF ont une teneur en CSG moins importante que celles cultivées dans nos conditions. Ainsi, il est possible que la prolifération des cellules tumorales non-souches soit moins impactée par l'inhibition du SOCE que celle des CSG.

Par ailleurs, nous montrons que l'inhibition des SOC diminue la capacité des CSG à s'autorenouveler en entraînant la différenciation des cellules. Une étude de 2016, a également trouvé un rôle des SOC, plus spécifiquement de Orai1, dans l'autorenouvellement des CSC sur un modèle de cancer de la gorge (Lee et al., 2016). Concernant les GBM, nos résultats, montrant qu'une inhibition des SOC conduit à une diminution de prolifération, sont en accord avec ceux d'une étude de 2018, rapportant que le blocage des SOC par le SKF-96365 induit une entrée en quiescence des CSG (Aulestia et al., 2018). De plus, nous avons constaté que le traitement des CSG avec le GSK-7975A ou le YM-58483 induit une diminution d'expression du marqueur SOX2 et une augmentation de l'expression de marqueurs de différenciation. Ce résultat peut s'expliquer par une différenciation des cellules mais pourrait aussi s'accompagner d'une entrée en quiescence des CSG. Afin de déterminer l'impact des SOC sur l'entrée en quiescence des cellules, il serait intéressant d'évaluer dans nos cultures la proportion de

cellules entrant en phase G0, par cytométrie en flux, avant et après traitement avec des inhibiteurs des SOC. Nous comptons par ailleurs compléter nos résultats avec l'utilisation du SKF-96365 dans ce test pour déterminer si nous reproduisons les effets observés avec les autres inhibiteurs. Enfin, il serait intéressant de déterminer si la diminution du nombre de CSG observée *in vitro* suite au traitement avec les inhibiteurs, s'accompagne d'une diminution de la formation de tumeurs après greffe des cellules dans des souris immunodéficientes.

CSG, SOC et microenvironnement

Les SOC sont recrutés à la suite de l'activation de RTK ou RCPG par de nombreux signaux du microenvironnement. Parmi eux la S1P, que nous avons utilisée pour confirmer la fonctionnalité des SOC, est suspectée de favoriser la croissance tumorale, l'invasion, ainsi que la résistance aux traitements de différents cancers dont le GBM (Lepannetier et al., 2016; Maceyka et al., 2012). L'expression de son récepteur S1PR est corrélée avec un mauvais pronostic dans le GBM (Yoshida et al., 2010). L'étude de Marfia et coll identifie la S1P comme étant une molécule qui favorise la prolifération et le caractère souche des CSG (Marfia et al., 2014). Afin de déterminer si les SOC sont recrutés par un signal de leur microenvironnement, nous avons exposé les CSG à la S1P connue pour induire des entrées calciques SOCE et ROCE dans d'autres modèles (Lepannetier et al., 2016; Park Hopson et al., 2011). Nos résultats montrent que l'ajout de S1P induit une réponse calcique intracellulaire transitoire, fortement réduite en amplitude et en durée par un traitement avec le YM-58483, ce qui suggère que la S1P induit, dans ces cellules, une libération calcique suivie très rapidement des SOCE. Ces données indiquent que les CSG répondent à des signaux physiologiques au moyen de signaux calciques passant par les SOC. Sachant que l'inhibition des SOC diminue la prolifération et l'autorenouvellement des CSG, il serait intéressant d'étudier si l'augmentation de la prolifération et du caractère souche des CSG en réponse à la S1P (Marfia et al., 2014) est due à l'activation des SOC. Il serait, par ailleurs, intéressant de déterminer si d'autres signaux du microenvironnement peuvent recruter les SOC dans les GBM.

Les CSG sont localisées au niveau de niches hypoxiques. La réponse cellulaire immédiate à des taux d'O₂ faibles est la stabilisation des facteurs de transcription HIF. Les HIF sont

impliqués dans le maintien de la population souche de nombreux cancers (Keith and Simon, 2007). Dans le GBM, ils favorisent l'expression de marqueurs souches comme SOX2 ou CD133, ainsi que l'autorenouveaulement des CSG (Bar et al., 2010; Jalota et al., 2018; Li et al., 2009) et participent au maintien de l'état souche des CSG *via* l'expression de Vadorine, préférentiellement dans les CSG, une protéine qui en se liant à Notch-1 empêche sa dégradation (Man et al., 2018). Par conséquent, l'hypoxie a un rôle majeur dans le maintien des CSG. Or, il a été montré dans d'autres modèles de cancer (cancers du foie et du pancréas) que l'hypoxie induit une surexpression STIM1, le senseur du taux de Ca^{2+} dans le RE et activateur des SOC, et que cette surexpression est associée à la progression tumorale (Li et al., 2015; Wang et al., 2019). De façon intéressante, HIF1 α contrôle directement la transcription de STIM1 et réciproquement, le SOCE dépendant de STIM1, est nécessaire à l'accumulation de HIF1 α (Li et al., 2015). Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer si le SOCE joue un rôle similaire dans la réponse à l'hypoxie du GBM d'une part, et d'autre part, d'analyser le SOCE dans les CSG maintenues en hypoxie.

SOC une cible thérapeutique contre les CSC ?

Ce mécanisme de régulation, des CSG par les SOC, a aussi été mis en évidence dans un autre type de cancer : le carcinome squameux oral/oropharyngé (Lee et al., 2016). C'est pourquoi, l'étude du rôle potentiel des SOC dans les CSC d'autres types de cancers revêt un intérêt particulier pour déterminer si ce mécanisme est commun et représenterait une cible thérapeutique potentielle pour éradiquer les CSC, considérées comme responsables de la résistance aux traitements et des rechutes. Ainsi, nos travaux ouvrent de nouvelles perspectives de cibles thérapeutiques contre ces cellules.

Récemment, une molécule ciblant les canaux calciques, le carboxyamidotriazole, a passé avec succès la phase clinique IB et devrait prochainement être utilisée en essai clinique de phase II (Omuro et al., 2018). Ce traitement administré par voie orale concomitamment au témozolomide, est toléré par les malades et aurait des effets prometteurs. Les SOC régulant de nombreuses fonctions cellulaires, un traitement plus ciblé peut aussi être envisagé. La vectorisation par exemple (Renoux et al., 2017) serait un bon moyen de libérer les inhibiteurs des SOC uniquement dans la zone tumorale pour ainsi limiter les effets délétères sur les cellules saines.

3. SOC, signalisation calcique et état souche

Quels acteurs du SOCE ?

Les travaux de cette thèse ont permis de montrer que les CSN de la SVZ et de l'*area postrema* de souris ainsi que les CSG issues de cultures primaires de patients expriment les canaux SOC, Orai1 et TRPC1, ainsi que leur activateurs STIM1. Les analyses par imagerie calcique ont confirmé que ces canaux sont fonctionnels et leur inhibition diminue la population souche de CSN mais aussi de CSG.

Les SOC peuvent être composés, en plus de TRPC1 et Orai1, d'autres isoformes de Orai, TRPC et STIM (Ong et al., 2016; Prakriya and Lewis, 2015). L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques permet d'inhiber le SOCE mais n'est pas spécifique d'une composition particulière de SOC. Or, cette composition a des conséquences sur l'influx SOCE et l'influx d'autres cations, les TRPC étant des canaux cationiques. Ainsi, une approche par shRNA ou CRISPR-Cas9 nous permettrait de conforter nos résultats obtenus à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques mais surtout d'interroger le rôle des différents acteurs. Nous avons commencé à transfecter les cellules de gliomes avec des shRNA. Alors que nos premiers travaux effectués sur une culture primaire, non gardée par la suite car elle était semi-adhérente contrairement aux autres qui poussent en sphères, nous ont permis d'inhiber fortement l'expression de TRPC1 ; nos essais initiaux réalisés sur les autres CSG n'ont pour l'instant pas été concluants et nécessiteront des étapes de mise au point. Par ailleurs, nous pourrions, *via* l'utilisation d'inhibiteurs ou d'activateurs pharmacologiques, évaluer l'implication des différentes isoformes de TRPC (Minard et al., 2018; Schleifer et al., 2012).

Concernant les CSN, des travaux menés sur des CSN embryonnaires de rat ont montré un rôle des SOC dans la prolifération de ces cellules et une diminution de l'expression de la protéine TRPC1 au cours de la différenciation des CSN, suggérant un rôle primordial de TRPC1 dans la régulation des CSN (Pla et al., 2005). Par ailleurs, il a été rapporté que Orai1 et Orai3 médient la majorité du SOCE dans les astrocytes (Kwon et al., 2017). Ces données, combinées au fait que l'expression de Orai3 est plus importante dans le cerveau que celle de Orai1 (Kraft, 2015), font de Orai3 un acteur potentiel du SOC qu'il faut envisager dans les CSN.

Pour ce qui est des GBM, des analyses transcriptomiques de biopsies de patients atteints de GBM ont montré une surexpression de TRPC6, en plus de TRPC1, Orai1 et STIM1, suggérant un rôle prépondérant de ce canal (Alptekin et al., 2015). TRPC6 peut contribuer au SOCE mais il est surtout connu pour être impliqué dans le ROCE, l'influx induit par le DAG. Physiologiquement, les mêmes signaux du microenvironnement stimulant la PLC, activent en parallèle ROCE et SOCE qui sont de ce fait difficiles à discriminer. En effet, la PLC va transformer le PIP2 en IP3, qui va induire le SOCE, et en DAG responsable de l'entrée calcique ROCE. Une analyse plus approfondie du potentiel rôle de cette entrée calcique serait intéressante à coupler avec nos données sur les SOC.

SOC et liens entre CSN et CSG

De nombreuses études suggèrent que les CSG sont issues de la transformation des CSN saines. Ces deux populations ont en effet de nombreux points communs : elles partagent les propriétés cardinales des cellules souches et sont très dépendantes de leur microenvironnement qui permet le maintien de leur propriété souche.

De manière intéressante, les CSN ont un tropisme particulier pour les cellules de glioblastomes et les gliomes ont une forte tendance à récidiver dans des zones proches de niches neurogéniques comme la SVZ. Chez l'Homme, les études cliniques établissent que la proximité des gliomes avec la zone sous-ventriculaire (SVZ) est prédictive de la récurrence et de la létalité des tumeurs (Mistry et al., 2017; Young et al., 2011). Le fait que les gliomes et les CSN s'attirent mutuellement souligne une importance cruciale des signaux du microenvironnement dans leur interaction et potentiellement dans la transformation des CSN en CSG.

Dans ces deux types de cellules, des analyses transcriptomiques ont mis en évidence un rôle prépondérant de la signalisation calcique. Les SOC sont des canaux recrutés à la suite de nombreux signaux du microenvironnement et constituent une des voies d'entrée principale de Ca²⁺ dans la cellule. Nos travaux démontrent que les SOC régulent la prolifération et l'autorenouvellement des CSN et des CSG. Le fait que ces cellules soient régulées par le même mécanisme est un nouvel argument en faveur de la théorie stipulant que les CSG sont issues de la transformation des CSN.

Etat souche et voies de signalisation activées par le Ca²⁺

L'activation des SOC induit une entrée calcique chargée du réapprovisionnement des réserves du RE et de l'activation de voies de signalisation. Le Ca²⁺ active des CaBP comme la calmoduline qui à son tour va activer d'autres protéines comme la CaMKII, ou la calcineurine. La calcineurine va déphosphoryler les facteurs de transcription de la famille NFAT permettant ainsi leur translocation dans le noyau où ils régulent l'expression de nombreux gènes. Plusieurs études lient les facteurs de transcription NFAT à l'état souche (tableau 3).

Les travaux de l'équipe de Lee sur une forme de cancer de la gorge ont montré une augmentation de l'expression de Orai1 et de NFATc3, son principal effecteur, lors de la carcinogénèse. De plus, les transcrits de Orai1 et NFATc3 sont très enrichis dans la population de CSC. Par des expériences d'inhibition ou d'expression ectopique dans des cellules immortalisées non tumorigéniques, ces travaux ont montré que Orai1 et NFATc3 participent au maintien des CSC (autorenouvellement, expression de marqueurs souches) (Lee et al., 2016, 2019). En effet, NFATc3 se lie au promoteur de OCT-4 et induit sa transcription (Lee et al., 2019). Ces résultats suggèrent que le SOCE *via* l'activation de NFATc3 favorise la population de CSC dans cette forme de cancer de la gorge.

Par ailleurs, la signalisation calcineurine-NFAT est aussi importante dans la reprogrammation des cellules somatiques ou IPS (induced pluripotent stem cells). Dans les phases précoces de cette reprogrammation, la signalisation calcineurine-NFAT est indispensable : elle permet le maintien du cycle des divisions cellulaires, la transition mésenchymato-épithéliale, ou encore l'adhésion des cellules. Cependant, dans les phases tardives de la reprogrammation, cette signalisation est une barrière à l'induction de la pluripotence (Khodeer and Era, 2017; Sun et al., 2016). En effet, la calcineurine active NFATc2 qui va inhiber l'expression de SOX2 et Klf1 (Krueppel-like factor 1) (Khodeer and Era, 2017). Ainsi, la voie de signalisation calcineurine-NFAT a un rôle biphasique lors de la reprogrammation des cellules somatiques et NFATc2 serait un inhibiteur de la pluripotence, à l'inverse de NFATc3 dans le cancer de la gorge.

Le rôle des isoformes NFATc1 et NFATc4 a été étudié dans des cultures primaires de myoblastes humaines. L'expression de NFATc1 est majoritaire dans les myotubes tandis que NFATc4 est surtout retrouvé dans les cellules satellites de réserves (cellules souches).

La diminution de l'expression par KD de ces deux facteurs de transcription altère la différenciation des myotubes mais seul le KD de NFATc4 entraîne une diminution de la population de cellules souches (Perroud et al., 2017).

Ainsi, le rôle de NFAT dans le maintien de l'état souche semble dépendre de l'isoforme considéré (tableau 3).

Acteurs	Modèle	Effets sur la population souche		Références
Orai1 et NFATc3	cancer de la gorge humain	+	autorenouveaulement, expression de marqueurs souches, NFATc3 induit la transcription de OCT-4	(Lee et al., 2016, 2019)
Calcineurin-NFAT	reprogrammation de cellules somatiques	+	phases précoces : maintien du cycles des division cellulaires, TME, adhésion des cellules	(Khodeer and Era, 2017; Sun et al., 2016)
		-	phases tardives : empêche l'induction de la pluripotence, NFATc2 inhibe la transcription de SOX2 et Kf1	
NFATc4	cultures primaires de myoblastes	+	Le KD de NFATc4 induit une diminution des cellules souches	(Perroud et al., 2017)
CaMKK2	cellules souches hématopoïétiques	-	la délétion de CaMKK2 augmente la prolifération des cellules souches et leur résistance à l'irradiation	(Racioppi et al., 2017)

Tableau 3 : Etat souche et voies de signalisation activées par le Ca²⁺

Dans les cellules souches hématopoïétiques, la délétion de CaMKK2 (CaMK2 kinase), une cible de la CaMK2, augmente la prolifération de ces cellules, diminue l'expression de marqueurs de quiescence et améliore la résistance et la régénération après irradiation de la moelle osseuse (Racioppi et al., 2017). Par ailleurs, dans un modèle murin de leucémie myéloïde chronique, où l'expression de BCR-Abl a été induite dans des progéniteurs de la moelle osseuse immortalisés, le SOCE est diminué en comparaison avec les cellules sauvages et cette diminution s'accompagne d'une diminution de la translocation de

NFATc1 et NFATc2 (Cabanas et al., 2018). Ainsi, les voies de signalisation induites par le Ca^{2+} semblent ne pas être favorables au maintien des cellules souches hématopoïétiques.

SOC et signaux calciques dans les cellules souches : un mécanisme universel ?

Comme indiqué dans la partie précédente, l'implication des SOC dans la régulation des CSC a aussi été mise en évidence dans un autre type de cancer : le carcinome squameux oral/oropharyngé (cancer de la gorge) (Lee et al., 2016). L'existence d'un rôle des SOC similaire dans des cellules souches saines et des cellules souches cancéreuses provenant de cancers totalement distincts, pose la question de la potentielle universalité de ce mode de régulation, et plus généralement de la signalisation calcique au sein des cellules souches.

En accord avec l'hypothèse d'un rôle du calcium dans le maintien de l'état souche et /ou de l'expansion de la population souche, une étude récente, réalisée sur des cellules souches embryonnaires de souris, démontre qu'un taux élevé de Ca^{2+} intracellulaire est lié à un maintien de l'état indifférencié de ces cellules (MacDougall et al., 2019). A l'inverse, dans des cellules souches hématopoïétiques adultes, l'état souche est lié à un taux de Ca^{2+} intracellulaire bas (Luchsinger et al., 2019) ce qui est en adéquation avec les effets de NFAT et CaMKK2 sur l'état souche décrits dans la partie précédente. Ainsi il semblerait que le rôle de la signalisation calcique dans les cellules souches varie en fonction du type de cellules. Même si ces études pourraient indiquer que l'âge de l'individu dont sont issues les cellules souches (embryonnaires versus adulte) pourrait être important, cela ne peut constituer le seul paramètre pour expliquer cette différence puisque nos travaux, effectués sur des cellules souches du cerveau adulte, montrent que la signalisation calcique favorise l'autorenouvellement des CSN. Il est possible que le tissu et le microenvironnement au sein duquel résident les cellules souches module les signaux calciques dans ces cellules (Keith and Simon, 2007).

Conclusion

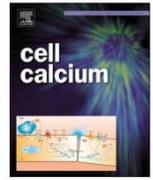
Les travaux de cette thèse ont permis de mettre en évidence un mécanisme de régulation commun aux CSN et aux CSG passant par les SOC. Dans ces deux populations, l'inhibition des SOC réduit la capacité des cellules souches à proliférer et à s'autorenouveler, une capacité indispensable au maintien de leur population. Ces travaux permettent d'avoir une meilleure compréhension du mode de fonctionnement des CSN qui sont considérées avec intérêt par la médecine régénératrice.

Les traitements actuels du GBM n'offrent qu'une espérance de vie moyenne de 15 mois après diagnostic. Les CSG sont désignées comme responsable de la résistance aux traitements et du taux de rechute important du GBM. Il est donc important d'éradiquer ces cellules pour permettre un traitement efficace de la tumeur. Nos travaux proposent les SOC comme une potentielle nouvelle cible thérapeutique des CSG, les cellules responsables de la résistance aux traitements de cette maladie au pronostic sombre. A cet égard, il est intéressant de mentionner que le carboxyamidotriazole, un inhibiteur de canaux calciques, devrait prochainement être en essai clinique de phase II.

Annexes

Annexe 1

Role of the calcium toolkit in cancer stem cells



Role of the calcium toolkit in cancer stem cells

Elodie Terrié, Valérie Coronas, Bruno Constantin*

Laboratoire Signalisation et Transports Ioniques Membranaires (STIM), CNRS ERL-7003, Equipe 4CS, Université de Poitiers, UFR SFA, Pôle Biologie Santé, Bâtiment B36, 1 Rue Georges Bonnet, TSA 51106, 86073, Poitiers Cedex 9, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Cancer stem cell
Ca²⁺ channel
Intracellular Ca²⁺ signaling
Store-operated channel
Voltage-gated channel
Transient receptor potential channel
Endoplasmic reticulum
Chemotherapy resistance
Tumor relapse
Stem cell
Glioma
Leukemia
Melanoma
Proliferation
Metastasis

ABSTRACT

Cancer stem cells are a subpopulation of tumor cells that proliferate, self-renew and produce more differentiated tumoral cells building-up the tumor. Responsible for the sustained growth of malignant tumors, cancer stem cells are proposed to play significant roles in cancer resistance to standard treatment and in tumor recurrence. Among the mechanisms dysregulated in neoplasms, those related to Ca²⁺ play significant roles in various aspects of cancers. Ca²⁺ is a ubiquitous second messenger whose fluctuations of its intracellular concentrations are tightly controlled by channels, pumps, exchangers and Ca²⁺ binding proteins. These components support the genesis of Ca²⁺ signals with specific spatio-temporal characteristics that define the cell response. Being involved in the coupling of extracellular events with intracellular responses, the Ca²⁺ toolkit is often hijacked by cancer cells to promote notably their proliferation and invasion. Growing evidence obtained during the last decade pointed to a role of Ca²⁺ handling and mishandling in cancer stem cells. In this review, after a general overview of the concept of cancer stem cells we analyse and discuss the studies and current knowledge regarding the complex roles of Ca²⁺ toolkit and signaling in these cells. We highlight that numbers of Ca²⁺ signaling actors promote cancer stem cell state and are associated with cell resistance to current cancer treatments and thus may represent promising targets for potential clinical applications.

1. Introduction

Ca²⁺ is a versatile signal that relies on specific ion channels, pumps and exchangers to produce complex and diverse Ca²⁺ signals defined by their magnitude as well as their spatial and temporal characteristics. Although existing in virtually every cell, the Ca²⁺ signal is selective and allows to produce specific responses to extracellular signals. Initially described on excitable cells such as those of the heart or the brain, intracellular Ca²⁺ signals were found to exert pleiotropic effects in a wide range of cells including cancer cells.

In neoplasm, a subpopulation of cells endowed with proliferative and self-renewing capacities is considered as the root of the tumor, which led to their name “cancer stem cells”. During the last decade, there has been a deeper understanding of how Ca²⁺ channels and Ca²⁺ signals control several cancer stem cell properties. In this Review, we provide first a general overview of the concept of cancer stem cells for those outside the field and then explore how Ca²⁺ signals affect specific

functions and properties of these cells. Finally, we discuss these data of the literature in the context of resistance to treatment, tumour micro-environment and pharmacological developments.

2. Cancer stem cells concept and identification

2.1. Discovery of cancer stem cells

Histological heterogeneity within tumors is known since the nineteenth century. In their pioneer experiments exploring tumor complexity, Furth and Kahn uncovered that single leukemic cells when inoculated in mice, were able to induce leukemia and death within fifteen to fifty days in only 5% of mice. Based on these results, they suggested that these hematological malignancies contain a small subpopulation of cells that is able to build a tumor with the expected characteristics when transplanted in a host mouse [1]. A few decades later, Pierce et al identified that only undifferentiated cells can form tumors when grafted

Abbreviations: ALDH, aldehyde dehydrogenase; Calmodulin, Ca²⁺MODULated protein; CaMK, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase; CRAC, Ca²⁺ release activated Ca²⁺ channel; Cs, calcineurin; CSC, cancer stem cell; EMT, epithelial to mesenchymal transition; FACS, fluorescence activated cell sorting; HIF, hypoxia inducible factor; IP3, inositol trisphosphate; IP3R, IP3 receptor; NFAT, nuclear factor activated T-cells; neg, negative; pos, positive; ROC, receptor-operated channel; ROCE, receptor-operated Ca²⁺ entry; RYR, ryanodine receptor; SOC, store-operated channel; SOCE, store-operated Ca²⁺ entry; STIM, stromal interaction molecule; TRPC, transient receptor potential-canonical; TRPV, transient receptor potential vanilloid

* Corresponding author.

E-mail addresses: elodie.terrie@univ-poitiers.fr (E. Terrié), valerie.coronas@univ-poitiers.fr (V. Coronas), Bruno.Constantin@univ-poitiers.fr (B. Constantin).

<https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.05.001>

Received 21 March 2019; Received in revised form 7 May 2019; Accepted 7 May 2019

Available online 08 May 2019

0143-4160/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

in a compatible host while differentiated cells of the neoplasm do not [2], supporting the hypothesis that a subset of cancer cells named human tumor stem cells may drive tumorigenesis [3]. The characterization of adult stem cells in normal non-tumoral tissue fostered the discovery of cancer stem cells (CSCs) during the last decades. Using FACS cell sorting based on hematopoietic stem cell-surface-marker expression, the team led by John Dick was the first to isolate, within leukemia, a CD34^{pos} CD38^{neg} subpopulation of cells (positive for CD34 and negative for CD38). When injected into the tail vein of immunodeficient mice, these cells were able to home to- and engraft into the bone marrow wherein they proliferated to generate high levels of leukemia blasts and finally induced establishment of human leukemia in mice [4]. These cells called leukemic stem cells were found to represent about one cell per 250 000–1 000 000 leukemic cells [4,5]. Following evidence in leukemia, CSCs were then also identified in breast cancers where as few as one hundred CD44^{pos} CD24^{low} Lineage^{neg} CSCs were able to form tumors in xenografted mice, while tens of thousands of cells with alternate phenotypes failed to form tumors [6]. Since, most if not all solid tumors including ovarian, prostate, lung, melanomas, pancreas, liver, colon, brain and gastric cancers have been consistently reported to harbor CSCs [7–15].

2.2. Cancer stem cell markers

In an attempt to characterize CSCs prospectively, several studies tried to determine the molecular signature of CSCs. Like adult stem cells, CSCs express the transcription factors SOX2, OCT-4 and NANOG that are crucial for maintaining self-renewal capacities as well as the detoxification enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH) [16–19]. Hoechst 33,342 extrusion by ABC transporters, like multidrug resistance transporters, is also often used to isolate a side population with a great potential of initiating tumor in xenografts that may therefore represent CSCs [20].

In addition to these general markers, tumor-specific cell surface markers have also been identified in CSCs, allowing the use of FACS to isolate them. For instance, in leukemia, CSCs were identified as CD34^{pos} CD38^{neg} cells [4]. Although extensive knowledge of marker expression in normal stem/progenitor cells has been fruitful to allow the first isolation of CSCs in leukemia, identification of CSC markers in solid tumors has suffered from the partial characterization of normal adult stem cells in these tissues. Nevertheless, it has been evidenced that CSCs from breast cancers [6] and pancreas cancers [11] can be defined as CD44^{pos} CD24^{low} cells and that CSCs from some glioma [21], prostate cancers [8], pancreatic carcinoma [22] and colorectal tumors [13] display high levels of CD133. However, it should be mentioned that there are some controversies. For example, in glioblastoma, even though CD133^{pos} cells have great tumorigenic abilities, some CD133^{neg} cells can also recapitulate the tumor when engrafted into a host mouse [23]. Yet, keeping in mind these limits, the combinatorial use of CSC markers represents a real asset for the CSC field.

2.3. Cancer stem cell hallmarks

The CSC theory states that a subpopulation of cells (the CSCs) hidden within the cancer tissue fuels the tumor, as do adult stem cells for normal tissue. Thus, in this hierarchical model, CSCs are defined as cells that self-renew through either symmetric or asymmetric cell division (Fig. 1A). CSCs generate non-CSC progenies that may proliferate and produce a heterogeneous population of differentiated tumor cells building-up the bulk of the tumor (Fig. 1B). Owing to these properties, CSCs contribute to long-term tumor growth and heterogeneity. Conversely, non-CSCs are capable only of transient proliferation and therefore do not contribute to long-term tumor growth (Fig. 1B).

CSCs can consistently be derived from patient tumors and grown *in vitro* in a serum-free medium enriched with growth factors, the most commonly used being EGF (Epidermal Growth Factor) and FGF

(Fibroblast Growth Factor). This culture medium promotes the formation of colonies developing as spheres [24–26] and in most cases, the cells that form spheres are also the ones that are the most effective for spreading tumors in serial xenotransplantation [14,24,27,28]. Analysis of the structure and composition of glioma tumor spheres showed a concentration of CSCs in the core and an outward differentiation gradient [29]. Because CSCs form colonies, sphere assays along with limit dilution assays, which are both based on the ability of CSC to form colonies, are commonly used to detect CSCs and estimate their amounts.

Confirmation of the CSC nature of a cell is usually performed by using the gold standard method consisting in the analysis of the cell capacity to form tumors when xenografted into non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) mice over serial passages [30]. This fundamental property has led the scientific community to also use the term tumor initiating cells. Of note, this assay allowed the first identification of CSC in leukemia and later in solid tumors including human breast cancers [6] and brain cancers where as few as 100 cells CD133^{pos} were able to form a tumor that could be serially transplanted while injection of 10⁵ CD133^{neg} cells did not [14]. Originally designed for studies on hematological malignancies, this method presents caveats when applied to solid cancers as these latter not only harbor a higher tumor heterogeneity compared with hematological malignancies but also are formed of cells relying on cell contacts with the matrix and with surrounding cells [30,31]. Indeed, efficiency of melanoma cells to exhibit CSC properties strongly depends on xenograft conditions [32]. To circumvent the variability inherent to the xenotransplantation assay, alternative lineage-tracing approaches have been developed to study CSCs in their native intact microenvironment using genetically engineered mice harboring chemically- or genetically-induced tumors. Such approaches allowed to identify CSCs displaying cardinal stem cell properties in glioblastoma, intestinal adenoma and epidermis papilloma [33–35].

CSCs are thought to be resistant to standard chemotherapy and radiotherapy, a property that explains inevitable recurrence of the tumor after an initial successful treatment. For example, breast CSCs and glioblastoma CSCs survive to conventional chemotherapy and radiotherapy [21,36–38]. Conversely, the genetic ablation of CSCs in mice models with glioblastoma confers to the tumor responsiveness to chemotherapy, stops tumor growth and prolongs mice survival without any apparent regeneration of the cancer [33]. Resistance of CSCs to therapies has been linked to overexpression of drug resistance transporters [39] and a highly efficient DNA damage repair ability [36,40]. Slow cycle kinetics [41] and a quiescent state [42] are also believed to confer to CSC, resistance to treatment. This dormancy would explain the relapse of the tumor after long lag delays although there are examples showing that CSCs are not necessarily quiescent [6].

Whereas numerous studies consistently support an involvement of CSCs in tumor relapse, the roles of CSCs in metastasis remains debated. Metastasis occurs when a cancer cell acquires a mesenchymal program that prompts the cancer cell to leave the primary tumor site, migrate, join the circulation and invade other tissues, where a secondary tumor grows. This process called epithelia mesenchymal transition (EMT) is associated with the expression of a specific set of genes including TWIST1, SNAI1, SNAI2 and ZEB1. Because overexpression of key EMT factors leads to the acquisition of CSC properties [43,44], it has been inferred that EMT promotes stemness. Additionally, clinical studies have reported that cells matching the phenotype criterion of putative cancer stem/progenitor cells are identified in the bone marrow samples of patients with breast cancer, suggesting that breast cancer CSCs disseminate [45]. Furthermore, circulating tumor cells that have CSC hallmarks were found in patients with colorectal cancer, reinforcing the hypothesis of a tight link between CSCs and metastasis [46]. However, the picture might be more complex than initially thought. Studies on pancreatic adenocarcinoma demonstrated that while pancreatic CSCs, identified as CD133^{pos} cells, could induce orthotopic tumor formation

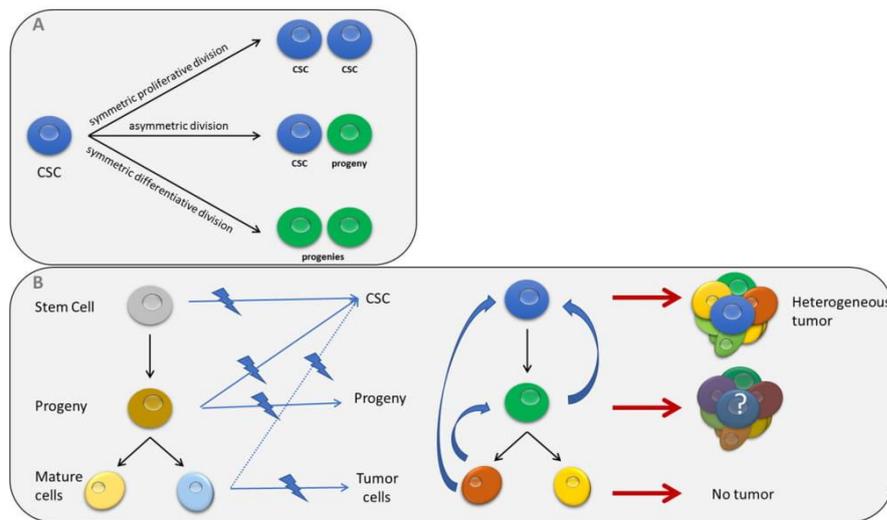


Fig. 1. Cancer Stem Cells.

A. CSC can divide following three different modes: In the symmetric proliferative division, a CSC (blue) gives rise to two CSCs. This division mode leads to an increase of the pool of CSCs. A CSC can give rise to one CSC and one progeny during an asymmetric division; this division mode maintains the CSC pool and leads to differentiated cells. Finally, the symmetric differentiative division leads to two progenies and depletes the stem cell population. B. The CSC hierarchical model. CSCs give rise to progenies (green) which are at the origin of more engaged cells that in turn, generate tumor cells forming the bulk of the tumor. In this model, a single CSC can give birth to a heterogeneous tumor. In addition, several studies consistently described the existence of a tumoral plasticity that endows tumoral progenies or even more differentiated cells with cancer stem cell properties.

in athymic mice, only the fraction of CD133^{pos} cells that also express CXCR4 was able to migrate and metastasize while CD133^{pos} CXCR4^{neg} could not. Elimination of this CD133^{pos} CXCR4^{pos} CSC subpopulation abrogated the metastatic activity of pancreatic cancer cells [22]. The fact that only a subset of long-lived CSCs can drive metastasis following transplantation has also been reported for human colon cancers [47], indicating that even though CSCs are involved in metastasis, only part of them are endowed with this dissemination capacities.

2.4. Origin of cancer stem cells

Given that CSCs sustain malignant growth and propagate the tumor and thus represent potential targets for cancer therapies, numerous studies were designed to disclose the identity of the population of cells that may give birth to CSCs.

The CSC model postulates that a minority of cells residing in the tumor is endowed with the potential to drive cancer progression, holding most if not all of a tumor-initiating potential, while the majority of neoplastic cells, the non-CSCs, lack these features. To ensure tumor genesis, CSCs self-renew and are capable of reiterating tumor hierarchy [48]. Because of their inherent self-renewing and proliferating properties, adult stem cells and progenitors have been considered as possible candidates for cell of origin for tumors and for CSCs. Consistent with this notion, stem cells and/or progenitors have been implicated as cellular targets in both hematopoietic malignancies and solid tumors. For instance, in chronic myeloid leukemia that is driven by the oncogene BCR-ABL, Daley and collaborators established that murine hematopoietic stem cells forced to express BCR-ABL develop in irradiated syngeneic recipients a transplantable leukemia whose characteristics are reminiscent of the human pathology [49]. Conversely, in mice where hematopoietic stem cells are deficient in long-term growth and maintenance, the ability of mice to develop BCR-ABL-induced chronic myeloid leukemia (CML) is profoundly reduced, while progression of acute lymphocytic leukemia (ALL) still occurs [50]. These studies show that leukemia can arise from stem cells or from progenitors [51] and that the identity of the cell of origin harboring the mutation plays a critical role in defining the type of cancer. Similar results have been observed in glioblastoma where oncogenic hits in either stem cells or in progenitors could drive in mice, the emergence of diffuse and infiltrating gliomas whose characteristics and sensitivity to treatment were dependent on the cell of origin [52–55]. Recently, deep sequencing of human tissue acquired during tumor resection along with genetic engineering of neural stem cells in mice by using the CRISPR-Cas9 strategy identified neural stem cells as the cell of origin that contains

the driver mutations of human glioblastoma [56]. These studies, along with the tracing of genetic lineage combined with the expression of oncogenes or deletion of oncogenic repressors, collectively support that mutated stem or progenitor cells are responsible for the emergence of tumor initiating cells. Some scarce studies, however, suggest that tumor initiating cells may also derive from mature cells (Fig. 1) [57].

On the other hand, a body of experimental evidence pinpoints that non-CSCs may dedifferentiate, revert into multipotent cells and gain a CSC tumorigenic phenotype in response to appropriate stimuli [58,59]. This notion has been exemplified in breast cancers and in melanoma where cancer stem-like cells have been found to arise *de novo* from non-stem-like cells [58,60–62]. At odds with the CSC hierarchical model, the acquisition of CSC properties in non-CSCs has also been reported following exposure to an inflammatory environment or in response to ablation of CSCs in breast, colon and intestinal cancers [63–66]. Furthermore, when analyzing the mechanisms responsible for CSC plasticity, the group of Weinberg determined that non-CSCs in human basal breast cancers carry a ZEB1 promoter that can readily switch from a poised to active state, resulting in the efficient induction of ZEB1 and consecutive acquisition of a CSC phenotype [58]. This proclivity of non-CSCs to generate CSCs implies not only that non-CSCs are plastic cell populations, but also that non-CSCs are highly adaptable to signals from the microenvironment. Among the mechanisms involved in CSC maintenance or plasticity, aberrant activation of Wnt, Hedgehog or Notch signaling has been implicated in the regulation of a plethora of CSC types including breast, colorectal, hematologic and lung cancers [67,68]. Conversely, small molecules that inhibit these pathways disrupt stemness and induce differentiation of CSC, which is highly desirable for cancer treatment. Interestingly, it has been shown in colorectal cancers that cells from the CSC niche secrete hepatocyte growth factor that elevates Wnt signaling and subsequently confers self-renewal and tumorigenic potential to non-CSC, indicating that signals from the microenvironment govern CSC stemness [69]. At the opposite, the fact that genetic ablation of the CSCs impaired glioblastoma growth and relapse suggests a more restricted plasticity in this neoplasm [33]. The existence of CSC plasticity represents a major challenge for cancer biology and points to the necessity to address in-depth the extent to which the different tumor types are prone to reversion as well as to determine the intrinsic and extrinsic mechanisms that govern the CSC phenotype.

3. Emerging roles of Ca²⁺ in cancer stem cell population maintenance and stemness

The maintenance or the emergence of a population of CSCs is governed by both intrinsic factors and extrinsic signals like those from the microenvironment stimulating a various set of receptors. Numerous extracellular signals are converted in transitory rises of intracellular concentration of free Ca²⁺ that are either restricted to cell micro-domains or propagated throughout the whole cell and that display different durations. Because of the wide repertoire of spatio-temporal fluctuations in its intracellular concentrations, the Ca²⁺ signal is exquisitely poised to link extracellular mechanisms with intracellular modifications that in turn, determine specific cell states [70]. Ca²⁺ signal diversity relies on a Ca²⁺ toolkit, which ensures the transitory elevation of free cytosolic Ca²⁺ concentration through a Ca²⁺ entry from the extracellular compartment and/or by a Ca²⁺ release of intracellular stocks mainly contained in the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria. Ca²⁺ entry from the extracellular compartment occurs through plasma membrane channels and liberation of intracellular stores follows activation of Ca²⁺ release receptor-channels of the ER membrane or exchangers located in mitochondria. To insure a transitory cytosolic Ca²⁺ rise, pumps and exchangers release Ca²⁺ in the extracellular space and reuptake Ca²⁺ ions into cell reservoirs (Fig. 2). This so-called Ca²⁺ toolkit is often either hijacked or modified by cancer cells and many cancers harbor a remodeling of plasma membrane channels as well as alteration of Ca²⁺ exchanges and intracellular Ca²⁺ signals, which then contribute to the neoplastic phenotype [71–74]. Changes in activity and/or expression of these specialized proteins are involved in promoting an enhanced migratory activity, or a sustained and uncontrolled cell proliferation, or a resistance to apoptotic signals. The discovery of enrichment in Ca²⁺ signaling genes in glioma CSCs, that is correlated with a high Ca²⁺ drug sensitivity in these immature cells, set a cornerstone for studies aimed at deciphering the roles of the Ca²⁺ toolkit in CSCs [75]. The fact that Ca²⁺ signaling is the first pathway to be modified by epigenetic regulators in CSCs further reinforces the hypothesis of a crucial role of Ca²⁺ in CSCs [76]. For purpose of clarity, we organized the following sections according to the Ca²⁺ toolkit: plasma membrane channels, intracellular Ca²⁺

handling and Ca²⁺ signaling pathways.

3.1. Plasma membrane channels

Located at the interface of the intracellular and extracellular medium, the ionic carriers and transporters of the biomembranes contribute significantly to transmission and integration of extracellular signals that originate, for example, from tumor or stem cell micro-environment wherein CSCs are implanted. Among these trans-membrane proteins, Ca²⁺ channels mediate Ca²⁺ entry from extracellular compartment in response to a diversity of stimuli such as membrane depolarization, extracellular agonists, intracellular messengers, stretch, or depletion of Ca²⁺ stores [70].

3.1.1. Voltage-operated channels (VOC)

Voltage-operated channels (VOC) or Cav family comprise 6 types of channels: L-, N-, P-, Q-, R-, and T-type [77], which require a transient depolarization of the plasma membrane for activation of the intrinsic voltage sensor and subsequent pore opening. These channels, firstly characterized and identified in “excitable cells” such as neurons and muscles, are also found in cancer cells where they regulate proliferation and migration [72]. Ca²⁺ permeable VOC have been scrutinized by several studies, although it was not clear if CSCs display membrane potentials allowing the activation of Ca²⁺ permeable VOC. In this respect, CSCs from hepatocellular carcinoma were shown to display a more depolarized resting membrane potential (−7 mV) relative to normal stem cells (−23. mV) that was related to a differential expression of GABAergic receptor subunit [78]. Interestingly, the voltage-gated Ca²⁺ channel α2δ1 subunit encoded by the gene *CACNA2D1* was nicely identified as a marker of CSCs in hepatocellular carcinoma [79]. Beginning with the search of biomarker for tumor initiating cells in these liver cancers, a subtractive immunization approach using cells with high tumorigenic potential versus cells with no tumor-initiating capacities allowed the generation of an antibody named 1B50-1. This antibody was then proven to recognize a subset of cells expressing stem cell markers including CD133, ALDH and SOX2 and able to self-renew and to recapitulate the tumor when grafted in immunodeficient mice. Identification of the antigen targeted by the 1B50-1 antibody revealed

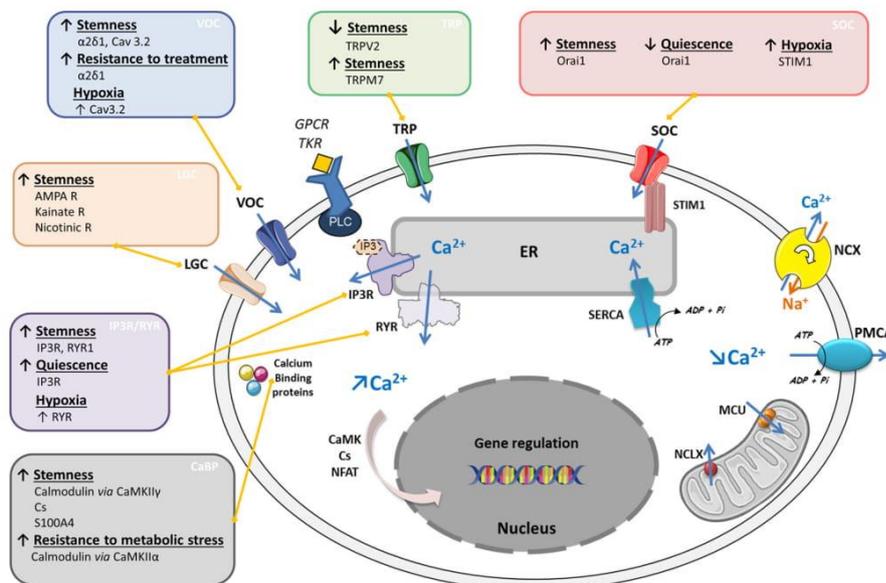


Fig. 2. The Ca²⁺ toolkit in cancer stem cells. Transient rise of intracellular Ca²⁺ leads to regulation of various cellular functions including proliferation and migration. Accordingly, the cells possess a complex toolkit to control intracellular Ca²⁺ fluctuations. Increase of intracellular Ca²⁺ concentrations follows Ca²⁺ entry from the extracellular environment and/or Ca²⁺ release from intracellular reservoirs. Different plasma channels (LGC, VOC, TRPs, and SOC) can induce an entry of extracellular Ca²⁺ into the cell. Endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria, the main reservoirs of Ca²⁺ of the cell can release their Ca²⁺ stock following IP3R or RYR activation for ER and MCU for mitochondria. To ensure a transient rise of Ca²⁺, exchangers and pumps are present at the plasma membrane, NCX and PMCA respectively. SERCA allows replenishing of ER reservoir, and NCLX replenishing of mitochondrion reservoir. Different actors of the Ca²⁺ toolkit regulate CSCs. Plasma membrane channels type LGC (ligand gated channels), VOC (voltage operated channels), TRP (transient receptor potential) channels, SOC (store operated channels),

but also intracellular receptor from the ER IP3R (inositol triphosphate receptor) and RYR (ryanodine receptor) control various properties of CSCs. Moreover, Ca²⁺ binding proteins regulate stemness and resistance of CSC in different type of cancer.

This figure was created using modified Servier Medical Art templates, which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License.

that it corresponds to the $\alpha 2\delta 1$ isoform 5 subunit of VOC. Functional assays showed that the VOC $\alpha 2\delta 1$ subunit supports Ca^{2+} influx into liver CSCs through L- and N-type voltage-gated Ca^{2+} channels and that its blockade dramatically reduces the population of CSCs [79]. Subsequently, analysis of Ca^{2+} channel $\alpha 2\delta 1$ subunit expression performed in cohorts of patients substantiated the relevance of $\alpha 2\delta 1$ as biomarker for diagnosis of hepatocellular carcinoma [80]. The biomarker property of the VOC $\alpha 2\delta 1$ subunit was then extended to CSCs of two other neoplasms, namely small cell- and non-small cell lung cancers [81,82]. Moreover, these studies provided evidences that expression of this VOC alpha-subunit could be tightly linked to CSC resistance to radio- and chemotherapies. Indeed, it was shown that cells expressing the VOC $\alpha 2\delta 1$ subunit in small-cell lung cancer or in non-small-cell lung cancer resist to chemotherapy or radiotherapy respectively [82]. Conversely, blocking $\alpha 2\delta 1$ with a monoclonal antibody sensitized the cells to treatment, suggesting that this antibody may be used to improve the treatment outcome [81].

Other types of VOC have been found in CSCs and correlated with poor prognosis. For instance, the T-type Ca^{2+} channel Cav3.2 that is more expressed in CSCs of glioblastoma (CD133^{pos}) than in either non-CSC-tumor cells or normal tissue represents a main regulator of the CSC population. Pharmacological inhibition of this channel with mibefradil (currently used to treat hypertension) or its shRNA-mediated knock-down was sufficient to reduce the CSC population by promoting CSC differentiation. Noteworthy, mibefradil not only proved as efficient as temozolomide (the current chemotherapy used to treat glioblastoma) in reducing tumor growth in xenografts but exerted an additive effect when combined with temozolomide, resulting in a prolonged survival of mice [83]. Moreover, this study also reported that hypoxia, which favors resistance to anticancer therapies, also leads to increased expression of the VOC Cav3.2 in glioblastoma [83]. CSC resistance to radio- and chemotherapies being a major hurdle in current oncology, these studies suggest that additive treatment targeting VOC could improve current therapies by preventing a resistant population of CSCs to rebuild a tumor despite a successful initial therapy.

3.1.2. Receptor operated channels (ROC) and store-operated channels (SOC)

Ca^{2+} entry occurring after ligand fixation to a transmembrane receptor was originally called Receptor Operated Ca^{2+} Entry (ROCE) and was supposed to be mainly carried by Receptor Operated Channels (ROC). ROCE recorded subsequent to activation of PLC (phospholipase C) are due to activation of tetrameric TRPC (Transient receptor potential canonical) channels, which support a cationic current (Na^+ and Ca^{2+}). Unless directly activated by DAG (diacylglycerol) or its homolog OAG (1-oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol), ROCE recordings by intracellular Ca^{2+} fluorescent probes can be difficult to distinguish from Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE) that also secondarily occurs after PLC activation promoting IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate)-dependent Ca^{2+} release from ER.

Store-operated channels (SOC), largely distributed in both excitable and non-excitable cells, are activated after a partial depletion of ER Ca^{2+} stores, which is sensed by the ER transmembrane protein Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) through an EF hand motif and leads to the opening of SOC at the plasma membrane [84]. The core component of SOCs is constituted of Orai1 homopolymers supporting Ca^{2+} selective currents (I_{CRAC}) firstly identified as CRAC (Ca^{2+} Release-Activated Channels) in T cells [85] and mast cells [86,87] for instance. Depending on the cell type and also on the STIM1 /TRPC channel ratio [88], SOCE and I_{SOCE} can be supported by TRPC tetrameric channels, constituted in particular of TRPC1 and TRPC4 that can interact directly with STIM1 [89,90], cooperate with Orai1 and support a sustained SOCE [91,92]. SOCE is a major mechanism in non-excitable cells that, upon stimulation, finely refills ER Ca^{2+} stores, modulates intracellular Ca^{2+} signals and downstream stimulates Ca^{2+} -dependent intracellular signaling cascades. In normal stem cells of various organs including brain, bone

marrow or heart, SOC control cell proliferation and differentiation [93–97]. Our own studies also strongly suggested that Ca^{2+} entries through SOC control the expansion of the stem cell population by tuning the proportions of symmetric and asymmetric divisions of stem cells [94]. Because stemness and differentiation are essential to sustain malignant growth and propagate the tumor, SOCs have been considered as interesting candidates in CSC stemness. For instance, Lee and collaborators [98] disclosed that Orai1 promotes stemness in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. Specifically, they found that the ALDH^{high} CSC population was indeed enriched in Orai1 proteins when compared to the rest of the bulk. When these tumor cells were transduced with a dominant negative mutant of Orai1, sphere formation and tumor initiation in xenografts were substantially reduced. On the contrary, ectopic expression of Orai1 in non-tumorigenic immortalized oral epithelial cells resulted in increased proliferation, self-renewal and tumor-initiating capacities [98]. Overall, this study performed on oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma suggested that Orai1 and SOCE through activation of NFAT (Nuclear Factor Activated T-cells) signaling pathway might underpin a stemness state in this neoplasm.

Promotion of stemness as well as CSC resistance to anticancer therapies are also known to be favored by the hypoxic conditions present in the CSCs microenvironment. Interestingly, in hepatocarcinoma cells, the hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1) was found to directly control STIM1 transcription and to contribute to SOCE. The STIM1-mediated SOCE, in turn, induced Ca^{2+} signaling pathways that triggered HIF-1 accumulation in hypoxic cells, suggesting a mutual dependency between SOCE and hypoxia [99]. These features suggest that hypoxia and STIM1/Orai1-dependent SOCE could work together in promoting stem cell-like phenotype within the tumor. In support of a role of SOC in CSCs, analysis of the expression of 260 genes involved in Ca^{2+} signaling in brain tumor samples allowed to disclose a set of 6 genes involved in Ca^{2+} entry, including ORAI1, which are highly expressed in glioblastoma tissues or in glioma stem cells but not in normal brain tissues [100]. This suggests that in these highly aggressive brain tumors, Orai1 and SOC, in addition to supporting invasion abilities [101], may play major roles in maintaining or expanding the stem cell population. In line with these observations, a recent study reported that inhibition of SOC channels with SKF-96365 significantly decreased cell proliferation of glioblastoma stem cells, which was associated with a quiescent transcriptomic signature [102]. Of note, greater SOCE amplitude correlated with Orai1, TRPC1 and STIM1 overexpression were also found in endothelial progenitor cells isolated from peripheral blood of patients affected by renal cellular carcinoma, suggesting that SOCE is deregulated in both the tumoral CSCs and the tumoral progenitor cells that participate to the formation of primitive tumor endothelium [103].

3.1.3. Cation channels from the TRP family

Little is known concerning the functions of TRPC channels in CSCs although these channels, when mobilized by activation of PLC pathway, can support SOCE and ROCE.

Among the TRP family, TRPM7 (transient receptor potential melastatin 7) is a ubiquitous Ca^{2+} and Mg^{2+} permeable ion channel that acts both as a ion channel and as a serine/threonine receptor [104]. Of interest a study of Liu et al demonstrated that activation of TRPM7 in glioma cells upregulates the CSC markers ALDH1 and CD133, and promotes proliferation, migration and invasion [105].

A member of the TRPV (transient receptor potential vanilloid) sub-family, TRPV2 channel that is activated by various stimuli, has been evidenced as impairing stemness in CSCs. In accordance, TRPV2 was found to hinder glioblastoma stem cell proliferation and favor their differentiation both in vitro and in vivo [106]. Indeed, glioblastoma stem cell lines displayed a reduced proliferation and a more mature glial phenotype after TRPV2 overexpression. Moreover, tumor xenografts derived from TRPV2-overexpressing glioblastoma CSCs showed a significant reduction in diameter and mitotic index, associated with a differentiated morphology [106]. After this initial demonstration of an

inhibitory role of TRPV2 in brain CSCs, similar results were obtained in liver neoplasms [107]. Hence, human hepatocellular carcinoma tissue displayed an inverse correlation of TRPV2 expression with those of CD133 and CD44. Accordingly, TRPV2 knockdown in human hepatoma HepG2 cell line enhanced colony formation and expression levels of CSC markers whereas TRPV2 expression rescue in TRPV2 knocked-down HepG2 cells restored low levels of CSC markers and abrogated the effect on colony formation. Similarly, overexpression of TRPV2 in the hepatocarcinoma cell line SMMC-7721, that display low levels of the protein, decreased CSC markers and colony formation. In line with these data, TRPV2 pharmacological agonist probenecid was found to diminish tumor growth in xenografted immunocompromised mice [107].

Whereas it is easy to conceive that agonists of the CSC micro-environment can activate receptors coupled to PLC and favor the stem cell population through the activation of Orai and TRPC channels, the extracellular factors that induce the activation of TRPV2 and impair stemness in CSCs remains challenging. The TRPV subfamily comprises channels critically involved in nociception and thermosensing, and functional studies have evidenced that TRPV2 is stimulated by noxious heat, with an activation threshold greater than 52 °C, and by several exogenous chemical ligands [108,109]. Yet, very little is known about its activation mechanism or concerning possible candidates acting as specific or endogenous activators. Some extracellular factors were suggested to have direct effects on TRPV2 gating [110,111], however these mechanisms are not well understood. On the other hand, TRPV2 was proposed to be a growth-factor-regulated channel. In line with this notion, it was described that IGF-1 (insulin like growth factor 1) or platelet-derived growth factor (PDGF), or chemokines induce a dynamic translocation of TRPV2 from intracellular compartments to the plasma membrane through a (phosphoinositide 3-kinase) PI3K-dependent pathway [112,113]. Thus, TRPV2 activity seems to be dependent on regulated plasma membrane targeting of constitutively active channel, which contribute to a steady-state TRPV2-mediated Ca^{2+} entry in response to some extracellular factors found in serum or to focal mechanical stimulation [114]. One can thus envision that these channels could be recruited/activated by factors present in the micro-environment of CSCs or by physical characteristics such as stretch forces and changes in stiffness of the tumor microenvironment, which will counteract stemness on the contrary of SOCE and ROCE activation.

3.1.4. Ligand-gated channels

Ligand-gated channels among which Ca^{2+} -permeable glutamate receptors and nicotinic receptors of acetylcholine have also been associated with CSC stemness. In that respect, high concentrations of functional AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionate) glutamate receptors or kainate receptors were detected in CSCs respectively from glioblastoma or urothelial cancer, as compared to the differentiated tumor cultures consisting of non-stem cells [75,115,116]. Their genetical knockdown resulted in a decreased sphere-forming ability [115]. Besides glutamate receptors, much attention has been focused on nicotinic receptors because incidence of several cancers is highly correlated with cigarette smoking whose addictive product is nicotine. In several neoplasms including non-small cell lung cancer, pancreatic cancers or breast cancers, nicotine through activation of nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), specifically the $\alpha 7$ subunit, fostered stemness gene expression and favored the emergence of a CSC phenotype [117–119]. This effect involved downstream effectors that were cancer tissue-specific. Namely, stimulation of nicotinic receptors in non-small cell lung cancer recruited Yes Associated Protein 1 (Yap1), a transcriptional co-activator and effector of the Hippo signaling pathway, that binds to SOX2 promoter [119] and thereby triggered stemness. In pancreatic cancer cells, cholinergic nicotinic receptors elicited signaling to mitogen-activated protein kinase (MAPK) and FOSL1 [118] whereas they were coupled to PKC (protein kinase C)-Notch pathway in breast cancer cells [117]. A potential role of other

types of nicotinic receptors has also been suggested in glioma CSCs [120].

3.1.5. Plasma membrane pumps and exchangers

Among the Ca^{2+} toolkit, pumps and exchangers play a crucial role by extruding Ca^{2+} thereby ensuring a transient intracellular Ca^{2+} rise. NCX ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger) and PMCA (plasma membrane Ca^{2+} ATPase) role in cancer have already been studied [121,122] but currently, there is only little information about their potential role in CSC. To our knowledge, only a transcriptomic study showed an over-expression of NCX3 in glioblastoma CSCs [100], pointing to the need for further studies on the potential role of these Ca^{2+} toolkit actors in CSC.

3.2. Intracellular Ca^{2+} reservoirs and transporters

Evidence has brought to light a possible involvement of the intracellular Ca^{2+} reservoirs and transporters in CSC stemness control. One of the major pathways leading to a Ca^{2+} signal is Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum (ER) to the cytoplasm, through two related Ca^{2+} release channels incorporated into the ER membrane, namely the ryanodine receptors (RyR) and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3R). IP3Rs and RyRs form Ca^{2+} -release channels composed of 4 subunits with very large regulatory cytoplasmic domain. IP3Rs and RyRs have been described as implicated in numerous diseases (for review [123,124]). Rapid Ca^{2+} release through these channels is regulated by multiple factors that include free Ca^{2+} ion, which can lead to Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. Three different isoforms of RyRs (RyR1, RyR2, RyR3), each encoded by a different gene, have been firstly identified in mammal's skeletal, cardiac and smooth muscles and in brain but recent studies have shown that these receptors are much more widely expressed.

A major role of RyR1 has been disclosed in breast cancer CSCs. In these cells, chemotherapy using carboplatin induced HIF-1 dependent glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1) expression, which was shown to interact with the ryanodine receptor RyR1 and promote Ca^{2+} release [125]. As a consequence, increased cytosolic Ca^{2+} levels activated the intracellular signaling cascade PYK2 (pyruvate kinase 2)/ SRC / STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3), leading to an enhanced expression of pluripotency factors and to an enrichment in the CSC population [125]. Moreover, the knockdown of RyR1 decreased the percentage of ALDH^{pos} CSCs, diminished carboplatin-induced pluripotency factor expression as well as tumor initiation after injection in female SCID mice [125].

A similar role for the Ca^{2+} release channels IP3R has also been suggested in CSC stemness control. IP3R are more widely expressed than RyR, with almost all animal cells expressing at least one of the three IP3R subtypes. Their activation is linked to receptors in the plasma membrane that stimulate PLC, leading to IP3 production. The binding of IP3 to IP3R primes IP3Rs to bind Ca^{2+} , which in turn leads to channel opening. This regulation by Ca^{2+} when IP3 binds to IP3R allows Ca^{2+} release through IP3Rs as well as the propagation of the Ca^{2+} signal by Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in most of the cells. The Ca^{2+} release through IP3R was shown to play an important role in melanoma CSCs. Indeed, impairment of IP3R function in melanoma cells by knock-down of selenoprotein k (SELENOK), a protein that is required for IP3R maturation, reduced Ca^{2+} release and led to a diminution of the CSC population identified by CD133 expression [126]. To confirm these effects in vivo, a transgenic mouse strain that develops spontaneous metastatic melanoma was crossed with SELENOK knockout mice. The littermates that were SELENOK-deficient displayed reduced primary tumor growth on tails and ears, suggesting that Ca^{2+} release through IP3R is required for melanoma stemness and tumor initiation [126]. Thus, Ca^{2+} release from intracellular stores may be crucial for CSC stemness, and this may also involve interplay with channels of the plasma membrane such as SOC, since these channels

can be activated following IP₃-dependent Ca²⁺ release and partial depletion of ER Ca²⁺ stores. Ca²⁺ release and IP₃R also seems to be involved in acquisition of a quiescent phenotype, which is known to allow CSCs escaping from current anti-cancer therapies. In accordance, Zeniou and collaborators identified a selective cytotoxic agent of quiescent glioblastoma CSCs named bisacodyl while seeking for drugs capable of eradicating CSCs through a screening of the chemical Prestwick library [127]. Consecutive studies of the group disclosed that this drug inhibits Ca²⁺ release through IP₃R [128], suggesting that management of Ca²⁺ flux is crucial for maintaining quiescence in CSCs that allows them to resist to chemotherapies.

Another major intracellular organelle involved in Ca²⁺ handling is mitochondria. While a formal demonstration of the role of mitochondrial Ca²⁺ in CSC stemness is still awaiting, it should be underlined that transcriptomic analysis of the Ca²⁺ toolbox highlighted an up-regulated expression of the mitochondrial Ca²⁺ transporter MCU in glioblastoma CSCs [100]. In these cells, it was observed that intracellular Ca²⁺ signals, following activation of SOC, displayed different kinetics with more sustained Ca²⁺ signals in proliferating cells than in quiescent ones [102]. The difference was proposed to be mostly due to difference in Ca²⁺ influx reuptake by mitochondria and mitochondria morphology remodeling.

As for plasma membrane pumps and exchangers, little is known about the involvement of the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) [129] and the mitochondrial sodium calcium exchanger (NCLX) [130] in CSC regulation. A recent study by Park et al. described a role of SERCA in CSC resistance to metabolic stress that is further described in the next paragraph as it was related to a major role of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase [131].

3.3. Ca²⁺-dependent signaling pathways

Ca²⁺ entry and/or Ca²⁺ release through the various Ca²⁺ channels described above result in the increase of intracellular free Ca²⁺ concentration and to the pattern of tightly spatially and temporally regulated intracellular Ca²⁺ signals, which are crucial to differentially activate specific signaling pathways. These latter depend on various Ca²⁺ Binding Proteins (CaBP) that are present in the cytosol, such as calmodulin, calcineurin, PKC, S100 proteins, parvalbumin [132]. Although some of them, like parvalbumin, participate in Ca²⁺ homeostasis by capturing free Ca²⁺, most of CaBP are part of intracellular signaling cascades and are critical for Ca²⁺ signal transduction [133]. Upon binding to Ca²⁺, calmodulin (Ca²⁺ MODULATED protein) modifies its interaction with many effectors, including kinases or phosphatases, that in turn, trigger various signaling pathways. Specifically, calmodulin regulates Ca²⁺ channels like IP₃R and RYR from the ER [134,135] and stimulates calcineurin that subsequently activates MEK/ERK, NFAT or Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) pathways [136]. Among CaMK, the CaMKII that comprises 4 homologs, α , β , γ and δ , has been involved in leukemia [137]. Studies performed on hematological malignancies revealed that CaMKII γ is highly activated in CSC from chronic myeloid leukemia but not in their normal counterpart. Inhibition of CaMKII γ activity by berbamine, a product isolated from traditional Chinese herbal medicine that acts as an ATP-competitive inhibitor of CaMKII γ , eradicated leukemic stem cells [138]. Moreover, CaMKII γ aberrant expression accelerated blast crisis that corresponds to the final deadly phase of chronic myeloid leukemia, indicating that this enzyme is crucial for the progression of this hematological pathology [139]. A few years later, CaMKII γ was also identified in CSCs of liver and lung cancers [140,141]. In these latter, knock-down of CaMKII γ led to diminution of pluripotency transcription factors, sphere formation and tumorigenicity [141]. Whereas CaMKII γ seems involved in the maintenance of a stem cell state, CaMK1D amplification has been implicated in EMT of breast cancer. Indeed, forced overexpression of this protein in non-tumorigenic breast epithelial cells led to phenotypic alterations indicative of EMT, including loss of cell-

cell adhesions and increased cell migration and invasion [142]. Furthermore, the isoform CaMKII α has been found to help CSCs to cope with metabolic stress. Indeed, while analyzing genome-wide transcriptional profiles of human breast cancer cells subjected to glucose deprivation, Park and collaborators unveiled that the Ca²⁺ signaling was one of the most significantly over-represented pathways [143]. These changes in Ca²⁺ toolkit gene expression were accompanied by a decrease in resting cytosolic Ca²⁺ concentration and were associated with increased SERCA2 levels in CSCs as compared to parental cells following glucose deprivation. Dissection of the mechanisms involved showed that glucose deprivation substantially increased phosphorylation of CaMKII α in CSCs. Conversely, knockdown of the gene encoding CaMKII α in CSCs led to reduced levels of SERCA2 (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2) with failure to restore basal intracellular Ca²⁺ levels and in turn, and increased apoptosis of CSCs [131]. Accordingly, these studies suggest that CaMK may control several facets of CSC functions.

Calmodulin can also activate calcineurin, a Ca²⁺-activated protein phosphatase whose substrates include most members of the NFAT family of transcription factors. In colorectal cancers, calcineurin supported the survival and proliferation of CSCs in a NFAT-dependent manner and promoted the development of intestinal tumors in mice [144]. The fact that calcineurin/NFAT signaling is required during the early phases of reprogramming reinforces the possible role of this pathway in stemness maintenance [145].

In addition to Ca²⁺ signaling pathways, the Ca²⁺ binding protein can also control the CSC population. This has been exemplified in glioblastoma where cells with high levels of S100A4 expression were enriched in tumor initiating cells [146]. In addition, selective ablation of S100A4^{POS} cells in genetically engineered mice was sufficient to block tumor growth. Moreover S100A4 knockdown significantly reduced proliferation and self-renewal. [146].

4. Conclusion

The above-mentioned studies point to an emerging role of Ca²⁺ signals in CSC, a specific population of cells that is considered as the root of the tumor. Activity and expression of numbers of Ca²⁺ actors including plasma membrane channels, ER channels and Ca²⁺ binding proteins are positively correlated with CSC stemness in a wide range of tumors. Interestingly, only TRPV2 expression is inversely associated with CSC in glioblastoma, liver neoplasm and hepatocellular carcinoma. In addition to promoting CSC state, most of these channels confer to the cells resistance to current cancer treatments including radiotherapies and large chemotherapies, which target highly proliferative cells. Table 1 and Fig. 2 summarize the major points that we mentioned in this review.

It should however be underlined that the picture may be more complex as the Ca²⁺ toolkit is also remodeled in non-CSC cells from the microenvironment, as for example endothelial progenitors, that in turn, control CSC biological capacities [103,147]. Thus, studies considering the CSCs within their stem cell niche are awaited to consolidate the understanding of fundamental roles supported by the Ca²⁺ toolkit in the tumor. The strategy consisting in using molecules against Ca²⁺ signaling targets to eradicate CSCs still needs some experimental support before efficient clinical use. Yet, it should be mentioned that promising results were obtained with the non-selective small molecule carboxyamidotriazole, which binds to and inhibits non-voltage-operated Ca²⁺ channels, blocking both Ca²⁺ influx into cells and Ca²⁺ release from intracellular stores, and disrupts Ca²⁺-mediated signal transduction. A recent multicenter phase IB trial assessed the clinical potential of a combination of the orally bioavailable carboxyamidotriazole orotate (CTO), with temozolomide against brain cancers. The fact that promising signals of CTO activity in this difficult-to-treat population has been found encourages to keep on studying the roles of Ca²⁺ channels in CSCs [148].

Table 1Ca²⁺ toolkit actors and their role in CSC stemness and resistance to treatment. (+ : stimulates ; - : inhibits ; ↗ : increases).

CSC characteristic	Family	Protein	Impact	Type of Cancer	
Stemness	VOC	α2δ1 subunit	+	lung cancer [81,82] hepatocarcinoma [79]	
		Cav 3.2	+	glioblastoma [83]	
		Orai1	+	glioblastoma [100] oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma [98]	
	TRP	TRPV2	-	glioblastoma [106] liver cancer [107]	
		TRPM7	+	glioblastoma [105]	
	LGC	AMPA R	+	glioblastoma [116]	
		Kainate R	+	urothelial cancer [115]	
		Nicotinic R	+	lung cancer [119] pancreatic cancer [118] breast cancer [117]	
	IP3R/RYR	IP3R	+	glioblastoma [120]	
		RYR1	+	melanoma [126]	
CaBP		CaMKII γ	+	breast cancer [125]	
Resistance to treatment	VOC	Cs	+	chronic myeloid leukemia [138] liver cancer [140] lung cancer [141]	
		S100A4	+	intestinal tumors [144]	
		α2δ1 subunit	+	glioblastoma [146]	
	SOC	Orai1	-	lung cancer [81,82]	
		IP3R/RYR	IP3R	+	glioblastoma [102]
	Hypoxia	VOC	Cav 3.2	↗ expression	glioblastoma [128]
		SOC	STIM1	mutual dependence with HIF1	glioblastoma [83]
	Resistance stress metabolic	IP3R/RYR	RYR1	↗ activity	hepatocarcinoma [99]
		CaBP	CaMKII α	+	breast cancer [125]
					breast cancer [143]

Acknowledgments

This work was supported by CNRS and University of Poitiers, by the European Union and la Ligue Contre le Cancer Comités de la Vienne et des Deux-Sèvres. Elodie Terrié holds a PhD fellowship from Région Nouvelle-Aquitaine.

References

- [1] J. Furth, M.C. Kahn, C. Breedis, The transmission of leukemia of mice with a single cell, *Am. J. Cancer* 31 (1937) 276–282, <https://doi.org/10.1158/ajc.1937.276>.
- [2] G.B. Pierce, C. Wallace, Differentiation of malignant to benign cells, *Cancer Res.* 31 (1971) 127–134.
- [3] A.W. Hamburger, S.E. Salmon, Primary bioassay of human tumor stem cells, *Science*. 197 (1977) 461–463.
- [4] T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M.A. Caligiuri, J.E. Dick, A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice, *Nature*. 367 (1994) 645–648, <https://doi.org/10.1038/367645a0>.
- [5] K.J. Hope, L. Jin, J.E. Dick, Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 738–743, <https://doi.org/10.1038/nri1080>.
- [6] M. Al-Hajj, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, M.F. Clarke, Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 3983–3988, <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>.
- [7] S.A. Bapat, A.M. Mali, C.B. Koppikar, N.K. Kurrey, Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer, *Cancer Res.* 65 (2005) 3025–3029, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3931>.
- [8] A.T. Collins, P.A. Berry, C. Hyde, M.J. Stower, N.J. Maitland, Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells, *Cancer Res.* 65 (2005) 10946–10951, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2018>.
- [9] A. Eramo, F. Lotti, G. Sette, E. Pilozzi, M. Biffoni, A. Di Virgilio, C. Conticello, L. Ruco, C. Peschle, R. De Maria, Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population, *Cell Death Differ.* 15 (2008) 504–514, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402283>.
- [10] D. Fang, T.K. Nguyen, K. Leishear, R. Finko, A.N. Kulp, S. Hotz, P.A. Van Belle, X. Xu, D.E. Elder, M. Herlyn, A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas, *Cancer Res.* 65 (2005) 9328–9337, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1343>.
- [11] C. Li, D.G. Heidt, P. Dalerba, C.F. Burant, L. Zhang, V. Adsay, M. Wicha, M.F. Clarke, D.M. Simeone, Identification of pancreatic cancer stem cells, *Cancer Res.* 67 (2007) 1030–1037, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2030>.
- [12] S. Ma, K.-W. Chan, L. Hu, T.K.-W. Lee, J.Y.-H. Wo, I.O.-L. Ng, B.-J. Zheng, X.-Y. Guan, Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells, *Gastroenterology* 132 (2007) 2542–2556, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.04.025>.
- [13] C.A. O'Brien, A. Pollett, S. Gallinger, J.E. Dick, A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice, *Nature* 445 (2007) 106–110, <https://doi.org/10.1038/nature05372>.
- [14] S.K. Singh, C. Hawkins, I.D. Clarke, J.A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R.M. Henkelman, M.D. Cusimano, P.B. Dirks, Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature* 432 (2004) 396–401, <https://doi.org/10.1038/nature03128>.
- [15] S. Takaishi, T. Okumura, S. Tu, S.S.W. Wang, W. Shibata, R. Vigneshwaran, S.A.K. Gordon, Y. Shimada, T.C. Wang, Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44, stem cells day, Ohio 27 (2009) 1006–1020, <https://doi.org/10.1002/stem.30>.
- [16] E. Battle, H. Clevers, Cancer stem cells revisited, *Nat. Med.* 23 (2017) 1124–1134, <https://doi.org/10.1038/nm.4409>.
- [17] C. van den Hoogen, G. van der Horst, H. Cheung, J.T. Buijs, J.M. Lippitt, N. Guzmán-Ramírez, F.C. Hamdy, C.L. Eaton, G.N. Thalmann, M.G. Cecchini, R.C.M. Pelger, G. van der Pluijm, High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate Cancer, *Cancer Res.* 70 (2010) 5163–5173, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3806>.
- [18] X. Jia, X. Li, Y. Xu, S. Zhang, W. Mou, Y. Liu, Y. Liu, D. Lv, C.-H. Liu, X. Tan, R. Xiang, N. Li, SOX2 promotes tumorigenesis and increases the anti-apoptotic property of human prostate cancer cell, *J. Mol. Cell Biol.* 3 (2011) 230–238, <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr002>.
- [19] I.S. Mohiuddin, S.-J. Wei, M.H. Kang, Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance, *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Basis Dis.* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.005>.
- [20] T. Chiba, K. Kita, Y.-W. Zheng, O. Yokosuka, H. Saisho, A. Iwama, H. Nakauchi, H. Taniguchi, Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties, *Hepatology*. 44 (2006) 240–251, <https://doi.org/10.1002/hep.21227>.
- [21] G. Liu, X. Yuan, Z. Zeng, P. Tunici, H. Ng, I.R. Abdulkadir, L. Lu, D. Irvin, K.L. Black, J.S. Yu, Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma, *Mol. Cancer* (2006) 12.
- [22] P.C. Hermann, S.L. Huber, T. Herrler, A. Aicher, J.W. Ellwart, M. Guba, C.J. Bruns, C. Heeschen, Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer, *Cell Stem Cell* 1 (2007) 313–323, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.002>.
- [23] D. Beier, P. Hau, M. Proescholdt, A. Lohmeier, J. Wischhusen, P.J. Oefner, L. Aigner, A. Brawanski, U. Bogdahn, C.P. Beier, CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles, *Cancer Res.* 67 (2007) 4010–4015, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4180>.
- [24] D. Ponti, A. Costa, N. Zaffaroni, G. Pratesi, G. Petrangolini, D. Coradini, S. Pilotti, M.A. Pierotti, M.G. Daidone, Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties, *Cancer Res.* 65 (2005) 5506–5511, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0626>.
- [25] L. Ricci-Vitiani, D.G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, R. De Maria, Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells, *Nature* 445 (2007) 111–115, <https://doi.org/10.1038/nature05384>.
- [26] S.K. Singh, I.D. Clarke, M. Terasaki, V.E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire, P.B. Dirks, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors, *Cancer Res.* 63 (2003) 5821–5828.

- [27] B. Beck, C. Blanpain, Unravelling cancer stem cell potential, *Nat. Rev. Cancer* 13 (2013) 727–738, <https://doi.org/10.1038/nrc3597>.
- [28] J. Lee, S. Kotliarova, Y. Kotliarov, A. Li, Q. Su, N.M. Donin, S. Pastorino, B.W. Puro, N. Christopher, W. Zhang, J.K. Park, H.A. Fine, 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 (2006) 391–403, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.030>.
- [29] E.O. Vik-Mo, C. Sandberg, M. Joel, B. Stangeland, Y. Watanabe, A. Mackay-Sim, M.C. Moe, W. Murrell, I.A. Langmoen, A comparative study of the structural organization of spheres derived from the adult human subventricular zone and glioblastoma biopsies, *Exp. Cell Res.* 317 (2011) 1049–1059, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.12.022>.
- [30] M.F. Clarke, J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H.M. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, G.M. Wahl, Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR workshop on Cancer stem cells, *Cancer Res.* 66 (2006) 9339–9344, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126>.
- [31] M. Zhang, A. Tsimelzon, C.-H. Chang, C. Fan, A. Wolff, C.M. Perou, S.G. Hilsenbeck, J.M. Rosen, Intratumoral heterogeneity in a Trp53-null mouse model of human breast cancer, *Cancer Discov.* 5 (2015) 520–533, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1101>.
- [32] E. Quintana, M. Shackleton, M.S. Sabel, D.R. Fullen, T.M. Johnson, S.J. Morrison, Efficient tumour formation by single human melanoma cells, *Nature.* 456 (2008) 593–598, <https://doi.org/10.1038/nature07567>.
- [33] J. Chen, Y. Li, T.-S. Yu, R.M. McKay, D.K. Burns, S.G. Kernie, L.F. Parada, A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy, *Nature.* 488 (2012) 522–526, <https://doi.org/10.1038/nature11287>.
- [34] G. Driessens, B. Beck, A. Cauuwe, B.D. Simons, C. Blanpain, Defining the mode of tumour growth by clonal analysis, *Nature.* 488 (2012) 527–530, <https://doi.org/10.1038/nature11344>.
- [35] A.G. Schepers, H.J. Snippert, D.E. Stange, M. van den Born, J.H. van Es, M. van de Wetering, H. Clevers, Lineage tracing reveals Lgr5+ stem cell activity in mouse intestinal adenomas, *Science* 337 (2012) 730–735, <https://doi.org/10.1126/science.1224676>.
- [36] S. Bao, Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, J.N. Rich, Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response, *Nature* 444 (2006) 756–760, <https://doi.org/10.1038/nature05236>.
- [37] M. Diehn, R.W. Cho, N.A. Lobo, T. Kalisky, M.J. Dorie, A.N. Kulp, D. Qian, J.S. Lam, L.E. Ailles, M. Wong, B. Joshua, M.J. Kaplan, I. Wapnir, F.M. Dirbas, G. Somlo, C. Garberoglio, B. Paz, J. Shen, S.K. Lau, S.R. Quake, J.M. Brown, I.L. Weissman, M.F. Clarke, Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells, *Nature.* 458 (2009) 780–783, <https://doi.org/10.1038/nature07733>.
- [38] X. Li, M.T. Lewis, J. Huang, C. Gutierrez, C.K. Osborne, M.-F. Wu, S.G. Hilsenbeck, A. Pavlick, X. Zhang, G.C. Chamness, H. Wong, J. Rosen, J.C. Chang, Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 100 (2008) 672–679, <https://doi.org/10.1093/jnci/djn123>.
- [39] M. Dean, ABC transporters, drug resistance, and cancer stem cells, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 14 (2009) 3–9, <https://doi.org/10.1007/s10911-009-9109-9>.
- [40] L. Cheng, Q. Wu, Z. Huang, O.A. Guryanova, Q. Huang, W. Shou, J.N. Rich, S. Bao, L1CAM regulates DNA damage checkpoint response of glioblastoma stem cells through NBS1, *EMBO J.* 30 (2011) 800–813, <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.10>.
- [41] A.P. Kusumbe, S.A. Bapat, Cancer stem cells and aneuploid populations within developing tumors are the major determinants of tumor dormancy, *Cancer Res.* 69 (2009) 9245–9253, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2802>.
- [42] M.A.G. Essers, A. Trumpp, Targeting leukemic stem cells by breaking their dormancy, *Mol. Oncol.* 4 (2010) 443–450, <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.06.001>.
- [43] S.A. Mani, W. Guo, M.-J. Liao, E.N. Eaton, A. Ayyanan, A.Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C.C. Zhang, M. Shipitsin, L.L. Campbell, K. Polyak, C. Briskin, J. Yang, R.A. Weinberg, The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells, *Cell.* 133 (2008) 704–715, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>.
- [44] A.-P. Morel, M. Lièvre, C. Thomas, G. Hinkal, S. Ansieau, A. Puisieux, Generation of breast Cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition, *PLoS One* 3 (2008) e2888, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>.
- [45] M. Balic, H. Lin, L. Young, D. Hawes, A. Giuliano, G. McNamara, R.H. Datar, R.J. Cote, Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype, *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 5615–5621, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0169>.
- [46] F. Grillet, E. Bayet, O. Villeronce, L. Zappia, E.L. Lagerqvist, S. Lunke, E. Charafe-Jauffret, K. Pham, C. Molck, N. Rolland, J.F. Bourgaux, M. Prudhomme, C. Philippe, S. Bravo, J.C. Boyer, L. Canterel-Thouennon, G.R. Taylor, A. Hsu, J.M. Pascussi, F. Hollande, J. Pannequin, Circulating tumour cells from patients with colorectal cancer have cancer stem cell hallmarks in ex vivo culture, *Gut* 66 (2017) 1802–1810, <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311447>.
- [47] S.M. Dieter, C.R. Ball, C.M. Hoffmann, A. Nowrouzi, F. Herbst, O. Zavidij, U. Abel, A. Arens, W. Weichert, K. Brand, M. Koch, J. Weitz, M. Schmidt, C. von Kalle, H. Glimm, Distinct types of tumor-initiating cells form human colon cancer tumors and metastases, *Cell Stem Cell* 9 (2011) 357–365, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.08.010>.
- [48] A. Kreso, J.E. Dick, Evolution of the cancer stem cell model, *Cell Stem Cell* 14 (2014) 275–291, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>.
- [49] G.Q. Daley, R.A. Van Etten, D. Baltimore, Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome, *Science* 247 (1990) 824–830.
- [50] C. Zhao, J. Blum, A. Chen, H.Y. Kwon, S.H. Jung, J.M. Cook, A. Lagoo, T. Reya, Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo, *Cancer Cell* 12 (2007) 528–541, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.11.003>.
- [51] A.V. Krivtsov, D. Twomey, Z. Feng, M.C. Stubbs, Y. Wang, J. Faber, J.E. Levine, J. Wang, W.C. Hahn, D.G. Gilliland, T.R. Golub, S.A. Armstrong, Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL–AF9, *Nature* 442 (2006) 818–822, <https://doi.org/10.1038/nature04980>.
- [52] S.R. Alcantara Llaguno, Z. Wang, D. Sun, J. Chen, J. Xu, E. Kim, K.J. Hatanpaa, J.M. Raisanen, D.K. Burns, J.E. Johnson, L.F. Parada, Adult lineage-restricted CNS progenitors specify distinct glioblastoma subtypes, *Cancer Cell* 28 (2015) 429–440, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.09.007>.
- [53] T.S. Jacques, A. Swales, M.J. Brzozowski, N.V. Henriquez, J.M. Linehan, Z. Mirzadeh, C.O. Malley, H. Naumann, A. Alvarez-Buylla, S. Brandner, Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes, *EMBO J.* 29 (2010) 222–235, <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.327>.
- [54] Y. Jiang, V.D. Marinescu, Y. Xie, M. Jarvius, N.P. Maturi, C. Haglund, S. Olofsson, N. Lindberg, T. Olofsson, C. Leijonmarck, G. Hesselager, I. Alafuzoff, M. Fryknäs, R. Larsson, S. Nelander, L. Uhrbom, Glioblastoma cell malignancy and drug sensitivity are affected by the cell of origin, *Cell Rep.* 18 (2017) 977–990, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.003>.
- [55] T. Marumoto, A. Tashiro, D. Friedmann-Morvinski, M. Scadeng, Y. Soda, F.H. Gage, I.M. Verma, Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors, *Nat. Med.* 15 (2009) 110–116, <https://doi.org/10.1038/nm.1863>.
- [56] J.H. Lee, J.E. Lee, J.Y. Kahng, S.H. Kim, J.S. Park, S.J. Yoon, J.-Y. Um, W.K. Kim, J.-K. Lee, J. Park, E.H. Kim, J.-H. Lee, J.-H. Lee, W.-S. Chung, Y.S. Ju, S.-H. Park, J.H. Chang, S.-G. Kang, J.H. Lee, Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations, *Nature* 560 (2018) 243–247, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0389-3>.
- [57] D. Friedmann-Morvinski, E.A. Bushong, E. Ke, Y. Soda, T. Marumoto, O. Singer, M.H. Ellisman, I.M. Verma, Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice, *Science* 338 (2012) 1080–1084, <https://doi.org/10.1126/science.1226929>.
- [58] C.L. Chaffer, N.D. Marjanovic, T. Lee, G. Bell, C.G. Kleer, F. Reinhardt, A.C. D'Alessio, R.A. Young, R.A. Weinberg, Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast Cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity, *Cell.* 154 (2013) 61–74, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.005>.
- [59] M. Schober, E. Fuchs, Tumor-initiating stem cells of squamous cell carcinomas and their control by TGF- β and integrin/focal adhesion kinase (FAK) signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 10544–10549, <https://doi.org/10.1073/pnas.1107807108>.
- [60] P.B. Gupta, C.M. Fillmore, G. Jiang, S.D. Shapira, K. Tao, C. Kuperwasser, E.S. Lander, Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells, *Cell.* 146 (2011) 633–644, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.026>.
- [61] E. Quintana, M. Shackleton, H.R. Foster, D.R. Fullen, M.S. Sabel, T.M. Johnson, S.J. Morrison, Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized, *Cancer Cell* 18 (2010) 510–523, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.012>.
- [62] A. Roesch, M. Fukunaga-Kalabis, E.C. Schmidt, S.E. Zabierowski, P.A. Brafford, A. Vultur, D. Basu, P. Gimotty, T. Vogt, M. Herlyn, A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth, *Cell* 141 (2010) 583–594, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.020>.
- [63] D. Iliopoulos, H.A. Hirsch, G. Wang, K. Struhl, Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 1397–1402, <https://doi.org/10.1073/pnas.1018898108>.
- [64] S. Schwitalla, A.A. Fingerle, P. Cammareri, T. Nebelsiek, S.I. Göktena, P.K. Ziegler, O. Canli, J. Heijmans, D.J. Huels, G. Moreaux, R.A. Rupec, M. Gerhard, R. Schmid, N. Barker, H. Clevers, R. Lang, J. Neumann, T. Kirchner, M.M. Taketo, G.R. van den Brink, O.J. Sansom, M.C. Arkan, F.R. Greten, Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties, *Cell* 152 (2013) 25–38, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.012>.
- [65] M. Shimokawa, Y. Ohta, S. Nishikori, M. Matano, A. Takano, M. Fujii, S. Date, S. Sugimoto, T. Kanai, T. Sato, Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells, *Nature* 545 (2017) 187–192, <https://doi.org/10.1038/nature22081>.
- [66] F. de Sousa e Melo, A.V. Kurtova, J.M. Harnoss, N. Kljavin, J.D. Hoecck, J. Hung, J.E. Anderson, E.E. Storm, Z. Modrusan, H. Koepfen, G.J.P. Dijkgraaf, R. Piskol, F.J. de Sauvage, A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer, *Nature* 543 (2017) 676–680, <https://doi.org/10.1038/nature21713>.
- [67] N. Takebe, P.J. Harris, R.Q. Warren, S.P. Ivy, Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8 (2011) 97–106, <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.196>.
- [68] J. Koury, L. Zhong, J. Hao, Targeting signaling pathways in cancer stem cells for Cancer treatment, *Stem Cells Int.* (2017) (2017) 2925869, <https://doi.org/10.1155/2017/2925869>.
- [69] L. Vermeulen, F. De Sousa E. Melo, M. van der Heijden, K. Cameron, J.H. de Jong, T. Borovski, J.B. Tuynman, M. Todaro, C. Merz, H. Rodermond, M.R. Sprick, K. Kemper, D.J. Richel, G. Stassi, J.P. Medema, Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment, *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 468–476, <https://doi.org/10.1038/ncb2048>.
- [70] M.J. Berridge, M.D. Bootman, H.L. Roderick, Calcium: calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 517–529,

- <https://doi.org/10.1038/nrm1155>.
- [71] N. Déliot, B. Constantin, Plasma membrane calcium channels in cancer: alterations and consequences for cell proliferation and migration, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1848 (2015) 2512–2522, <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.06.009>.
- [72] N. Prevarskaya, R. Skryma, Y. Shuba, Ion Channels in Cancer: Are Cancer Hallmarks Oncochannelopathies? *Physiol. Rev.* 98 (2018) 559–621, <https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2016>.
- [73] H.L. Roderick, S.J. Cook, Ca²⁺ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca²⁺ for cancer cell proliferation and survival, *Nat. Rev. Cancer* 8 (2008) 361–375, <https://doi.org/10.1038/nrc2374>.
- [74] M. Bittremieux, J.B. Parys, P. Pinton, G. Bultynck, ER functions of oncogenes and tumor suppressors: modulators of intracellular Ca(2+) signaling, *Biochim. Biophys. Acta* 1863 (2016) 1364–1378, <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2016.01.002>.
- [75] S. Wee, M. Niklasson, V.D. Marinescu, A. Segerman, L. Schmidt, A. Hermansson, P. Dirks, K. Forsberg-Nilsson, B. Westermark, L. Uhrbom, S. Linnarsson, S. Neland, M. Andäng, Selective calcium sensitivity in immature glioma cancer stem cells, *PLoS One* 9 (2014), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115698>.
- [76] F. Wang, A.Y. Wang, C. Chesnelong, Y. Yang, A. Nabbi, S. Thalappilly, V. Alekseev, K. Riabowol, ING5 activity in self-renewal of glioblastoma stem cells via calcium and follicle stimulating hormone pathways, *Oncogene* 37 (2018) 286–301, <https://doi.org/10.1038/s41374-017-324>.
- [77] W.A. Catterall, Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16 (2000) 521–555, <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.16.1.521>.
- [78] W. Bautista, J. Lipschitz, A. McKay, G.Y. Minuk, Cancer stem cells are depolarized relative to normal stem cells derived from human livers, *Ann. Hepatol.* 16 (2017) 297–303, <https://doi.org/10.5604/16652681.1231590>.
- [79] W. Zhao, L. Wang, H. Han, K. Jin, N. Lin, T. Guo, Y. Chen, H. Cheng, F. Lu, W. Fang, Y. Wang, B. Xing, Z. Zhang, 1B50-1, a mAb raised against recurrent tumor cells, targets liver tumor-initiating cells by binding to the calcium channel α 281 subunit, *Cancer Cell* 23 (2013) 541–556, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.025>.
- [80] S. Amhimimid Badr, M. Waheeb Fahmi, M. Mahmoud Nomir, M. Mohammad El-Shishtawy, Calcium channel α 281 subunit as a novel biomarker for diagnosis of hepatocellular carcinoma, *Cancer Biol. Med.* 15 (2018) 52–60, <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0167>.
- [81] X. Sui, J.-H. Geng, Y.-H. Li, G.-Y. Zhu, W.-H. Wang, Calcium channel α 281 subunit (CACNA2D1) enhances radioresistance in cancer stem-like cells in non-small cell lung cancer cell lines, *Cancer Manage. Res.* 10 (2018) 5009–5018, <https://doi.org/10.2147/CMAR.S176084>.
- [82] J. Yu, S. Wang, W. Zhao, J. Duan, Z. Wang, H. Chen, Y. Tian, D. Wang, J. Zhao, T. An, H. Bai, M. Wu, J. Wang, Mechanistic exploration of cancer stem cell marker voltage-dependent calcium channel α 281 subunit-mediated chemotherapy resistance in small-cell lung cancer, *Clin. Cancer Res.* 24 (2018) 2148–2158, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1932>.
- [83] Y. Zhang, N. Cruickshanks, F. Yuan, B. Wang, M. Pahuski, J. Wulfkuhle, I. Gallagher, A.F. Koepfel, S. Hatief, C. Papanicolas, J. Lee, E.E. Bar, D. Schiff, S.D. Turner, E.F. Petricoin, L.S. Gray, R. Abounader, Targetable T-type calcium channels drive glioblastoma, *Cancer Res.* 77 (2017) 3479–3490, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2347>.
- [84] A.B. Parekh, J.W. Putney, Store-operated calcium channels, *Physiol. Rev.* 85 (2005) 757–810, <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>.
- [85] R.S. Lewis, M.D. Cahalan, Mitogen-induced oscillations of cytosolic Ca²⁺ and transmembrane Ca²⁺ current in human leukemic T cells, *Cell Regul.* 1 (1989) 99–112.
- [86] G. Matthews, E. Neher, R. Penner, Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells, *J. Physiol. (Paris)* 418 (1989) 105–130.
- [87] R. Penner, G. Matthews, E. Neher, Regulation of calcium influx by second messengers in rat mast cells, *Nature* 334 (1988) 499–504, <https://doi.org/10.1038/334499a0>.
- [88] K.P. Lee, J.P. Yuan, I. So, P.F. Worley, S. Muallem, STIM1-dependent and STIM1-independent function of transient receptor potential canonical (TRPC) channels tunes their store-operated mode, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 38666–38673, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155036>.
- [89] G.N. Huang, W. Zeng, J.Y. Kim, J.P. Yuan, L. Han, S. Muallem, P.F. Worley, STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, *I_{crac}* and TRPC1 channels, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 1003–1010, <https://doi.org/10.1038/ncb1454>.
- [90] J.P. Yuan, W. Zeng, G.N. Huang, P.F. Worley, S. Muallem, STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 636–645, <https://doi.org/10.1038/ncb1590>.
- [91] D.M. Shin, A. Son, S. Park, M.S. Kim, M. Ahuja, S. Muallem, The TRPCs, Orais and STIMs in ER/PM Junctions, *Adv. Exp. Med. Biol.* 898 (2016) 47–66, https://doi.org/10.1007/978-3-319-26974-0_3.
- [92] I.S. Ambudkar, L.B. de Souza, H.L. Ong, TRPC1, Orail1, and STIM1 in SOCE: Friends in tight spaces, *Cell Calcium* 63 (2017) 33–39, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.12.009>.
- [93] H. Che, G. Li, H.-Y. Sun, G.-S. Xiao, Y. Wang, G.-R. Li, Roles of store-operated Ca²⁺ channels in regulating cell cycling and migration of human cardiac c-kit+ progenitor cells, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 309 (2015) H1772–1781, <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00260.2015>.
- [94] F. Domenichini, E. Terrié, P. Arnault, T. Harnois, C. Magaud, P. Bois, B. Constantin, V. Coronas, Store-operated calcium entries control neural stem cell self-renewal in the adult brain subventricular zone: SOCE and neural stem cells, *Stem Cells* 36 (2018) 761–774, <https://doi.org/10.1002/stem.2786>.
- [95] R. Gopurappilly, B.K. Deb, P. Chakraborty, G. Hasan, Stable STIM1 knockdown in self-renewing human neural precursors promotes premature neural differentiation, *Front. Mol. Neurosci.* 11 (2018), <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00178>.
- [96] S.H. Lee, Y. Park, M. Song, S. Srikanth, S. Kim, M.K. Kang, Y. Gwack, N.-H. Park, R.H. Kim, K.-H. Shin, Orail1 mediates osteogenic differentiation via BMP signaling pathway in bone marrow mesenchymal stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473 (2016) 1309–1314, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.04.068>.
- [97] A. Somasundaram, A.K. Shum, H.J. McBride, J.A. Kessler, S. Feske, R.J. Miller, M. Prakriya, Store-operated CRAC channels regulate gene expression and proliferation in neural progenitor cells, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34 (2014) 9107–9123, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0263-14.2014>.
- [98] S.H. Lee, N.K. Rigas, C.-R. Lee, A. Bang, S. Srikanth, Y. Gwack, M.K. Kang, R.H. Kim, N.-H. Park, K.-H. Shin, Orail1 promotes tumor progression by enhancing cancer stemness via NFAT signaling in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma, *Oncotarget* 7 (2016), <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9755>.
- [99] Y. Li, B. Guo, Q. Xie, D. Ye, D. Zhang, Y. Zhu, H. Chen, B. Zhu, STIM1 mediates hypoxia-driven hepatocarcinogenesis via interaction with HIF-1, *Cell Rep.* 12 (2015) 388–395, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.06.033>.
- [100] N. Robil, F. Petel, M.-C. Kilhoffer, J. Haiech, Glioblastoma and calcium signaling - analysis of calcium toolbox expression, *Int. J. Dev. Biol.* 59 (2015) 407–415, <https://doi.org/10.1387/ijdb.150200jh>.
- [101] R.K. Motiani, M.C. Hyzinski-García, X. Zhang, M.M. Henkel, I.F. Abdullaev, Y.-H. Kuo, K. Matrougui, A.A. Mongin, M. Trebak, STIM1 and Orail1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion, *Pflüger. Arch. Eur. J. Physiol.* 465 (2013) 1249–1260, <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1254-8>.
- [102] F.J. Aulestia, I. Néant, J. Dong, J. Haiech, M.-C. Kilhoffer, M. Moreau, C. Leclerc, Quiescence status of glioblastoma stem-like cells involves remodelling of Ca²⁺ signalling and mitochondrial shape, *Sci. Rep.* 8 (2018), <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28157-8>.
- [103] F. Lodola, U. Laforenza, E. Bonetti, D. Lim, S. Dragoni, C. Bottino, H.L. Ong, G. Guerra, C. Ganini, M. Massa, M. Manzoni, I.S. Ambudkar, A.A. Genazzani, V. Rosti, P. Pedrazzoli, F. Tanzi, F. Moccia, C. Porta, Store-operated Ca²⁺ entry is remodelled and controls in vitro angiogenesis in endothelial progenitor cells isolated from tumoral patients, *PLoS One* 7 (2012) e42541, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042541>.
- [104] L.W. Runnels, TRPM6 and TRPM7: a Mul-TRP-PLIK-cation of channel functions, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12 (2011) 42–53.
- [105] M. Liu, K. Inoue, T. Leng, S. Guo, Z. Xiong, TRPM7 channels regulate glioma stem cell through STAT3 and Notch signaling pathways, *Cell. Signal.* 26 (2014) 2773–2781, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.08.020>.
- [106] M.B. Morelli, M. Nabissi, C. Amantini, V. Farfariello, L. Ricci-Vitiani, S. di Martino, R. Pallini, L.M. Larocca, S. Caprodossi, M. Santoni, R.D. Maria, G. Santoni, The transient receptor potential vanilloid-2 cation channel impairs glioblastoma stem-like cell proliferation and promotes differentiation, *Int. J. Cancer* 131 (2012) E1067–E1077, <https://doi.org/10.1002/ijc.27588>.
- [107] Z. Hu, X. Cao, Y. Fang, G. Liu, C. Xie, K. Qian, X. Lei, Z. Cao, H. Du, X. Cheng, X. Xu, Transient receptor potential vanilloid-type 2 targeting on stemness in liver cancer, *Biomed. Pharmacother.* 105 (2018) 697–706, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.029>.
- [108] K. Shibasaki, Physiological significance of TRPV2 as a mechanosensor, thermosensor and lipid sensor, *J. Physiol. Sci.* 66 (2016) 359–365, <https://doi.org/10.1007/s12576-016-0434-7>.
- [109] B. Nilius, T. Voets, TRP channels: a TR(P) through a world of multifunctional cation channels, *Pflügers Archiv - Eur. J. Physiol.* 451 (2005) 1–10, <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1462-y>.
- [110] A. Penna, V. Juvin, J. Chemin, V. Compan, M. Monet, F.-A. Rassendren, PI3-kinase promotes TRPV2 activity independently of channel translocation to the plasma membrane, *Cell Calcium* 39 (2006) 495–507, <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.01.009>.
- [111] M.R. Cohen, K.W. Huynh, D. Cawley, V.Y. Moiseenkova-Bell, Understanding the cellular function of TRPV2 channel through generation of specific monoclonal antibodies, *PLoS One* 8 (2013) e85392, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085392>.
- [112] M. Kanzaki, Y.Q. Zhang, H. Mashima, I. Li, H. Shibata, I. Kojima, Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I, *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 165–170, <https://doi.org/10.1038/11086>.
- [113] M. Nagasawa, Y. Nakagawa, S. Tanaka, I. Kojima, Chemotactic peptide fMetLeuPhe induces translocation of the TRPV2 channel in macrophages, *J. Cell. Physiol.* 210 (2007) 692–702, <https://doi.org/10.1002/jcp.20883>.
- [114] M. Nagasawa, I. Kojima, Translocation of TRPV2 channel induced by focal administration of mechanical stress, *Physiol. Rep.* (2015) e12296, <https://doi.org/10.14814/phy2.12296> (ISSN)2051-817X(CAT)JapaneseResearch(VI) V4.
- [115] R. Inoue, Y. Hirohashi, H. Kitamura, S. Nishida, A. Murai, A. Takaya, E. Yamamoto, M. Matsuki, T. Tanaka, T. Kubo, M. Nakatsugawa, T. Kanaseki, T. Tsukahara, N. Sato, N. Masumori, T. Torioe, GRIK2 has a role in the maintenance of urothelial carcinoma stem-like cells, and its expression is associated with poorer prognosis, *Oncotarget* 8 (2017) 28826–28839, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16259>.
- [116] M.C. Oh, J.M. Kim, M. Safaei, G. Kaur, M.Z. Sun, R. Kaur, A. Celli, T.M. Mauro, A.T. Parsa, Overexpression of calcium-permeable glutamate receptors in glioblastoma derived brain tumor initiating cells, *PLoS One* 7 (2012) e47846, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047846>.
- [117] N. Hirata, Y. Sekino, Y. Kanda, Nicotine increases cancer stem cell population in

- MCF-7 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 403 (2010) 138–143, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.10.134>.
- [118] R.K. Nimmakayala, P. Seshacharyulu, I. Lakshmanan, S. Rachagani, S. Chugh, S. Karmakar, S. Rauth, R. Vengoji, P. Atri, G.A. Talmon, S.M. Lele, L.M. Smith, I. Thapa, D. Bastola, M.M. Ouellette, S.K. Batra, M.P. Ponnusamy, Cigarette smoke induces stem cell features of pancreatic Cancer cells via PAF1, *Gastroenterology* 155 (2018) 892–908, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.05.041> e6.
- [119] C.M. Schaal, N. Bora-Singhal, D.M. Kumar, S.P. Chellappan, Regulation of Sox2 and stemness by nicotine and electronic-cigarettes in non-small cell lung cancer, *Mol. Cancer* 17 (2018) 149, <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0901-2>.
- [120] R. Spina, D.M. Voss, L. Asnagli, A. Sloan, E.E. Bar, Atracurium Besylate and other neuromuscular blocking agents promote astroglial differentiation and deplete glioblastoma stem cells, *Oncotarget* 7 (2016) 459–472, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6314>.
- [121] T. Rodrigues, G.N.N. Estevez, I.L.D.S. Tersariol, Na⁺/Ca²⁺ exchangers: Unexploited opportunities for cancer therapy? *Biochem. Pharmacol.* 163 (2019) 357–361, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.032>.
- [122] S.J. Roberts-Thomson, M.C. Curry, G.R. Monteith, Plasma membrane calcium pumps and their emerging roles in cancer, *World J. Biol. Chem.* 1 (2010) 248–253, <https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i8.248>.
- [123] K. Mikoshiba, Role of IP3 receptor signaling in cell functions and diseases, *Adv. Biol. Regul.* 57 (2015) 217–227, <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.10.001>.
- [124] G. Santulli, D. Lewis, A. des Georges, A.R. Marks, J. Frank, Ryanodine receptor structure and function in health and disease, *Subcell. Biochem.* 87 (2018) 329, https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_11.
- [125] H. Lu, I. Chen, L.A. Shimoda, Y. Park, C. Zhang, L. Tran, H. Zhang, G.L. Semenza, Chemotherapy-induced Ca²⁺ release stimulates breast cancer stem cell enrichment, *Cell Rep.* 18 (2017) 1946–1957, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.001>.
- [126] M.P. Marciel, V.S. Khadka, Y. Deng, P. Kilicaslan, A. Pham, P. Bertino, K. Lee, S. Chen, N. Glibetic, F.W. Hoffmann, M.L. Matter, P.R. Hoffmann, M.P. Marciel, V.S. Khadka, Y. Deng, P. Kilicaslan, A. Pham, P. Bertino, K. Lee, S. Chen, N. Glibetic, F.W. Hoffmann, M.L. Matter, P.R. Hoffmann, Selenoprotein K deficiency inhibits melanoma by reducing calcium flux required for tumor growth and metastasis, *Oncotarget* 9 (2018) 13407–13422, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24388>.
- [127] M. Zeniou, M. Fève, S. Mameri, J. Dong, C. Salomé, W. Chen, E.A. El-Habr, F. Bousson, M. Sy, J. Obszynski, A. Boh, P. Villa, S.A. Kahn, B. Didier, D. Bagnard, M.-P. Junier, H. Chneiweiss, J. Haiech, M. Hibert, M.-C. Kilhoffer, Chemical library screening and structure-function relationship studies identify Bisacodyl as a potent and selective cytotoxic agent towards quiescent human glioblastoma tumor stem-like cells, *PLoS One* 10 (2015) e0134793, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134793>.
- [128] J. Dong, F.J. Aulestia, S. Assad Kahn, M. Zeniou, L.G. Dubois, E.A. El-Habr, F. Daubeuf, N. Tounsi, S.H. Cheshier, N. Frossard, M.-P. Junier, H. Chneiweiss, I. Néant, M. Moreau, C. Leclerc, J. Haiech, M.-C. Kilhoffer, Bisacodyl and its cytotoxic activity on human glioblastoma stem-like cells. Implication of inositol 1,4,5-triphosphate receptor dependent calcium signaling, *Biochim. Biophys. Acta BBA Mol. Cell Res* 1864 (2017) 1018–1027, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.01.010>.
- [129] I. Altshuler, J.J. Vaillant, S. Xu, M.E. Cristescu, The evolutionary history of sarco (endoplasmic calcium ATPase (SERCA)), *PLoS One* 7 (2012) e52617, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052617>.
- [130] T.S. Luongo, J.P. Lambert, P. Gross, M. Nwokedi, A.A. Lombardi, S. Shanmughapriya, A.C. Carpenter, D. Kolmetzky, E. Gao, J.H. van Berlo, E.J. Tsai, J.D. Molkenin, X. Chen, M. Madesh, S.R. Houser, J.W. Elrod, The mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger is essential for Ca²⁺ homeostasis and viability, *Nature* 545 (2017) 93–97, <https://doi.org/10.1038/nature22082>.
- [131] K.C. Park, S.W. Kim, J.Y. Jeon, A.R. Jo, H.J. Choi, J. Kim, H.G. Lee, Y. Kim, G.B. Mills, S.H. Noh, M.G. Lee, E.S. Park, J.-H. Cheong, Survival of cancer stem-like cells under metabolic stress via CaMK2 α -mediated upregulation of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase expression, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 24 (2018) 1677–1690, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2219>.
- [132] M. Yáñez, J. Gil-Longo, M. Campos-Toimil, Calcium binding proteins, *Adv. Exp. Med. Biol.* 740 (2012) 461–482, https://doi.org/10.1007/978-94-007-2888-2_19.
- [133] B. Schwaller, Cytosolic Ca²⁺ buffers, cold spring harb, *Perspect. Biol. Med.* 2 (2010) a004051, <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004051>.
- [134] G.G. Rodney, G.M. Wilson, M.F. Schneider, A calmodulin binding domain of RyR increases activation of spontaneous Ca²⁺ sparks in frog skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 11713–11722, <https://doi.org/10.1074/jbc.M408189200>.
- [135] N.K. Nadif, G. Bultynck, I. Sienaert, G. Callewaert, C. Erneux, L. Missiaen, J.B. Parys, H.S. De, The role of calmodulin for inositol 1,4,5-triphosphate receptor function, *Biochim. Biophys. Acta* 1600 (2002) 19–31, [https://doi.org/10.1016/S1570-9639\(02\)00440-5](https://doi.org/10.1016/S1570-9639(02)00440-5).
- [136] P.G. Hogan, L. Chen, J. Nardone, A. Rao, Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT, *Genes Dev.* 17 (2003) 2205–2232, <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>.
- [137] J.M. Shifman, M.H. Choi, S. Mihalas, S.L. Mayo, M.B. Kennedy, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) is activated by calmodulin with two bound calciums, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 13968–13973, <https://doi.org/10.1073/pnas.0606433103>.
- [138] Y. Gu, T. Chen, Z. Meng, Y. Gan, X. Xu, G. Lou, H. Li, X. Gan, H. Zhou, J. Tang, G. Xu, L. Huang, X. Zhang, Y. Fang, K. Wang, S. Zheng, W. Huang, R. Xu, γ CaMKII, A critical regulator of CML stem/progenitor cells, is a target of the natural product berbamine, *Blood* 120 (2012) 4829–4839, <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-434894>.
- [139] Y. Gu, W. Zheng, J. Zhang, X. Gan, X. Ma, Z. Meng, T. Chen, X. Lu, Z. Wu, W. Huang, R. Xu, Aberrant activation of CaMKII γ accelerates chronic myeloid leukemia blast crisis, *Leukemia* 30 (2016) 1282–1289, <https://doi.org/10.1038/leu.2016.53>.
- [140] Z. Meng, T. Li, X. Ma, X. Wang, C. Van Ness, Y. Gan, H. Zhou, J. Tang, G. Lou, Y. Wang, J. Wu, Y. Yen, R. Xu, W. Huang, Berbamine inhibits the growth of liver cancer cells and cancer-initiating cells by targeting Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II, *Mol. Cancer Ther.* 12 (2013) 2067–2077, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0314>.
- [141] S. Chai, X. Xu, Y. Wang, Y. Zhou, C. Zhang, Y. Yang, Y. Yang, H. Xu, R. Xu, K. Wang, S. Chai, X. Xu, Y. Wang, Y. Zhou, C. Zhang, Y. Yang, Y. Yang, H. Xu, R. Xu, K. Wang, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II γ enhances stem-like traits and tumorigenicity of lung cancer cells, *Oncotarget* 6 (2015) 16069–16083, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3866>.
- [142] A. Bergamaschi, Y.H. Kim, K.A. Kwei, Y. La Choi, M. Bocanegra, A. Langerød, W. Han, D.-Y. Noh, D.G. Huntsman, S.S. Jeffrey, A.-L. Borresen-Dale, J.R. Pollack, CAMK1D amplification implicated in epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer, *Mol. Oncol.* 2 (2008) 327–339, <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2008.09.004>.
- [143] K.C. Park, S.W. Kim, J.Y. Jeon, A.R. Jo, H.J. Choi, J. Kim, H.G. Lee, Y. Kim, G.B. Mills, S.H. Noh, M.G. Lee, E.S. Park, J.-H. Cheong, Survival of Cancer Stem-Like cells under metabolic stress via CaMK2 α -mediated upregulation of Sarco/Endoplasmic reticulum calcium ATPase expression, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 24 (2018) 1677–1690, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2219>.
- [144] K. Peuker, S. Muff, J. Wang, S. Künzel, E. Bosse, Y. Zeissig, G. Luzzi, M. Basic, A. Strigli, A. Ulbricht, A. Kaser, A. Arlt, T. Chavakis, G.R. van den Brink, C. Schafmayer, J.-H. Egberts, T. Becker, M.E. Bianchi, A. Bleich, C. Röcken, J. Hampe, S. Schreiber, J.F. Baines, R.S. Blumberg, S. Zeissig, Epithelial calcineurin controls microbiota-dependent intestinal tumor development, *Nat. Med.* 22 (2016) 506–515, <https://doi.org/10.1038/nm.4072>.
- [145] S. Khodeer, T. Era, Identifying the biphasic role of calcineurin/NFAT signaling enables replacement of Sox2 in somatic cell reprogramming, *Stem Cells Dayt. Ohio.* 35 (2017) 1162–1175, <https://doi.org/10.1002/stem.2572>.
- [146] K.-H. Chow, H.J. Park, J. George, K. Yamamoto, A.D. Gallup, J.H. Graber, Y. Chen, W. Jiang, D.A. Steindler, E.G. Neilson, B.Y.S. Kim, K. Yun, S100A4 is a biomarker and regulator of glioma stem cells that is critical for mesenchymal transition in glioblastoma, *Cancer Res.* 77 (2017) 5360–5373, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1294>.
- [147] P. Tripathi, Y. Wang, M. Coussens, K.R. Manda, A.M. Casey, C. Lin, E. Poyo, J.D. Pfeifer, N. Basappa, C.M. Bates, L. Ma, H. Zhang, M. Pan, L. Ding, F. Chen, Activation of NFAT signaling establishes a tumorigenic microenvironment through cell autonomous and non-cell autonomous mechanisms, *Oncogene* 33 (2014) 1840–1849, <https://doi.org/10.1038/onc.2013.132>.
- [148] A. Omuro, K. Beal, K. McNeill, R.J. Young, A. Thomas, X. Lin, R. Terziev, T.J. Kaley, L.M. DeAngelis, M. Daras, I.T. Gavrilovic, I. Mellinghoff, E.L. Diamond, A. McKeown, M. Manne, A. Caterfino, K. Patel, L. Bavisotto, G. Gorman, M. Lamson, P. Gutin, V. Tabar, D. Chakravarty, T.A. Chan, C.W. Brennan, E. Garrett-Mayer, R.A. Karmali, E. Pentsova, Multicenter phase IB trial of carboxyamidotriazole orotate and temozolomide for recurrent and newly diagnosed glioblastoma and other anaplastic gliomas, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 36 (2018) 1702–1709, <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.76.9992>.

Annexe 2

**Neural stem cell self-renewal
stimulation by store-operated calcium
entries of adult mouse area postrema:
influence of leptin.**

Article en préparation

Title: Neural stem cell self-renewal stimulation by store-operated calcium entries of adult mouse area postrema: influence of leptin.

Authors: Cyrine Ben Dhaou^{1*}, Elodie Terrié^{2*}, Thomas Harnois², Patricia Arnault², Bruno Constantin², Emmanuel Moyses^{1#} and Valérie Coronas^{2#}

* : co-first author

: co-last author

Institutions:

1. University of Tours, INRA Centre Val-de-Loire UMR-85, CNRS UMR-1247, Physiologie de la Reproduction et Comportements, FRANCE.
2. University of Poitiers, CNRS ERL 7003, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, 86073 Poitiers cedex 09, FRANCE.

Corresponding Author: Prof Valérie Coronas (PhD), University of Poitiers, CNRS ERL 7003, Signalisation et Transports Ioniques Membranaires, Bat B36, 1 rue Georges Bonnet- TSA 51 106, 86073 Poitiers cedex 09, FRANCE

valerie.coronas@univ-poitiers.fr,

tel: 33 (0)5 49 45 36 55; fax: 33 (0)5 49 45 40 14

Running title: SOC and stem cell self-renewal in area postrema

Abbreviations used: BrdU: bromodeoxyuridine; EGF: Epidermal Growth Factor; FGF: Fibroblast Growth Factor; NSC: neural stem cell; PBS: phosphate buffer saline; SERCA: sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase; SOC: Store-Operated Channel; STIM: Stromal Interaction Molecule; TRPC: Transient Receptor Potential Canonical.

ABSTRACT

In the brain of adult mammals, neural stem cells (NSC) persist in specific brain germinative niches and sustain neurogenesis throughout life. In addition to the two major stem cell niches of the subventricular zone and hippocampal dentate gyrus, area postrema located in the brainstem has recently been identified as a neurogenic area. NSC are regulated by signals of the microenvironment that adjust stem cells response to the needs of the organism. Evidence accumulated during the last decade points to a possible regulatory role of ion channels over postnatal neurogenesis. Recent data suggest that calcium-signalling pathway may be pivotal for NSC maintenance

In this study, we explored the presence and the roles of a subset of calcium channels, the store-operated calcium channels (SOC) that have the ability to transduce extracellular signals in calcium signals, in NSC from area postrema. Our data show that NSC derived from area postrema express TRPC1 and Orai1, known to form SOC, as well as their activator STIM1. Calcium imaging indicated that NSC display store-operated calcium entries (SOCE). Pharmacological blockade of SOCE with SKF-96365 or YM-58483 resulted in decreased proliferation and self-renewal of NSC, indicating a major of SOC in the maintenance of NSC activity. Furthermore, our results provide evidence that the adipose tissue-derived hormone leptin whose ability to control energy homeostasis depends on area postrema, decreased SOCE and reduced self-renewal of NSC derived from area postrema.

As aberrant functioning of SOC has been linked to a growing number of diseases, including brain disorders, our study showing that SOC are major actors in the control of NSC activities open new perspectives for physiopathological functions of NSC.

Key words: adult stem cells, calcium flux, nervous system, neural stem cell (NSC), self-renewal, stem cells, neurogenesis/neural regeneration, stem cell niche, leptin, area postrema, circumventricular organ, calcium, calcium signaling

INTRODUCTION

Neural stem cells (NSC) reside in defined niches in the adult brain where they produce new neurons and glial cells throughout life (Kumar et al., 2019). In addition to the two major stem cell niches of the subventricular zone and hippocampal dentate gyrus, area postrema that is a circumventricular organ located in the brainstem, has recently been identified as a neurogenic area that contains NSC serving as a homeostatic source for new neurons and glial cells (Bauer et al., 2005; Furube et al., 2015; Bennett et al., 2009). Like those from the major neurogenic niches, stem cells from area postrema express the classical NSC markers Sox2 and nestin, the class III intermediate filament protein vimentin as well as GFAP (Pecchi et al., 2007). *In vitro*, NSC from area postrema display the ability to proliferate and give rise to neurons and glial cells (Bennett et al., 2009; Charrier et al., 2006). *In vivo*, they give birth to new neurons and glial cells under intact physiological conditions (Bauer et al., 2005) and they are recruited by brain lesions (Sanin et al., 2013), as expected for a stem cell residing in the brain. It should be underlined that a fivefold increase of the number of Ki67-expressing proliferating cells within area postrema has been observed in the brains of stroke patients, suggesting that NSC in the area postrema may contribute to neurogenesis and plasticity in the human brain following injury (Sanin et al., 2013). Also, NSCs activity in area postrema is regulated by various extracellular physiological signals as for example the satiating hormone amylin (Liberini et al., 2016) that promotes neurogenesis while stress decreases NSC activity in this area (Chigr et al., 2009).

Ca²⁺ as an intracellular second messenger controls a remarkable diversity of biological processes occurring throughout life, including genesis and homeostasis of organs and tissues (Berridge et al., 2003). One of the primary sources of Ca²⁺ signals in a wide variety of cells and particularly in non-excitabile cells is the Ca²⁺ entry through store-operated calcium channels

(SOC). SOC are so named because they are activated by the emptying of intracellular Ca^{2+} stores (Parekh and Putney, 2005). Located within the plasma membrane, SOC are mainly formed of Orai1 and TRPC1 and are activated by STIM1 that is located in the membrane of the endoplasmic reticulum where it acts as a Ca^{2+} sensor (see supplementary Figure 1). Ca^{2+} entry through SOC is triggered after stimulation of cell surface receptors that through G proteins or a tyrosine kinase cascade activate phospholipase C to produce inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3). IP_3 interacts with its receptors in the endoplasmic reticulum membrane and induces Ca^{2+} release. The subsequent decrease of endoplasmic reticulum Ca^{2+} content is sensed by STIM1 that oligomerizes and activates SOC thereby inducing a Ca^{2+} entry, called store-operated calcium entry (Albarran et al., 2016; Prakriya and Lewis, 2015). This Ca^{2+} influx not only provides Ca^{2+} to refill the endoplasmic reticulum after Ca^{2+} has been released and pumped out of the cell but also and importantly, drives a wide set of biological processes by elevating for minutes to hours the cytosolic Ca^{2+} concentration. This long-lasting Ca^{2+} signal allows the recruitment of cellular effectors.

Accordingly, SOC serve pleiotropic cell functions in various cell types as for example endothelial cell proliferation (Dragoni et al., 2011), lymphocyte proliferation (Vaeth et al., 2017), keratinocyte differentiation (Darbellay et al., 2009; Vandenberghe et al., 2013), mesenchymal stem cell migration (Peng et al., 2016) or skeletal muscle development (Louis et al., 2008). Patients with Orai1 deficiency as well as Orai1 knockout mice display severe immune defects along with impairments in skeletal muscle development and alterations in hair cell function or skin integrity (Feske, 2010; Feske et al., 2006; Gwack et al., 2008). TRPC1 also plays major roles in maintenance of tissues as its genetic invalidation in mice leads to major defects of regeneration of damaged muscle or intestinal mucosa (Rao et al., 2010; Zanou et al., 2012). In the brain, pharmacological or genetic alterations of SOC decrease proliferation of neural progenitors in the major neurogenic niche of the subventricular zone (Domenichini et

al., 2018; Somasundaram et al., 2014). Because NSCs from the different neurogenic brain areas display specific responses to extracellular signals (Garofalo and Surmacz, 2006; Garza et al., 2008; Segura et al., 2015), we undertook this study to determine whether SOCs may represent a common regulatory mechanism in NSCs of the adult brain. To this aim, we addressed the presence and the role of SOCs in the control of area postrema NSC activity. Furthermore, as area postrema is a major centre for food intake control and a target of leptin, we determined the impact of the hormone adipose tissue-derived hormone leptin that controls energy homeostasis (Hayes et al., 2016).

MATERIALS AND METHODS

Animals. Experiments were performed on C57BL/6J mice. Animals were housed in animal care facilities (PREBIOS, University of Poitiers ; UEPAO, Centre INRA of Tours). Experimental procedures were carried out in accordance with the guidelines of the French Ministry of Agriculture and the European Communities Council Directive and validated by the Regional Ethical Committee (Authorization n°02184.01)

Solutions and chemicals. SKF-96365 and YM-58483 (BTP2) were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Louis, USA) and dissolved in water and DMSO respectively. GSK-7975A from Aobious was dissolved in DMSO. Leptin was purchased from R&D Systems (Minneapolis, USA) and dissolved in water. Cell culture media and growth factors were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Area postrema neural stem cell cultures. Area postrema was microdissected out of C57BL/6J mice brains, incubated in accutase for 15 minutes and then mechanically dissociated as single cells that were grown in DMEM-F12 supplemented with B27 and with 20 ng.ml⁻¹ EGF and 10 ng.ml⁻¹ FGF2. Neurospheres were obtained after one week *in vitro*. For replating, neurospheres were collected, mechanically dissociated as single cells and seeded to obtain secondary neurospheres that were used for calcium imaging, RT-PCR, western blotting, immunostaining and cell proliferation assays.

RT-PCR. Total RNA was extracted and reverse-transcribed from area postrema neurospheres with a single-procedure kit for small numbers of cells: the RT SuperScript VILO™ (Invitrogen 11754050, BioRad 1708897) supplemented with RNaseOUT (Invitrogen 10777-019) following manufacturer's instructions. The primers and RT-PCR protocols are provided in Table 1 and Table 2

Western-blot. For western blotting analysis, area postrema neurospheres were lysed in Laemmli loading buffer (Sigma Aldrich) and heat denatured at 95°C for 5 minutes. The samples and control samples formed of lysates derived from subventricular zone neurospheres were resolved in a 9% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel along with prestained standards molecular weight markers (BioRad Laboratories, Hercules, CA). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (0.20 µm-pore size; GE Healthcare, Little Chalfont, UK), using a miniprotean electroblotter (BioRad Laboratories). After three washes in TBS (20 mmol.l⁻¹ TRIS-HCl, 150 mmol.l⁻¹ NaCl, pH 7.5) containing 0.1% (volume/volume) Tween 20 (TBS-Tween), immunoblots were probed overnight at 4°C in TBS-Tween with 3% (weight/volume) fat milk with either polyclonal rabbit anti-Orai1 (H-46, Santa Cruz Biotechnology, Dallas,

Texas, USA; $0.4 \mu\text{g.ml}^{-1}$), or monoclonal mouse anti-TRPC1 (E-6, Santa Cruz Biotechnology; $0.4 \mu\text{g.ml}^{-1}$), or monoclonal mouse anti-STIM1 (GOK 610954, BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA; $0.4 \mu\text{g.ml}^{-1}$), or polyclonal rabbit anti-actin (Sigma Aldrich; 1/5000). Membranes were then incubated for 1 hour at 4°C with anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin-HRP-linked (1/5000; GE Healthcare) before detection of bound antibodies by using enhanced chemiluminescence system ECL (Immobilon, Millipore, Billerica, MA, USA). Results were analyzed with GeneGnome XRQ (SYNGENE Ozyme, Cambridge, UK).

Immunostaining. Immunostainings were performed both on area postrema neurospheres thrown on glass slides with a cytospin and fixed in methanol at -20°C and on mice brain sections. For brain sections, mice were deeply anaesthetized and transcardially perfused with a 0.9% NaCl solution followed by a phosphate-buffered 4 % paraformaldehyde solution. Brains were removed, post-fixed for 1 hour at 4°C , and cryoprotected in a phosphate-buffered 30% sucrose solution at 4°C overnight before cutting $20 \mu\text{m}$ -thick sections in a cryostat (Leica 2500).

For immunostaining, the preparations were permeabilized and non specific binding sites were blocked before incubating with polyclonal goat anti-SOX2 (Santa Cruz Biotechnology; $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$) or monoclonal mouse anti SOX2 (Santa Cruz Biotechnology; $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$) along with one of the following antibodies : polyclonal rabbit anti-Orai1 (Santa Cruz Biotechnology; $0.4 \mu\text{g.ml}^{-1}$), or monoclonal mouse anti-TRPC1 (Santa Cruz Biotechnology; $0.4 \mu\text{g.ml}^{-1}$), or monoclonal mouse anti-STIM1 (BD Biosciences; $0.4 \mu\text{g.ml}^{-1}$). Preparations were then revealed with the appropriate Alexa fluor 555 or Alexa fluor 488 conjugated antibodies. TOPRO-3 was used to label nuclei. Preparations were analysed with a spectral confocal FV-1000 station installed on an inverted microscope IX-81 (Olympus). The emitted fluorescence was detected

through spectral detection channels between 425-475 nm, 500-530 nm and 550-625 nm, for UV, green and red fluorescence respectively.

Intracellular calcium measurements. Neurospheres were dissociated and plated as single cells at 30000 cells.ml⁻¹ on glass coverslips coated with fibronectin. After 2 hours, the cells were incubated for 30 minutes at 37 °C with 6 µmol.l⁻¹ of the calcium sensitive probe fura2-AM (Santa Cruz Biotechnology). Assays were performed in a standard external buffer solution (130 mmol.l⁻¹ NaCl, 5.4 mmol.l⁻¹ KCl, 0.8 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 10 mmol.l⁻¹ HEPES, 5.6 mmol.l⁻¹ D-glucose, pH 7.4) completed with 1,8 mmol.l⁻¹ Ca²⁺ or 0.1 mmol.l⁻¹ EGTA for the Ca²⁺- free solution. After a rinse, the cells were perfused with the buffer solution containing 0.1 mmol.l⁻¹ EGTA (Ca²⁺-free solution). SOCE was triggered with thapsigargin (Sigma Aldrich, 4 µmol.l⁻¹). For experiments with leptin, area postrema cells were incubated with 6.25 mmol.l⁻¹ leptin during 30 minutes at 37°C prior to intracellular calcium measurements. Fluorescence images were recorded using a lambda 421 coupled with an inverted microscope Olympus IX73 and Zyla sCMOS camera 4.2 PLUS. Fluorescence signal was collected at 37°C through the control software Metafluor. Fura-2- AM was excited at 340 nm and 380 nm and the emitted fluorescence was detected at 505 nm. The ratio 340/380 of fluorescence emission was measured over time in selected regions of interest (ROI) on several cells, normalized to basal fluorescence obtained before stimulation.

Cell proliferation assays. Cell proliferation was determined by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay. To this aim, area postrema neurospheres dissociated as single cells were plated at the concentration of 30000 cells.ml⁻¹ in Poly-L-Lysine-coated 96 well plates. The cells were treated for 24 hours with SKF-96365 or YM-58483 or GSK-7975A. BrdU was added to

the medium for the last 4 hours of the assay. BrdU incorporated in DNA was quantified according to manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Meylan, France).

Neurosphere forming and self-renewal assays. Area postrema was dissected out of mice brains, dissociated and seeded at 10 cells per μl in 24 well plates in the cell culture medium alone (control) or supplemented with one of the following treatments: SKF-96365 ($1 \mu\text{mol.l}^{-1}$), or YM-58483 ($5 \mu\text{mol.l}^{-1}$), or leptin ($6,25 \text{ nmol.l}^{-1}$). Primary neurospheres were allowed to grow during a week and were then counted under the microscope. For self-renewal assays, area postrema primary neurospheres were collected, dissociated as single cells and reseeded (20 cells per μl) in the culture medium to obtain secondary neurospheres.

Data analysis. Statistical significance of differences was examined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the post-hoc Bonferroni test for multiple comparisons or by non-parametric Mann and Whitney test for comparison by pairs (Statview 5.00 software). Statistical significance level was set for P values <0.05 and represented on the figures by: * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, *** for $P < 0.001$.

RESULTS

Area postrema neural stem cells display store-operated Ca^{2+} entries

Store-operated Ca^{2+} entries occur through SOC. Mainly formed of TRPC1 and Orai1, SOC are activated by the Ca^{2+} sensor STIM1 from the endoplasmic reticulum. To determine if NSC from area postrema are endowed with SOC, we first analysed expression of TRPC1, Orai1 and

STIM1. Western blot (Figure 1A) analysis shows that neurospheres from area postrema express TRPC1, Orai1 and STIM1. These results were confirmed by immunostainings (Figures 1 B to D) that, in addition, evidence the presence of the SOC molecular actors in SOX2 expressing neural stem-like cells.

Physiological relevance of these data obtained *in vitro* was then investigated on mice brain sections. Figures 1F to H and their corresponding magnifications in Figures 1E' to G' illustrate that TRPC1, Orai1 and STIM1 are found in area postrema cells *in vivo* within SOX2-expressing stem cells.

Next, we assessed the functionality of SOC in area postrema NSC by determining their ability to support Ca^{2+} entries in response to Ca^{2+} stores depletion of the endoplasmic reticulum. To this aim, the cells were loaded with fura-2, a ratiometric Ca^{2+} sensitive dye that binds to free intracellular Ca^{2+} . To empty Ca^{2+} stores from the endoplasmic reticulum, we used thapsigargin that blocks the ability of the cell to pump Ca^{2+} into the endoplasmic reticulum through the sarco-endoplasmic reticulum calcium-ATPase (SERCA). Figure 2A (first peak) shows that exposure to thapsigargin induces with area postrema NSC, an increase in free intracellular Ca^{2+} concentration. As this first step of the experiment was performed in the absence of extracellular Ca^{2+} , the observed increase in Ca^{2+} cytosolic concentration reflects the release of Ca^{2+} from its intracellular stores due to inhibition of Ca^{2+} uptake and to a basal leak of Ca^{2+} from endoplasmic reticulum. Store-depletion is sensed by STIM1 and secondarily activates SOCs at the plasma membrane. Although SOC open within a few tenths of second after Ca^{2+} release from the endoplasmic reticulum, no Ca^{2+} can enter into the cell as long as cells are maintained in a Ca^{2+} -free buffer solution. Once the first Ca^{2+} peak due to Ca^{2+} release from intracellular stores was finished, Ca^{2+} was added to the extracellular medium to permit a Ca^{2+} influx into the cell. Figure 2 illustrates that addition of Ca^{2+} to the extracellular medium induces a long-lasting Ca^{2+} entry in area postrema cells (Figure 2 A second peak). To quantify store-operated Ca^{2+} entry, initial

influx rates that are typical from SOC were measured. To this aim, we measured the initial slopes from traces that were obtained on multiple cells and that were similar to the one illustrated in Figure 2A. In addition, we additionally quantified the maximal value of the second peak even though this parameter depends both on calcium entries through SOC and on processes that extrude calcium from cells. To ensure that SOC were involved, YM-58483 (1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) or GSK-7975A (5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) was used to selectively block store-operated Ca^{2+} entry. Figure 2B depicts that both YM-58483 and GSK-7975A substantially diminish store-operated Ca^{2+} entry.

Altogether, our data establish that area postrema NSCs are endowed with SOC that respond to Ca^{2+} store depletion by supporting a Ca^{2+} influx.

Store-operated Ca^{2+} entries control proliferation and self-renewal of area postrema neural stem cells

As SOC influence various cellular functions, we analysed whether they might regulate proliferation and self-renewal of NSCs in area postrema by determining the impact of their pharmacological blockade. Cell proliferation was evaluated through the measure of BrdU incorporation into DNA during the S phase of cell cycle. Results represented on Figure 3A demonstrate that the three SOC inhibitors, namely SKF-96365, YM-58483 and GSK-7975A dose-dependently decrease area postrema cell proliferation for concentrations ranging from 0.1 to 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, and 0.1 to 10 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ and 3 to 30 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ respectively, as expected for the cellular effects of these inhibitors (Prakriya and Lewis, 2015).

NSC are characterized *in vitro* by their capacity to form neurospheres and to self-renew when maintained in the presence of mitogens. To address the possible regulatory role of SOC over activation and self-renewal of area postrema NSCs, freshly dissociated area postrema cells were

plated at the concentration of 10 cells per μl in the absence (control) or presence of the SOC inhibitors SKF-96365 or YM-58483 diluted in the cell culture medium (Figure 3C). Neurospheres were allowed to develop for a week and were then counted. The numbers of neurospheres (primary neurospheres indicated as SPHERE I in Figure 3C) obtained reflects the numbers of active NSCs in the culture. Primary spheres are formed of progenitors (represented in white on Figure 3C) obtained following stem cell proliferation and of stem cells (depicted in black on Figure 3C) resulting from self-renewal, *i.e.* proliferation and maintenance of a stem cell phenotype. To quantify stem cells in the primary neurospheres and thus analyse the self-renewal process, we determined the number of cells capable of forming new neurospheres. Therefore, primary neurospheres obtained in each experimental condition were collected, dissociated, plated at the concentration of 20 cells per μl and allowed to develop as secondary neurospheres (Figure 3C, SPHERE II) in the culture medium without addition of SOC inhibitors. This assay was performed with concentrations of SKF-96365 ($1 \mu\text{mol.l}^{-1}$) and YM-58483 ($5 \mu\text{mol.l}^{-1}$) that still permit a substantial mitotic activity (Figure 3A) for the development of neurospheres. Our results show that both the numbers of primary neurospheres (Figure 3D) and secondary neurospheres (Figure 3E) are dramatically reduced by the addition of SKF-96365 or YM-58483, indicating that SOCs play a major role in activation and self-renewal of NSCs in area postrema.

Leptin reduces store-operated Ca^{2+} entries and impairs neural stem cell self-renewal

Store-operated Ca^{2+} entries are triggered and modulated by various extracellular signals, including hormones. Among these, leptin is an adipose tissue-derived hormone that control food intake and energy expenditure by acting on peripheral organs and brain structures among which area postrema plays a major role in leptin control of energy homeostasis (Hayes et al.,

2016). Leptin used at physiological (sub)nanomolar concentrations has been shown to reduce Ca^{2+} influx in several cell types, including neurons (Seufert et al., 1999; Shanley et al., 2002; Kohno et al., 2007, 2008; Sun et al., 2019).

To address a possible effect of leptin on SOCs in area postrema NSCs that express leptin receptor (Figure 4A), store-operated Ca^{2+} entries were measured in cells preincubated with 6,25 nmol.l^{-1} leptin during 30 minutes before Ca^{2+} imaging. Figure 4B depicts a calcium trace obtained in the absence (full line) or presence (dashed line) of leptin. Quantification of the initial slope and of the maximum of the traces reveals that leptin significantly reduces store-operated Ca^{2+} entries (Figure 4C). Conversely, area postrema NSCs derived from brains of mice lacking leptin receptor (obese mice) display an increase of store-operated Ca^{2+} entries (Figure 4E). In accordance with leptin effects on store-operated Ca^{2+} entries (Figures 4 B and 4C) and the data of Figures 3D and 3E showing that an inhibition of SOC leads to a decrease in activity of area postrema NSCs, leptin was found to reduce both activation and self-renewal of area postrema NSCs (Figure 4 D).

DISCUSSION

Combining multiple approaches, our study establishes for the first time to the best of our knowledge that SOC are expressed in NSC from area postrema and support Ca^{2+} entries that control their activation and self-renewal. In addition, our data provides evidence that leptin, an adipocyte-derived hormone whose effects on energy homeostasis depend on area postrema, inhibits store-operated Ca^{2+} entries and impairs activation and self-renewal of NSCs. Along with studies performed on the adult subventricular zone and hippocampus that are the two major NSC niches (Domenichini et al., 2018; Garcia-Alvarez et al., 2015; Li et al., 2012;

Somasundaram et al., 2014b), our results obtained on area postrema underscore that SOC may represent major regulators of NSC activity in different neurogenic niches of the adult brain.

In the present study, we detected TRPC1, Orai1 and STIM1 expression in cells stained for the stem cell marker SOX2 both in neurosphere cultures derived from microdissected area postrema and *in vivo* on brainstem sections, supporting that NSC from area postrema are endowed with proteins that can form SOC and with their activator STIM. Area postrema cells responded to Ca^{2+} stores depletion by inducing a long-lasting Ca^{2+} entry that was blocked by SOC inhibitors, showing that SOC in NSC of area postrema are functional. While studying the role of these channels, our experiments based on pharmacological inhibition of SOC during cell proliferation and neurosphere assays established that SOC are required for cell proliferation and self-renewal of NSC in area postrema as it they are in NSC of other major neurogenic niches, namely SVZ and hippocampus (Domenichini et al., 2018; Li et al., 2012; Somasundaram et al., 2014), suggesting that this Ca^{2+} -related mechanism may be conserved to maintain NSC pool across the different neurogenic niches within the adult brain. Recent data have indeed unveiled a central role of Ca^{2+} in stemness control (Luchsinger et al., 2019; MacDougall et al., 2019). Specifically, high levels of Ca^{2+} have been reported to maintain pluripotency in embryonic stem cells whereas low intracellular Ca^{2+} improves the hematopoietic stem cell maintenance (Luchsinger et al., 2019; MacDougall et al., 2019). Even though there are discrepancies on the role of Ca^{2+} , which might be due to the specificity of each subtype of stem cell or to the different microenvironment conditions wherein the stem cells reside, as for example the oxygen pressure that controls expression of SOC actors (Li et al., 2015), these data along with our studies underline the pivotal role-played by Ca^{2+} signals in stem cells. In this context, SOC that can be recruited by numerous extracellular signals (Prakriya and Lewis, 2015) may represent an essential mechanism for transducing and integrating the various extracellular inputs in order to adapt NSC behaviour to the physiological conditions.

Area postrema is a circumventricular organ that lacks a blood–brain barrier and is a critical homeostatic integration center for humoral signals. Specifically, area postrema critically controls energy expenditure in response to the adipocyte-derived hormone leptin (Hayes et al., 2016). Our data provide evidence that leptin reduces activity and self-renewal of NSC in area postrema in addition to its previously reported effects on neurons from this area. In accordance, functional deficiency of leptin actions in genetic (db/db mice) (Ramos-Rodriguez et al., 2014) or physiological models obtained by long-term intermittent fasting (Manzanero et al., 2014) has been described to enhance NSC proliferation in adult rat subventricular zone. Conversely, increased levels of leptin, resulting from a high-fat diet, inhibit neurogenesis in the adult mouse hippocampus without neuronal loss (Park et al., 2010b). Likewise, exposure of NSC from the subventricular zone results in decreased stem cell abilities (Segura et al., 2015). Of interest, we found that leptin inhibits while loss of its receptor in genetic mice models (db/db mice) display enhanced Ca^{2+} entry through SOC in area postrema-derived neurospheres. Consistently, an inhibitory effect of nanomolar concentrations of leptin on Ca^{2+} entries has also been observed in cells from pancreas (Seufert et al., 1999), hippocampus (Shanley et al., 2002) or hypothalamic arcuate nucleus (Kohno et al., 2008) whereas higher concentrations of this hormone increased Ca^{2+} influx in hippocampal (Dhar et al., 2014) or hypothalamic pro-opio-melanocortin producing neurons (Qiu et al., 2010). The decrease in store-operated Ca^{2+} influx along with the reduced stem cell activities in area postrema NSC cultures observed in the present study following leptin treatment suggests that SOC may contribute to transduce leptin effects and to reduce NSC proliferation and self-renewal in area postrema following leptin exposure. Given that leptin dysregulation is associated with obesity, these data underscore the importance of investigating SOC within the brain in both physiological and pathological conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Laetitia Cousin for technical assistance with ELISA experiments. We thank Image UP microscopy core facilities; UEPAO and PREBIOS facilities for animal handling. This work was supported by La Ligue Contre le Cancer Grand Ouest Comités de la Vienne et des Deux Sèvres, Région Poitou-Charentes, FEDER HABISAN Calscreen project and ACI from Universities of Tours and of Poitiers. E. Terrié holds a Ph.D. fellowship from Région Nouvelle-Aquitaine.

AUTHOR CONTRIBUTION

Cyrine Ben Dhaou: Collection, assembly, analysis and interpretation of data on RT-PCR and self-renewal assays. **Elodie Terrié:** Collection, assembly and interpretation on calcium imaging. **Patricia Arnault:** Collection, assembly, analysis and interpretation of immunostaining data, manuscript writing. **Thomas Harnois:** Design, analysis and interpretation of western blot data. **Bruno Constantin:** Analysis and interpretation of calcium imaging data, manuscript writing. **Emmanuel Moyse:** Conception and design, financial support, collection, assembly, analysis and interpretation of data, manuscript writing. **Valérie Coronas:** Conception and design, financial support, collection, assembly, analysis and interpretation of data, manuscript writing.

All the authors have approved the manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflict of interest.

REFERENCES

1. Kumar, A., Pareek, V., Faiq, M. A., Ghosh, S. K., and Kumari, C. (2019) ADULT NEUROGENESIS IN HUMANS: A Review of Basic Concepts, History, Current Research, and Clinical Implications. *Innov Clin Neurosci* 16, 30–37
2. Bauer, S., Hay, M., Amilhon, B., Jean, A., and Moysé, E. (2005) In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130, 75–90
3. Furube, E., Morita, M., and Miyata, S. (2015) Characterization of neural stem cells and their progeny in the sensory circumventricular organs of adult mouse. *Cell Tissue Res.* 362, 347–365
4. Bennett, L., Yang, M., Enikolopov, G., and Iacovitti, L. (2009) Circumventricular organs: a novel site of neural stem cells in the adult brain. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 337–347
5. Pecchi, E., Dallaporta, M., Charrier, C., Pio, J., Jean, A., Moysé, E., and Troadec, J.-D. (2007) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive radial-like cells are present in the vicinity of proliferative progenitors in the nucleus tractus solitarius of adult rat. *J. Comp. Neurol.* 501, 353–368
6. Charrier, C., Coronas, V., Fombonne, J., Roger, M., Jean, A., Krantic, S., and Moysé, E. (2006) Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat by in vivo proliferation labeling and in vitro neurosphere assay. *Neuroscience* 138, 5–16
7. Sanin, V., Heeß, C., Kretschmar, H. A., and Schüller, U. (2013) Recruitment of neural precursor cells from circumventricular organs of patients with cerebral ischaemia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39, 510–518
8. Liberini, C. G., Borner, T., Boyle, C. N., and Lutz, T. A. (2016) The satiating hormone amylin enhances neurogenesis in the area postrema of adult rats. *Mol Metab* 5, 834–843
9. Chigr, F., Rachidi, F., Segura, S., Mahaut, S., Tardivel, C., Jean, A., Najimi, M., and Moysé, E. (2009) Neurogenesis inhibition in the dorsal vagal complex by chronic immobilization stress in the adult rat. *Neuroscience* 158, 524–536
10. Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003) Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 517–529
11. Parekh, A. B. and Putney, J. W. (2005) Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews* 85, 757–810
12. Prakriya, M. and Lewis, R. S. (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 95, 1383–1436
13. Albarran, L., Lopez, J. J., Salido, G. M., and Rosado, J. A. (2016) Historical Overview of Store-Operated Ca(2+) Entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 898, 3–24
14. Dragoni, S., Laforenza, U., Bonetti, E., Lodola, F., Bottino, C., Berra-Romani, R., Carlo Bongio, G., Cinelli, M. P., Guerra, G., Pedrazzoli, P., Rosti, V., Tanzi, F., and Moccia, F. (2011) Vascular endothelial growth factor stimulates endothelial colony forming cells proliferation and tubulogenesis by inducing oscillations in intracellular Ca²⁺ concentration. *Stem Cells* 29, 1898–1907
15. Vaeth, M., Maus, M., Klein-Hessling, S., Freinkman, E., Yang, J., Eckstein, M., Cameron, S., Turvey, S. E., Serfling, E., Berberich-Siebelt, F., Possemato, R., and Feske, S. (2017) Store-Operated Ca²⁺ Entry Controls Clonal Expansion of T Cells through Metabolic Reprogramming. *Immunity* 47, 664-679.e6
16. Darbellay, B., Arnaudeau, S., König, S., Jousset, H., Bader, C., Demaurex, N., and Bernheim, L. (2009) STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 284, 5370–5380
17. Vandenberghe, M., Raphaël, M., Lehen'kyi, V., Gordienko, D., Hastie, R., Oddos, T., Rao, A., Hogan, P. G., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2013) ORAI1 calcium channel orchestrates skin homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E4839-4848
18. Peng, H., Hao, Y., Mousawi, F., Roger, S., Li, J., Sim, J. A., Ponnambalam, S., Yang, X., and Jiang, L.-H. (2016) Purinergic and Store-Operated Ca(2+) Signaling Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells and Their Roles in ATP-Induced Stimulation of Cell Migration. *Stem Cells* 34, 2102–2114
19. Louis, M., Zanou, N., Van Schoor, M., and Gailly, P. (2008) TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation. *J. Cell. Sci.* 121, 3951–3959
20. Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-Hora, M., Hogan, P. G., Lamperti, E. D., Yamashita, M., Gelinis, C., Neems, D. S., Sasaki, Y., Feske, S., Prakriya, M., Rajewsky, K., and Rao, A. (2008) Hair loss and defective T- and B-cell function in mice lacking ORAI1. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5209–5222

21. 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
22. Feske, S. (2010) CRAC channelopathies. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 460, 417–435
23. Rao, J. N., Rathor, N., Zou, T., Liu, L., Xiao, L., Yu, T.-X., Cui, Y.-H., and Wang, J.-Y. (2010) STIM1 translocation to the plasma membrane enhances intestinal epithelial restitution by inducing TRPC1-mediated Ca²⁺ signaling after wounding. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 299, C579–588
24. Zanou, N., Schakman, O., Louis, P., Ruegg, U. T., Dietrich, A., Birnbaumer, L., and Gailly, P. (2012) *Trpc1* ion channel modulates phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway during myoblast differentiation and muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* 287, 14524–14534
25. Somasundaram, A., Shum, A. K., McBride, H. J., Kessler, J. A., Feske, S., Miller, R. J., and Prakriya, M. (2014) Store-operated CRAC channels regulate gene expression and proliferation in neural progenitor cells. *J. Neurosci.* 34, 9107–9123
26. Domenichini, F., Terrié, E., Arnault, P., Harnois, T., Magaud, C., Bois, P., Constantin, B., and Coronas, V. (2018) Store-Operated Calcium Entries Control Neural Stem Cell Self-Renewal in the Adult Brain Subventricular Zone. *Stem Cells* 36, 761–774
27. Garofalo, C. and Surmacz, E. (2006) Leptin and cancer. *J. Cell. Physiol.* 207, 12–22
28. Segura, S., Efthimiadi, L., Porcher, C., Courtes, S., Coronas, V., Krantic, S., and Moyse, E. (2015) Leptin-dependent neurotoxicity via induction of apoptosis in adult rat neurogenic cells. *Front Cell Neurosci* 9, 350
29. Garza, J. C., Guo, M., Zhang, W., and Lu, X.-Y. (2008) Leptin increases adult hippocampal neurogenesis in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 283, 18238–18247
30. Hayes, M. R., Skibicka, K. P., Lechner, T. M., Guarnieri, D. J., DiLeone, R. J., Bence, K. K., and Grill, H. J. (2016) Endogenous Leptin Signaling in the Caudal Nucleus Tractus Solitarius and Area Postrema Is Required for Energy Balance Regulation. *Cell Metab.* 23, 744
31. Seufert, J., Kieffer, T. J., Leech, C. A., Holz, G. G., Moritz, W., Ricordi, C., and Habener, J. F. (1999) Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84, 670–676
32. Shanley, L. J., O'Malley, D., Irving, A. J., Ashford, M. L., and Harvey, J. (2002) Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J. Physiol. (Lond.)* 545, 933–944
33. Kohno, D., Nakata, M., Maekawa, F., Fujiwara, K., Maejima, Y., Kuramochi, M., Shimazaki, T., Okano, H., Onaka, T., and Yada, T. (2007) Leptin suppresses ghrelin-induced activation of neuropeptide Y neurons in the arcuate nucleus via phosphatidylinositol 3-kinase- and phosphodiesterase 3-mediated pathway. *Endocrinology* 148, 2251–2263
34. Kohno, D., Suyama, S., and Yada, T. (2008) Leptin transiently antagonizes ghrelin and long-lastingly orexin in regulation of Ca²⁺ signaling in neuropeptide Y neurons of the arcuate nucleus. *World J. Gastroenterol.* 14, 6347–6354
35. Sun, C., Tang, K., Wu, J., Xu, H., Zhang, W., Cao, T., Zhou, Y., Yu, T., and Li, A. (2019) Leptin modulates olfactory discrimination and neural activity in the olfactory bulb. *Acta Physiol (Oxf)* 227, e13319
36. Li, M., Chen, C., Zhou, Z., Xu, S., and Yu, Z. (2012) A TRPC1-mediated increase in store-operated Ca²⁺ entry is required for the proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells. *Cell Calcium* 51, 486–496
37. Garcia-Alvarez, G., Shetty, M. S., Lu, B., Yap, K. A. F., Oh-Hora, M., Sajikumar, S., Bichler, Z., and Fivaz, M. (2015) Impaired spatial memory and enhanced long-term potentiation in mice with forebrain-specific ablation of the *Stim* genes. *Front Behav Neurosci* 9, 180
38. MacDougall, M. S., Clarke, R., and Merrill, B. J. (2019) Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Nuclear Export Mediate Exit from Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell* 25, 210–224.e6

39. Luchsinger, L. L., Strikoudis, A., Danzl, N. M., Bush, E. C., Finlayson, M. O., Satwani, P., Sykes, M., Yazawa, M., and Snoeck, H.-W. (2019) Harnessing Hematopoietic Stem Cell Low Intracellular Calcium Improves Their Maintenance In Vitro. *Cell Stem Cell* 25, 225-240.e7
40. Li, Y., Guo, B., Xie, Q., Ye, D., Zhang, D., Zhu, Y., Chen, H., and Zhu, B. (2015) STIM1 Mediates Hypoxia-Driven Hepatocarcinogenesis via Interaction with HIF-1. *Cell Reports* 12, 388–395
41. Ramos-Rodriguez, J. J., Molina-Gil, S., Ortiz-Barajas, O., Jimenez-Palomares, M., Perdomo, G., Cozar-Castellano, I., Lechuga-Sancho, A. M., and Garcia-Alloza, M. (2014) Central proliferation and neurogenesis is impaired in type 2 diabetes and prediabetes animal models. *PLoS ONE* 9, e89229
42. Manzanero, S., Erion, J. R., Santro, T., Steyn, F. J., Chen, C., Arumugam, T. V., and Stranahan, A. M. (2014) Intermittent fasting attenuates increases in neurogenesis after ischemia and reperfusion and improves recovery. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 34, 897–905
43. Park, H. R., Park, M., Choi, J., Park, K.-Y., Chung, H. Y., and Lee, J. (2010) A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci. Lett.* 482, 235–239
44. Dhar, M., Wayman, G. A., Zhu, M., Lambert, T. J., Davare, M. A., and Appleyard, S. M. (2014) Leptin-induced spine formation requires TrpC channels and the CaM kinase cascade in the hippocampus. *J. Neurosci.* 34, 10022–10033
45. Qiu, J., Fang, Y., Rønnekleiv, O. K., and Kelly, M. J. (2010) Leptin excites proopiomelanocortin neurons via activation of TRPC channels. *J. Neurosci.* 30, 1560–1565

FIGURES AND FIGURE LEGENDS

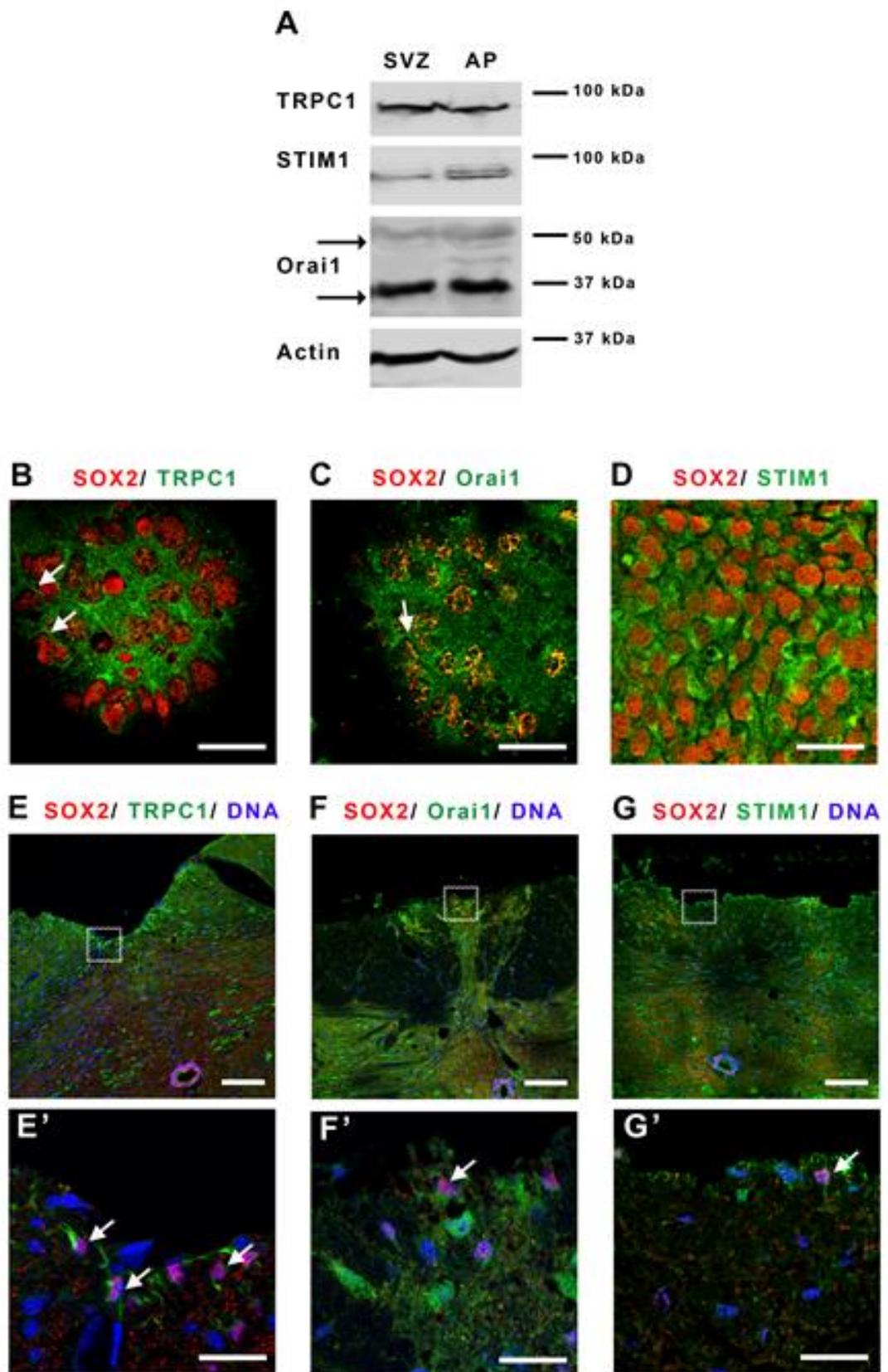


Figure 1: Area postrema neural stem cells express store-operated channels, TRPC1 and Orai1, and the endoplasmic reticulum calcium sensor STIM1.

A. Western blot analysis of TRPC1, Orai1 and STIM1 proteins obtained from neurospheres of the subventricular zone (**SVZ**) used as a positive control and of area postrema. Molecular weights of the markers are given on the right of the figure. Arrows point to the two bands obtained for Orai1 that correspond to unglycosylated (35kDa) and glycosylated (50kDa) forms of Orai1.

Micrographs representing immunostainings of SOX2 (red) along with TRPC1 (green, **B, E, E'**), Orai1 (green, **C, F, F'**) or STIM1 (green, **D, G, G'**) on area postrema NSC cultures (**B-D**) or on mice brain sections (**E-G and E'-G'**). Cell nuclei were labeled with TOPRO-3 (blue). Figures E'-G' correspond to higher magnifications of the area postrema zone delimited in Figures E-G respectively. In B and C, arrows point to cells with a membrane-like labelling of TRPC1 or Orai1. In E' to G' arrows point to double stained cells. Scale bars for B-D and E'-G': 25 μm and 50 μm for E-G.

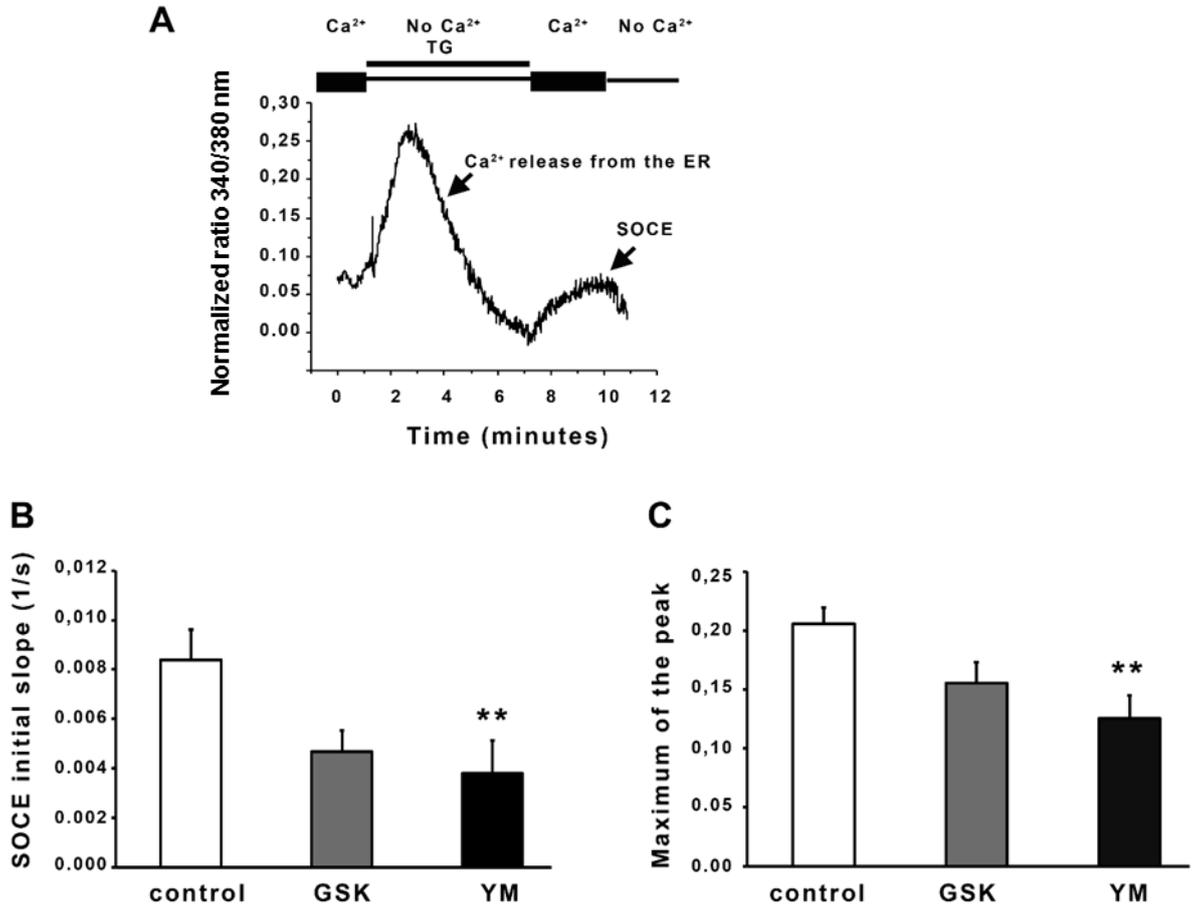


Figure 2: Area postrema neural stem cells display store-operated calcium entries.

A. A representative trace of store-operated calcium entry recording in area postrema NSCs. Cells were loaded with Fura2 and transferred to a solution devoided of Ca^{2+} and containing $6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ of thapsigargin. Basal Ca^{2+} leak from the endoplasmic reticulum and blocakde of Ca^{2+} uptake to the endoplasmic reticulum by thapsigargin leads to the release of Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum (ER) (first peak). Replacement of zero Ca^{2+} solution by a 1.8 mmol.l^{-1} Ca^{2+} physiological buffer induced a calcium entry through SOC (second peak, SOCE). When cells were then placed in a zero Ca^{2+} solution, the fluorescent signal returned to initial level. Graphs representing mean initial slope of the rising phase during the second peak

B. or mean maximum of the second peak

C. SOCE were recorded in 1.8 mmol.l^{-1} Ca^{2+} alone (control) or supplemented with YM-58483 (YM, $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$), GSK-7975A (GSK, $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$), or DMSO (control). Data are expressed as mean \pm s.e.m were obtained from recordings on at least 20 different cells per condition.

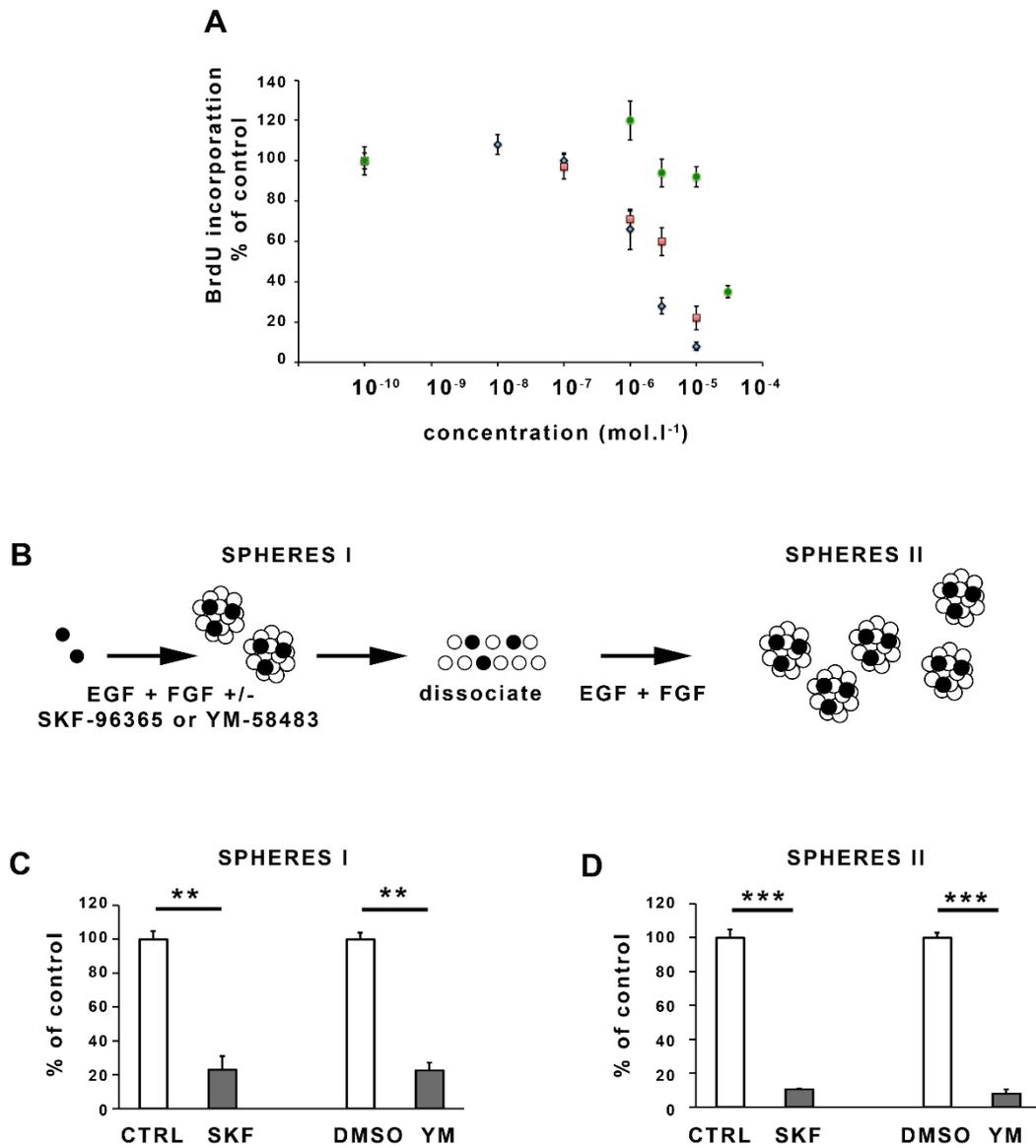


Figure 3: Pharmacological inhibition of store-operated channels inhibits area postrema neural stem cell proliferation and self-renewal.

A. Percentages of BrdU incorporation in SVZ cells maintained for 24 h in the presence of increasing concentrations of SKF-96365 (in blue), YM-58483 (in red) or GSK-7975A (in green). Data represent means \pm s.e.m from 4 experiments in quadruplicates.

B. Scheme of the assay used for the analysis of NSC activation and self-renewal. Data obtained with this assay are represented in C and D. Stem cells are represented as black-colored circles and progenitors as white-colored circles. Numbers of primary neurospheres (**C**, SPHERES I) obtained following one week of culture with either $1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ SKF-96365, or $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ YM-58483, or DMSO or secondary neurospheres (**D**, SPHERES II) obtained following replating. Data are expressed as percent of control and represent means \pm s.e.m from 2 experiments in triplicate. **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

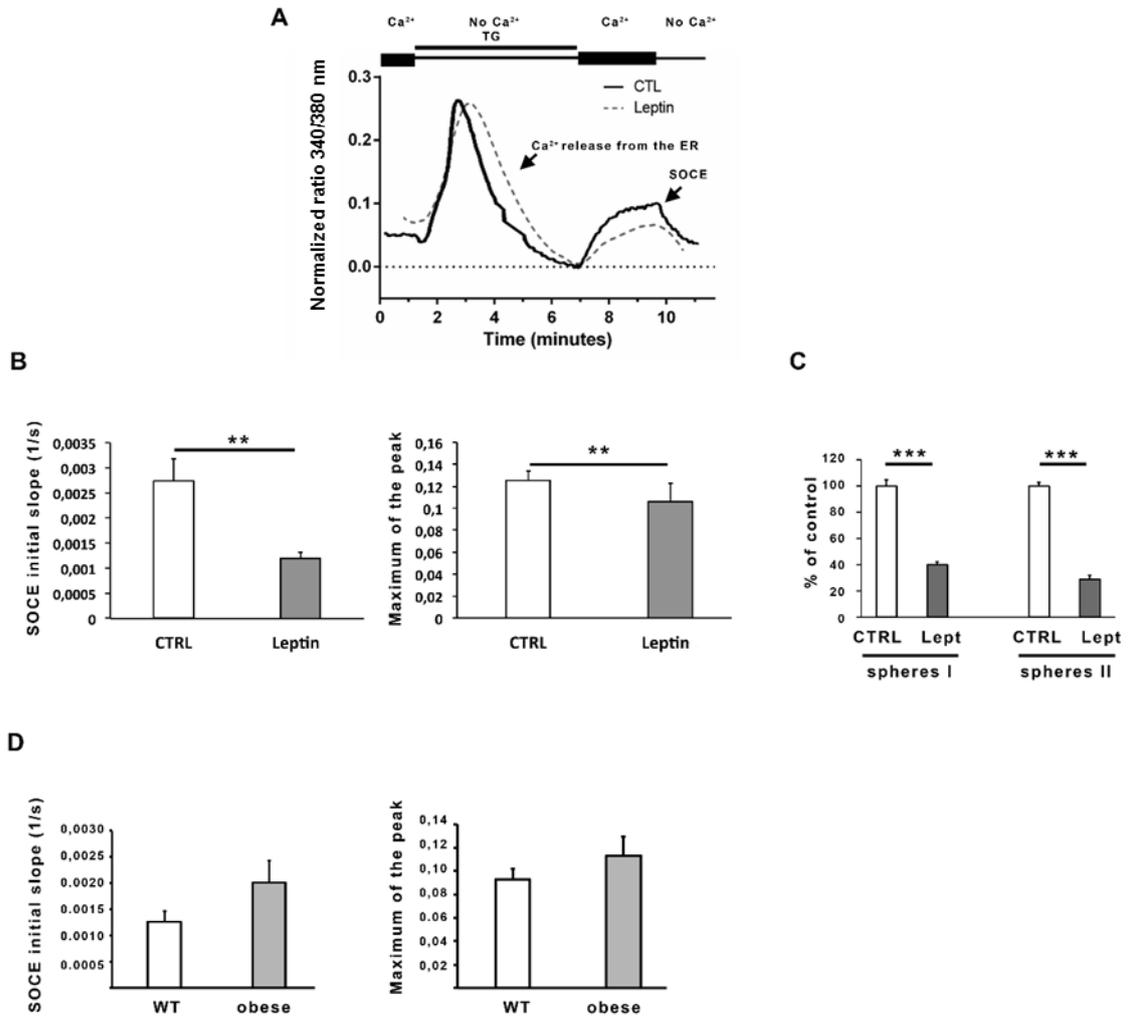


Figure 4: Leptin reduces store-operated calcium entries and self-renewal of area stem postrema neural stem cells.

A. Representative traces of store-operated calcium entry recorded in area postrema NSCs in the absence (full line) or in the presence of a preincubation with 6.25 nmol.l^{-1} leptin (dashed line).

B. Graphs representing mean initial slope of the rising phase during the second peak or mean maximum of the second peak recorded in the absence (CTRL) or in the presence of leptin (leptin). Data represented as means \pm s.e.m were obtained from recordings on at least 30 different cells per condition. **: $P < 0.01$.

C. Area postrema cells were subjected to the neurosphere assay that was performed in the absence (CTRL) or in the presence of 6.25 nmol.l^{-1} leptin (Lept). Numbers of primary neurospheres (**spheres I**) obtained following one week of culture in the absence (CTRL) or presence of 6.25 nmol.l^{-1} leptin (Lept), and secondary neurospheres (**spheres II**) obtained following replating. Data are expressed as percent of control and represent means \pm s.e.m from 2 experiments in triplicate. **: $P < 0.001$.

D. Graphs representing mean initial slope of the rising phase during the second peak or mean maximum of the second peak recorded in wild-type (**WT**) or leptin receptor knock-out mice (**obese**). Data represented as means \pm s.e.m were obtained from recordings on 9 (WT) and 13 (OB) different cells per condition.

Table 1. Primers used for RT-PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	amplicon (pb)
Housekeeping gene (α -tubulin)	ACCTGGAACCCACGGTCAT	AGCTGCTCAGGGTGGGAAGAG	
ORAI-1	GGGACAAAACACTAACCTGTCAT	GGAGTAGAATTCAGTGGGAGAGT	
STIM-1	AAGCTTATCAGCGTGGAGGACCT	CATCCACAGTCCAGTTGTACACAACCTG	
TRPC-6	AAAGATATCTTCAAATTCATGGTC	CACGTCCGCATCATCCTCAATTTC	
TRPC-3	AGCTGTGGTGCTCAGCTTCT	CTGTCATCCTCGATCTCTTGG	
TRPC-4	TCTGCAGATATCTCTGGGAAGGATGC	AAGCTTTGTTCGAGCAAATTTCCATTC	
ObR (leptin receptor)	AGTTGTGGTGAAATCACATTGG	GATATTTGGTCCTCTTCTTCTGG	483

Table 2. Number of PCR cycles for amplification of RT-cDNA sequences with SybBR-Green PCR

	Whole mouse brain	SVZ	AREA POSTREMA
Housekeeping gene (α -tubulin)	14.57	22.30	28.13
STIM1	20.08	30.55	34.88
Orai 1	24.04	27.28	31.43
TRPC3	20.73	29.22	32.78
TRPC4	20.18	N/A	N/A
TRPC6	21.00	N/A	N/A
ObR	24.12	28.58	31.82
Ers1	18.12	31.45	35.12

Bibliographie

Bibliographie

Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.-H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L.F. (2009). Malignant Astrocytomas Originate from Neural Stem/Progenitor Cells in a Somatic Tumor Suppressor Mouse Model. *Cancer Cell* 15, 45–56.

Alcantara Llaguno, S.R., Wang, Z., Sun, D., Chen, J., Xu, J., Kim, E., Hatanpaa, K.J., Raisanen, J.M., Burns, D.K., Johnson, J.E., et al. (2015). Adult Lineage-Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell* 28, 429–440.

Alfonso, J., Le Magueresse, C., Zuccotti, A., Khodosevich, K., and Monyer, H. (2012). Diazepam Binding Inhibitor Promotes Progenitor Proliferation in the Postnatal SVZ by Reducing GABA Signaling. *Cell Stem Cell* 10, 76–87.

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.

Alptekin, M., Eroglu, S., Tutar, E., Sencan, S., Geyik, M.A., Ulasli, M., Demiryurek, A.T., and Camci, C. (2015). Gene expressions of TRP channels in glioblastoma multiforme and relation with survival. *Tumor Biology* 36, 9209–9213.

Altman, J., and Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *The Journal of Comparative Neurology* 124, 319–335.

Andreu-Agulló, C., Morante-Redolat, J.M., Delgado, A.C., and Fariñas, I. (2009). Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nature Neuroscience* 12, 1514–1523.

Antigny, F., Sabourin, J., Saüc, S., Bernheim, L., Koenig, S., and Frieden, M. (2017). TRPC1 and TRPC4 channels functionally interact with STIM1L to promote myogenesis and maintain fast repetitive Ca²⁺ release in human myotubes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 806–813.

Arnaudeau, S., Frieden, M., Nakamura, K., Castelbou, C., Michalak, M., and Demaurex, N. (2002). Calreticulin Differentially Modulates Calcium Uptake and Release in the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277, 46696–46705.

Aulestia, F.J., Néant, I., Dong, J., Haiech, J., Kilhoffer, M.-C., Moreau, M., and Leclerc, C. (2018). Quiescence status of glioblastoma stem-like cells involves remodelling of Ca²⁺ signalling and mitochondrial shape. *Scientific Reports* 8.

Baan, R., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., Ghissassi, F.E., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Islami, F., Galichet, L., and Straif, K. (2011). Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *The Lancet Oncology* 12, 624–626.

- Balordi, F., and Fishell, G. (2007). Hedgehog Signaling in the Subventricular Zone Is Required for Both the Maintenance of Stem Cells and the Migration of Newborn Neurons. *J. Neurosci.* 27, 5936–5947.
- Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., and Daszuta, A. (2004). Serotonin-Induced Increases in Adult Cell Proliferation and Neurogenesis are Mediated Through Different and Common 5-HT Receptor Subtypes in the Dentate Gyrus and the Subventricular Zone. *Neuropsychopharmacol* 29, 450–460.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.
- Bapat, S.A., Mali, A.M., Koppikar, C.B., and Kurrey, N.K. (2005). Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res.* 65, 3025–3029.
- Bar, E.E., Lin, A., Mahairaki, V., Matsui, W., and Eberhart, C.G. (2010). Hypoxia Increases the Expression of Stem-Cell Markers and Promotes Clonogenicity in Glioblastoma Neurospheres. *The American Journal of Pathology* 177, 1491–1502.
- Barrantes-Freer, A., Renovanz, M., Eich, M., Braukmann, A., Sprang, B., Spirin, P., Pardo, L.A., Giese, A., and Kim, E.L. (2015). CD133 Expression Is Not Synonymous to Immunoreactivity for AC133 and Fluctuates throughout the Cell Cycle in Glioma Stem-Like Cells. *PloS One* 10, e0130519.
- Bauer, S., Hay, M., Amilhon, B., Jean, A., and Moyses, E. (2005). In vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130, 75–90.
- Bayraktar, O.A., Fuentealba, L.C., Alvarez-Buylla, A., and Rowitch, D.H. (2015). Astrocyte Development and Heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020362.
- Beckervordersandforth, R., Tripathi, P., Ninkovic, J., Bayam, E., Lepier, A., Stempfhuber, B., Kirchhoff, F., Hirrlinger, J., Haslinger, A., Lie, D.C., et al. (2010). In Vivo Fate Mapping and Expression Analysis Reveals Molecular Hallmarks of Prospectively Isolated Adult Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 7, 744–758.
- 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.
- Berridge, M.J. (2016). The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiological Reviews* 96, 1261–1296.
- Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 11–21.
- Berridge, M.J., Bootman, M.D., and Roderick, H.L. (2003). Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 517–529.

- Bocangel, D.B., Finkelstein, S., Schold, S.C., Bhakat, K.K., Mitra, S., and Kokkinakis, D.M. (2002). Multifaceted Resistance of Gliomas to Temozolomide. *Clin Cancer Res* 8, 2725–2734.
- Boldrini, M., Fulmore, C.A., Tartt, A.N., Simeon, L.R., Pavlova, I., Poposka, V., Rosoklija, G.B., Stankov, A., Arango, V., Dwork, A.J., et al. (2018). Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* 22, 589–599.e5.
- Bomben, V.C., and Sontheimer, H. (2010). Disruption of transient receptor potential canonical channel 1 causes incomplete cytokinesis and slows the growth of human malignant gliomas. *Glia* 58, 1145–1156.
- Bomben, V.C., Turner, K.L., Barclay, T.-T.C., and Sontheimer, H. (2011). Transient receptor potential canonical channels are essential for chemotactic migration of human malignant gliomas. *Journal of Cellular Physiology* 226, 1879–1888.
- Brandes, A.A., Bartolotti, M., Tosoni, A., and Franceschi, E. (2016). Nitrosoureas in the Management of Malignant Gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep* 16, 13.
- Brini, M., and Carafoli, E. (2009). Calcium pumps in health and disease. *Physiol. Rev.* 89, 1341–1378.
- Cabanas, H., Harnois, T., Magaud, C., Cousin, L., Constantin, B., Bourmeyster, N., and Déliot, N. (2018). Deregulation of calcium homeostasis in Bcr-Abl-dependent chronic myeloid leukemia. *Oncotarget* 9, 26309–26327.
- 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.
- Charrier, C., Coronas, V., Fombonne, J., Roger, M., Jean, A., Krantic, S., and Moyse, E. (2006). Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat by in vivo proliferation labeling and in vitro neurosphere assay. *Neuroscience* 138, 5–16.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 488, 522–526.
- Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., and Ambudkar, I.S. (2008). Functional Requirement for Orai1 in Store-operated TRPC1-STIM1 Channels. *J. Biol. Chem.* 283, 12935–12940.
- Cheng, K.T., Liu, X., Ong, H.L., Swaim, W., and Ambudkar, I.S. (2011). Local Ca²⁺ Entry Via Orai1 Regulates Plasma Membrane Recruitment of TRPC1 and Controls Cytosolic Ca²⁺ Signals Required for Specific Cell Functions. *PLoS Biology* 9, e1001025.
- Cheng, L., Huang, Z., Zhou, W., Wu, Q., Donnola, S., Liu, J.K., Fang, X., Sloan, A.E., Mao, Y., Lathia, J.D., et al. (2013). Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* 153, 139–152.
- Chinot, O.L., Wick, W., Mason, W., Henriksson, R., Saran, F., Nishikawa, R., Carpentier, A.F., Hoang-Xuan, K., Kavan, P., Cernea, D., et al. (2014). Bevacizumab plus Radiotherapy–

Temozolomide for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 370, 709–722.

Chow, K.-H., Park, H.J., George, J., Yamamoto, K., Gallup, A.D., Graber, J.H., Chen, Y., Jiang, W., Steindler, D.A., Neilson, E.G., et al. (2017). S100A4 Is a Biomarker and Regulator of Glioma Stem Cells That Is Critical for Mesenchymal Transition in Glioblastoma. *Cancer Res* 77, 5360–5373.

Christensen, K., Schröder, H.D., and Kristensen, B.W. (2011). CD133+ niches and single cells in glioblastoma have different phenotypes. *J Neurooncol* 104, 129–143.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 66, 9339–9344.

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.

Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., DeLeo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective Identification and Purification of Quiescent Adult Neural Stem Cells from Their In Vivo Niche. *Neuron* 82, 545–559.

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 Res.* 65, 10946–10951.

Conover, J.C., Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Disruption of Eph/ephrin signaling affects migration and proliferation in the adult subventricular zone. *Nat. Neurosci.* 3, 1091–1097.

Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., and Kuhn, H.G. (2004). Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *Journal of Neuroscience Research* 77, 155–165.

Coronas, V., Bantubungi, K., Fombonne, J., Krantic, S., Schiffmann, S.N., and Roger, M. (2004). Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J. Neurochem.* 91, 1292–1301.

Cosens, D.J., and Manning, A. (1969). Abnormal Electroretinogram from a *Drosophila* Mutant. *Nature* 224, 285–287.

Coskun, V., Wu, H., Blanchi, B., Tsao, S., Kim, K., Zhao, J., Biancotti, J.C., Hutnick, L., Krueger, R.C., Fan, G., et al. (2008). CD133+ neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1026–1031.

Daley, G.Q., Van Etten, R.A., and Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 247, 824–830.

- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C.R., König, S., and Bernheim, L. (2011). STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *J. Cell Biol.* *194*, 335–346.
- David, L.S., Schachner, M., and Saghatelian, A. (2013). The Extracellular Matrix Glycoprotein Tenascin-R Affects Adult But Not Developmental Neurogenesis in the Olfactory Bulb. *J. Neurosci.* *33*, 10324–10339.
- Daynac, M., Chicheportiche, A., Pineda, J.R., Gauthier, L.R., Boussin, F.D., and Mouthon, M.-A. (2013). Quiescent neural stem cells exit dormancy upon alteration of GABAAR signaling following radiation damage. *Stem Cell Research* *11*, 516–528.
- Delgado, A.C., Ferrón, S.R., Vicente, D., Porlan, E., Perez-Villalba, A., Trujillo, C.M., D’Ocón, P., and Fariñas, I. (2014). Endothelial NT-3 Delivered by Vasculature and CSF Promotes Quiescence of Subependymal Neural Stem Cells through Nitric Oxide Induction. *Neuron* *83*, 572–585.
- Déliot, N., and Constantin, B. (2015). Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1848*, 2512–2522.
- Dennis, C.V., Suh, L.S., Rodriguez, M.L., Kril, J.J., and Sutherland, G.T. (2016). Human adult neurogenesis across the ages: An immunohistochemical study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *42*, 621–638.
- Derler, I., Schindl, R., Fritsch, R., Heftberger, P., Riedl, M.C., Begg, M., House, D., and Romanin, C. (2013). The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium* *53*, 139–151.
- Di Leva, F., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D., and Carafoli, E. (2008). The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* *476*, 65–74.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of Neuroscience* *17*, 5046–5061.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J.-M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron* *36*, 1021–1034.
- Domenichini, F., Terrié, E., Arnault, P., Harnois, T., Magaud, C., Bois, P., Constantin, B., and Coronas, V. (2018). Store-Operated Calcium Entries Control Neural Stem Cell Self-Renewal in the Adult Brain Subventricular Zone: SOCE and Neural Stem Cells. *STEM CELLS* *36*, 761–774.
- Domínguez-Rodríguez, A., Díaz, I., Rodríguez-Moyano, M., Calderón-Sánchez, E., Rosado, J.A., Ordóñez, A., and Smani, T. (2012). Urotensin-II signaling mechanism in rat coronary artery: role of STIM1 and Orai1-dependent store operated calcium influx in vasoconstriction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *32*, 1325–1332.

- Dong, J., Aulestia, F.J., Assad Kahn, S., Zeniou, M., Dubois, L.G., El-Habr, E.A., Daubeuf, F., Tounsi, N., Cheshier, S.H., Frossard, N., et al. (2017). Bisacodyl and its cytotoxic activity on human glioblastoma stem-like cells. Implication of inositol 1,4,5-triphosphate receptor dependent calcium signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 1018–1027.
- Echevarría, W., Leite, M.F., Guerra, M.T., Zipfel, W.R., and Nathanson, M.H. (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* 5, 440–446.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pillozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 15, 504–514.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-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.
- Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65, 9328–9337.
- Fedele, M., Cerchia, L., Pegoraro, S., Sgarra, R., and Manfioletti, G. (2019). Proneural-Mesenchymal Transition: Phenotypic Plasticity to Acquire Multitherapy Resistance in Glioblastoma. *Int J Mol Sci* 20.
- Ferent, J., Cochard, L., Faure, H., Taddei, M., Hahn, H., Ruat, M., and Traiffort, E. (2014). Genetic Activation of Hedgehog Signaling Unbalances the Rate of Neural Stem Cell Renewal by Increasing Symmetric Divisions. *Stem Cell Reports* 3, 312–323.
- Fernando, R.N., Eleuteri, B., Abdelhady, S., Nussenzweig, A., Andäng, M., and Ernfors, P. (2011). Cell cycle restriction by histone H2AX limits proliferation of adult neural stem cells. *PNAS* 108, 5837–5842.
- 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.
- Flourakis, M., Van Coppenolle, F., Lehen'kyi, V., Beck, B., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006). Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J.* 20, 1215–1217.
- Fomina, A.F., and Nowycky, M.C. (1999). A current activated on depletion of intracellular Ca^{2+} stores can regulate exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 19, 3711–3722.
- Friedmann-Morvinski, D., Bushong, E.A., Ke, E., Soda, Y., Marumoto, T., Singer, O., Ellisman, M.H., and Verma, I.M. (2012). Dedifferentiation of Neurons and Astrocytes by Oncogenes Can Induce Gliomas in Mice. *Science* 338, 1080–1084.

- Frischauf, I., Fahrner, M., Jardín, I., and Romanin, C. (2016). The STIM1: Orai Interaction. In *Calcium Entry Pathways in Non-Excitable Cells*, J.A. Rosado, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 25–46.
- Furth, J., Kahn, M.C., and Breedis, C. (1937). The Transmission of Leukemia of Mice with a Single Cell. *The American Journal of Cancer* *31*, 276–282.
- Gadisseux, J.F., Evrard, P., Misson, J.P., and Caviness, V.S. (1989). Dynamic structure of the radial glial fiber system of the developing murine cerebral wall. An immunocytochemical analysis. *Developmental Brain Research* *50*, 55–67.
- 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.
- García-González, D., Khodosevich, K., Watanabe, Y., Rollenhagen, A., Lübke, J.H.R., and Monyer, H. (2017). Serotonergic Projections Govern Postnatal Neuroblast Migration. *Neuron* *94*, 534-549.e9.
- Gerasimenko, O., and Gerasimenko, J. (2004). New aspects of nuclear calcium signalling. *J. Cell. Sci.* *117*, 3087–3094.
- Gerasimenko, O.V., Gerasimenko, J.V., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (1996). Short pulses of acetylcholine stimulation induce cytosolic Ca²⁺ signals that are excluded from the nuclear region in pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch.* *432*, 1055–1061.
- Gilbert, M.R., Dignam, J.J., Armstrong, T.S., Wefel, J.S., Blumenthal, D.T., Vogelbaum, M.A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., et al. (2014). A Randomized Trial of Bevacizumab for Newly Diagnosed Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* *370*, 699–708.
- Gómez-Gaviro, M.V., Scott, C.E., Sesay, A.K., Matheu, A., Booth, S., Galichet, C., and Lovell-Badge, R. (2012). Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 1317–1322.
- Gopurappilly, R., Deb, B.K., Chakraborty, P., and Hasan, G. (2018). Stable STIM1 Knockdown in Self-Renewing Human Neural Precursors Promotes Premature Neural Differentiation. *Frontiers in Molecular Neuroscience* *11*.
- Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S.M., and Simjee, S.U. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* *18*, 3–9.
- Hardell, L., and Carlberg, M. (2015). Mobile phone and cordless phone use and the risk for glioma – Analysis of pooled case-control studies in Sweden, 1997–2003 and 2007–2009. *Pathophysiology* *22*, 1–13.
- Harrisseh, R., Chatelier, A., Magaud, C., Déliot, N., and Constantin, B. (2013). Involvement of TRPV2 and SOCE in calcium influx disorder in DMD primary human myotubes with a specific contribution of α 1-syntrophin and PLC/PKC in SOCE regulation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*.

- Ho, N.F., Han, S.P., and Dawe, G.S. (2009). Effect of voluntary running on adult hippocampal neurogenesis in cholinergic lesioned mice. *BMC Neuroscience* 10, 57.
- Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J., and Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17, 2205–2232.
- Höglinger, G.U., Rizk, P., Muriel, M.P., Duyckaerts, C., Oertel, W.H., Caille, I., and Hirsch, E.C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7, 726–735.
- Holmberg, J., Armulik, A., Senti, K.-A., Edoff, K., Spalding, K., Momma, S., Cassidy, R., Flanagan, J.G., and Frisén, J. (2005). Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev.* 19, 462–471.
- Hoover, P.J., and Lewis, R.S. (2011). Stoichiometric requirements for trapping and gating of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels by stromal interaction molecule 1 (STIM1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 13299–13304.
- Hou, X., Pedi, L., Diver, M.M., and Long, S.B. (2012). Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science* 338, 1308–1313.
- Hu, X.-L., Chen, G., Zhang, S., Zheng, J., Wu, J., Bai, Q.-R., Wang, Y., Li, J., Wang, H., Feng, H., et al. (2017). Persistent Expression of VCAM1 in Radial Glial Cells Is Required for the Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Neuron* 95, 309–325.e6.
- Huang, G.N., Zeng, W., Kim, J.Y., Yuan, J.P., Han, L., Muallem, S., and Worley, P.F. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat. Cell Biol.* 8, 1003–1010.
- Humbert, J.P., Matter, N., Artault, J.C., Köppler, P., and Malviya, A.N. (1996). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J. Biol. Chem.* 271, 478–485.
- Iacob, G., and Dinca, E.B. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *J Med Life* 2, 386–393.
- 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.
- Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., Wang, G., and Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *PNAS* 108, 1397–1402.
- Imura, T., Nakano, I., Kornblum, H.I., and Sofroniew, M.V. (2006). Phenotypic and functional heterogeneity of GFAP-expressing cells in vitro: differential expression of LeX/CD15 by GFAP-expressing multipotent neural stem cells and non-neurogenic astrocytes. *Glia* 53, 277–293.

- Jacques, T.S., Swales, A., Brzozowski, M.J., Henriquez, N.V., Linehan, J.M., Mirzadeh, Z., Malley, C.O., Naumann, H., Alvarez-Buylla, A., and Brandner, S. (2010). Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. *The EMBO Journal* 29, 222–235.
- Jalota, A., Kumar, M., Das, B.C., Yadav, A.K., Chosdol, K., and Sinha, S. (2018). A drug combination targeting hypoxia induced chemoresistance and stemness in glioma cells. *Oncotarget* 9, 18351–18366.
- Jiang, Y., Marinescu, V.D., Xie, Y., Jarvius, M., Maturi, N.P., Haglund, C., Olofsson, S., Lindberg, N., Olofsson, T., Leijonmarck, C., et al. (2017). Glioblastoma Cell Malignancy and Drug Sensitivity Are Affected by the Cell of Origin. *Cell Reports* 18, 977–990.
- Jiao, J., and Chen, D.F. (2008). Induction of Neurogenesis in Nonconventional Neurogenic Regions of the Adult Central Nervous System by Niche Astrocyte-Produced Signals. *STEM CELLS* 26, 1221–1230.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L., and Greenberg, D.A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *PNAS* 99, 11946–11950.
- Joo, K.M., Jin, J., Kim, E., Kim, K.H., Kim, Y., Kang, B.G., Kang, Y.-J., Lathia, J.D., Cheong, K.H., Song, P.H., et al. (2012). MET Signaling Regulates Glioblastoma Stem Cells. *Cancer Res* 72, 3828–3838.
- Karipidis, K., Elwood, M., Benke, G., Sanagou, M., Tjong, L., and Croft, R.J. (2018). Mobile phone use and incidence of brain tumour histological types, grading or anatomical location: a population-based ecological study. *BMJ Open* 8, e024489.
- Karpowicz, P., Willaime-Morawek, S., Balenci, L., DeVeale, B., Inoue, T., and van der Kooy, D. (2009). E-Cadherin regulates neural stem cell self-renewal. *J. Neurosci.* 29, 3885–3896.
- Kawaguchi, D., Furutachi, S., Kawai, H., Hozumi, K., and Gotoh, Y. (2013). Dll1 maintains quiescence of adult neural stem cells and segregates asymmetrically during mitosis. *Nat Commun* 4, 1–12.
- Keith, B., and Simon, M.C. (2007). Hypoxia-Inducible Factors, Stem Cells, and Cancer. *Cell* 129, 465–472.
- Kelesidis, T., Kelesidis, I., Chou, S., and Mantzoros, C.S. (2010). Narrative Review: The Role of Leptin in Human Physiology: Emerging Clinical Applications. *Ann Intern Med* 152, 93–100.
- Kemper, K., Sprick, M.R., de Bree, M., Scopelliti, A., Vermeulen, L., Hoek, M., Zeilstra, J., Pals, S.T., Mehmet, H., Stassi, G., et al. (2010). The AC133 epitope, but not the CD133 protein, is lost upon cancer stem cell differentiation. *Cancer Res.* 70, 719–729.
- Khodeer, S., and Era, T. (2017). Identifying the Biphasic Role of Calcineurin/NFAT Signaling Enables Replacement of Sox2 in Somatic Cell Reprogramming. *STEM CELLS* 35, 1162–1175.

- Khodosevich, K., Watanabe, Y., and Monyer, H. (2011). EphA4 preserves postnatal and adult neural stem cells in an undifferentiated state in vivo. *J Cell Sci* 124, 1268–1279.
- Kokovay, E., Wang, Y., Kusek, G., Wurster, R., Lederman, P., Lowry, N., Shen, Q., and Temple, S. (2012). VCAM1 is essential to maintain the structure of the SVZ niche and acts as an environmental sensor to regulate SVZ lineage progression. *Cell Stem Cell* 11, 220–230.
- Korkotian, E., Oni-Biton, E., and Segal, M. (2017). The role of the store-operated calcium entry channel Orai1 in cultured rat hippocampal synapse formation and plasticity. *J Physiol* 595, 125–140.
- Kraft, R. (2015). STIM and ORAI proteins in the nervous system. *Channels* 9, 245–252.
- Kraft, A., Jubal, E.R., Laer, R. von, Döring, C., Rocha, A., Grebbin, M., Zenke, M., Kettenmann, H., Stroh, A., and Momma, S. (2017). Astrocytic Calcium Waves Signal Brain Injury to Neural Stem and Progenitor Cells. *Stem Cell Reports* 8, 701–714.
- 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.
- Kumar, A., Pareek, V., Faiq, M.A., Ghosh, S.K., and Kumari, C. (2019). ADULT NEUROGENESIS IN HUMANS: A Review of Basic Concepts, History, Current Research, and Clinical Implications. *Innov Clin Neurosci* 16, 30–37.
- Kwon, J., An, H., Sa, M., Won, J., Shin, J.I., and Lee, C.J. (2017). Orai1 and Orai3 in Combination with Stim1 Mediate the Majority of Store-operated Calcium Entry in Astrocytes. *Experimental Neurobiology* 26, 42.
- Lalonde, J., Saia, G., and Gill, G. (2014). Store-Operated Calcium Entry Regulates Transcription Factor Sp4 in Resting Neurons. *Sci Signal* 7, ra51.
- Lanner, J.T., Georgiou, D.K., Joshi, A.D., and Hamilton, S.L. (2010). Ryanodine Receptors: Structure, Expression, Molecular Details, and Function in Calcium Release. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.
- Lao, C.L., Lu, C.-S., and Chen, J.-C. (2013). Dopamine D3 receptor activation promotes neural stem/progenitor cell proliferation through AKT and ERK1/2 pathways and expands type-B and -C cells in adult subventricular zone. *Glia* 61, 475–489.
- 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., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L.L., and Rich, J.N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* 29, 1203–1217.
- Ledeen, R.W., and Wu, G. (2007). Sodium-calcium exchangers in the nucleus: an unexpected locus and an unusual regulatory mechanism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1099, 494–506.

- Lee, J.H., Lee, J.E., Kahng, J.Y., Kim, S.H., Park, J.S., Yoon, S.J., Um, J.-Y., Kim, W.K., Lee, J.-K., Park, J., et al. (2018). Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* *560*, 243–247.
- Lee, S.H., Rigas, N.K., Lee, C.-R., Bang, A., Srikanth, S., Gwack, Y., Kang, M.K., Kim, R.H., Park, N.-H., and Shin, K.-H. (2016). Orai1 promotes tumor progression by enhancing cancer stemness via NFAT signaling in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* *7*, 43239–43255.
- Lee, S.H., Kieu, C., Martin, C.E., Han, J., Chen, W., Kim, J.S., Kang, M.K., Kim, R.H., Park, N.-H., Kim, Y., et al. (2019). NFATc3 plays an oncogenic role in oral/oropharyngeal squamous cell carcinomas by promoting cancer stemness via expression of OCT4. *Oncotarget* *10*, 2306–2319.
- Leissring, M.A., Akbari, Y., Fanger, C.M., Cahalan, M.D., Mattson, M.P., and LaFerla, F.M. (2000). Capacitative Calcium Entry Deficits and Elevated Luminal Calcium Content in Mutant Presenilin-1 Knockin Mice. *J Cell Biol* *149*, 793–798.
- Leite, M.F., Thrower, E.C., Echevarria, W., Koulen, P., Hirata, K., Bennett, A.M., Ehrlich, B.E., and Nathanson, M.H. (2003). Nuclear and cytosolic calcium are regulated independently. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 2975–2980.
- Lepannetier, S., Zanou, N., Yerna, X., Emeriau, N., Dufour, I., Masquelier, J., Muccioli, G., Tajeddine, N., and Gailly, P. (2016). Sphingosine-1-phosphate-activated TRPC1 channel controls chemotaxis of glioblastoma cells. *Cell Calcium* *60*, 373–383.
- 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, G., Zhang, Z., Wang, R., Ma, W., Yang, Y., Wei, J., and Wei, Y. (2013). Suppression of STIM1 inhibits human glioblastoma cell proliferation and induces G0/G1 phase arrest. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* *32*, 1.
- Li, M., Chen, C., Zhou, Z., Xu, S., and Yu, Z. (2012). A TRPC1-mediated increase in store-operated Ca²⁺ entry is required for the proliferation of adult hippocampal neural progenitor cells. *Cell Calcium* *51*, 486–496.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., et al. (2008). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* *100*, 672–679.
- Li, Y., Guo, B., Xie, Q., Ye, D., Zhang, D., Zhu, Y., Chen, H., and Zhu, B. (2015). STIM1 Mediates Hypoxia-Driven Hepatocarcinogenesis via Interaction with HIF-1. *Cell Reports* *12*, 388–395.
- Li, Z., Bao, S., Wu, Q., Wang, H., Eyler, C., Sathornsumetee, S., Shi, Q., Cao, Y., Lathia, J., McLendon, R.E., et al. (2009). Hypoxia-Inducible Factors Regulate Tumorigenic Capacity of Glioma Stem Cells. *Cancer Cell* *15*, 501–513.

- Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular–Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8, a018820.
- Lim, D.A., Tramontin, A.D., Trevejo, J.M., Herrera, D.G., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin Antagonizes BMP Signaling to Create a Niche for Adult Neurogenesis. *Neuron* 28, 713–726.
- 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. *Molecular Cancer* 12.
- Liu, H., Hughes, J.D., Rollins, S., Chen, B., and Perkins, E. (2011). Calcium entry via ORAI1 regulates glioblastoma cell proliferation and apoptosis. *Experimental and Molecular Pathology* 91, 753–760.
- Liu, M., Inoue, K., Leng, T., Guo, S., and Xiong, Z. (2014). TRPM7 channels regulate glioma stem cell through STAT3 and Notch signaling pathways. *Cellular Signalling* 26, 2773–2781.
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F., and Bordey, A. (2005). Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8, 1179–1187.
- Liu, Z., Wei, Y., Zhang, L., Yee, P.P., Johnson, M., Zhang, X., Gulley, M., Atkinson, J.M., Trebak, M., Wang, H.-G., et al. (2018). Induction of store-operated calcium entry (SOCE) suppresses glioblastoma growth by inhibiting the Hippo pathway transcriptional coactivators YAP/TAZ. *Oncogene*.
- 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.
- Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica* 131, 803–820.
- Luchsinger, L.L., Strikoudis, A., Danzl, N.M., Bush, E.C., Finlayson, M.O., Satwani, P., Sykes, M., Yazawa, M., and Snoeck, H.-W. (2019). Harnessing Hematopoietic Stem Cell Low Intracellular Calcium Improves Their Maintenance In Vitro. *Cell Stem Cell* 25, 225-240.e7.
- Ma, S., Chan, K.-W., Hu, L., Lee, T.K.-W., Wo, J.Y.-H., Ng, I.O.-L., Zheng, B.-J., and Guan, X.-Y. (2007). Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology* 132, 2542–2556.
- MacDougall, M.S., Clarke, R., and Merrill, B.J. (2019). Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Nuclear Export Mediate Exit from Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell* 25, 210-224.e6.
- Maceyka, M., Harikumar, K.B., Milstien, S., and Spiegel, S. (2012). Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends in Cell Biology* 22, 50–60.

- Man, J., Yu, X., Huang, H., Zhou, W., Xiang, C., Huang, H., Miele, L., Liu, Z., Bebek, G., Bao, S., et al. (2018). Hypoxic Induction of Vasorin Regulates Notch1 Turnover to Maintain Glioma Stem-like Cells. *Cell Stem Cell* 22, 104-118.e6.
- Manji, S.S.M., Parker, N.J., Williams, R.T., van Stekelenburg, L., Pearson, R.B., Dziadek, M., and Smith, P.J. (2000). STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1481, 147-155.
- Marfia, G., Campanella, R., Navone, S.E., Di Vito, C., Riccitelli, E., Hadi, L.A., Bornati, A., de Rezende, G., Giussani, P., Tringali, C., et al. (2014). Autocrine/paracrine sphingosine-1-phosphate fuels proliferative and stemness qualities of glioblastoma stem cells: S1P Prompts Growth and Stemness of GSCs. *Glia* 62, 1968-1981.
- Marius, P., Guerra, M.T., Nathanson, M.H., Ehrlich, B.E., and Leite, M.F. (2006). Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum. *Cell Calcium* 39, 65-73.
- Marumoto, T., Tashiro, A., Friedmann-Morvinski, D., Scadeng, M., Soda, Y., Gage, F.H., and Verma, I.M. (2009). Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors. *Nature Medicine* 15, 110-116.
- Mathews, J.D., Forsythe, A.V., Brady, Z., Butler, M.W., Goergen, S.K., Byrnes, G.B., Giles, G.G., Wallace, A.B., Anderson, P.R., Guiver, T.A., et al. (2013). Cancer risk in 680 000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. *BMJ* 346, f2360.
- Matsuoka, N., Nozaki, K., Takagi, Y., Nishimura, M., Hayashi, J., Miyatake, S.-I., and Hashimoto, N. (2003). Adenovirus-mediated gene transfer of fibroblast growth factor-2 increases BrdU-positive cells after forebrain ischemia in gerbils. *Stroke* 34, 1519-1525.
- Matthews, G., Neher, E., and Penner, R. (1989). Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *J. Physiol. (Lond.)* 418, 105-130.
- Mercier, F. (2016). Fractones: extracellular matrix niche controlling stem cell fate and growth factor activity in the brain in health and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4661-4674.
- Mercier, F., and Douet, V. (2014). Bone morphogenetic protein-4 inhibits adult neurogenesis and is regulated by fractone-associated heparan sulfates in the subventricular zone. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 57-58, 54-61.
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17528-17532.
- Mignen, O., and Shuttleworth, T.J. (2000). I(ARC), a novel arachidonate-regulated, noncapacitative Ca(2+) entry channel. *J. Biol. Chem.* 275, 9114-9119.
- Mignen, O., Thompson, J.L., and Shuttleworth, T.J. (2007). STIM1 regulates Ca²⁺ entry via arachidonate-regulated Ca²⁺-selective (ARC) channels without store depletion or translocation to the plasma membrane. *J Physiol* 579, 703-715.

- Mignen, O., Thompson, J.L., and Shuttleworth, T.J. (2009). The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. *J. Physiol. (Lond.)* 587, 4181–4197.
- Mikoshiba, K. (2015). Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases. *Advances in Biological Regulation* 57, 217–227.
- Minard, A., Bauer, C., Wright, D., Rubaiy, H., Muraki, K., Beech, D., and Bon, R. (2018). Remarkable Progress with Small-Molecule Modulation of TRPC1/4/5 Channels: Implications for Understanding the Channels in Health and Disease. *Cells* 7, 52.
- Minke, B., Wu, C.-F., and Pak, W.L. (1975). Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant. *Nature* 258, 84–87.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., García-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3, 265–278.
- Mistry, A.M., Hale, A.T., Chambless, L.B., Weaver, K.D., Thompson, R.C., and Ihrie, R.A. (2017). Influence of glioblastoma contact with the lateral ventricle on survival: a meta-analysis. *J Neurooncol* 131, 125–133.
- Moharil, R.B., Dive, A., Khandekar, S., and Bodhade, A. (2017). Cancer stem cells: An insight. *J Oral Maxillofac Pathol* 21, 463.
- Moran, M.M., McAlexander, M.A., Bíró, T., and Szallasi, A. (2011). Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 601–620.
- Morelli, M.B., Nabissi, M., Amantini, C., Farfariello, V., Ricci-Vitiani, L., Martino, S. di, Pallini, R., Larocca, L.M., Caprodossi, S., Santoni, M., et al. (2012). The transient receptor potential vanilloid-2 cation channel impairs glioblastoma stem-like cell proliferation and promotes differentiation. *International Journal of Cancer* 131, E1067–E1077.
- Moreno-Jiménez, E.P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., Pallas-Bazarra, N., Ávila, J., and Llorens-Martín, M. (2019). Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease. *Nature Medicine* 25, 554–560.
- Morrison, C.D. (2009). Leptin signaling in brain: A link between nutrition and cognition? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1792, 401–408.
- Motiani, R.K., Hyzinski-García, M.C., Zhang, X., Henkel, M.M., Abdullaev, I.F., Kuo, Y.-H., Matrougui, K., Mongin, A.A., and Trebak, M. (2013). STIM1 and Orai1 mediate CRAC channel activity and are essential for human glioblastoma invasion. *Pflugers Arch.* 465, 1249–1260.
- Moyse, E., Bauer, S., Charrier, C., Coronas, V., Krantic, S., and Jean, A. (2006). Neurogenesis and neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brain: New vistas about autonomic regulations—a review. *Autonomic Neuroscience* 126–127, 50–58.

- Müller, S., Sindikubwabo, F., Cañeque, T., Lafon, A., Versini, A., Lombard, B., Loew, D., Durand, A., Vallot, C., Baulande, S., et al. (2019). CD44 regulates epigenetic plasticity by mediating iron endocytosis. *BioRxiv* 693424.
- Nadif, N.K., Bultynck, G., Sienaert, I., Callewaert, G., Erneux, C., Missiaen, L., Parys, J.B., and De, H.S. (2002). The role of calmodulin for inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function. *Biochim Biophys Acta* 1600, 19–31.
- Nascimento, M.A., Sorokin, L., and Coelho-Sampaio, T. (2018). Fractone Bulbs Derive from Ependymal Cells and Their Laminin Composition Influence the Stem Cell Niche in the Subventricular Zone. *J. Neurosci.* 38, 3880–3889.
- Nekrasov, E.D., Vigont, V.A., Klyushnikov, S.A., Lebedeva, O.S., Vassina, E.M., Bogomazova, A.N., Chestkov, I.V., Semashko, T.A., Kiseleva, E., Suldina, L.A., et al. (2016). Manifestation of Huntington’s disease pathology in human induced pluripotent stem cell-derived neurons. *Molecular Neurodegeneration* 11, 27.
- Nicoleau, C., Benzakour, O., Agasse, F., Thiriet, N., Petit, J., Prestoz, L., Roger, M., Jaber, M., and Coronas, V. (2009). Endogenous hepatocyte growth factor is a niche signal for subventricular zone neural stem cell amplification and self-renewal. *Stem Cells* 27, 408–419.
- Nilius, B., and Owsianik, G. (2011). The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology* 12, 218.
- Noctor, S.C., Flint, A.C., Weissman, T.A., Wong, W.S., Clinton, B.K., and Kriegstein, A.R. (2002). Dividing Precursor Cells of the Embryonic Cortical Ventricular Zone Have Morphological and Molecular Characteristics of Radial Glia. *J. Neurosci.* 22, 3161–3173.
- 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.
- Oh, M.C., Kim, J.M., Safaee, M., Kaur, G., Sun, M.Z., Kaur, R., Celli, A., Mauro, T.M., and Parsa, A.T. (2012). Overexpression of Calcium-Permeable Glutamate Receptors in Glioblastoma Derived Brain Tumor Initiating Cells. *PLOS ONE* 7, e47846.
- Oizel, K., Chauvin, C., Oliver, L., Gratas, C., Geraldo, F., Jarry, U., Scotet, E., Rabe, M., Alves-Guerra, M.-C., Teusan, R., et al. (2017). Efficient Mitochondrial Glutamine Targeting Prevails Over Glioblastoma Metabolic Plasticity. *Clinical Cancer Research* 23, 6292–6304.
- Omuro, A., Beal, K., McNeill, K., Young, R.J., Thomas, A., Lin, X., Terziev, R., Kaley, T.J., DeAngelis, L.M., Daras, M., et al. (2018). Multicenter Phase IB Trial of Carboxyamidotriazole Orotate and Temozolomide for Recurrent and Newly Diagnosed Glioblastoma and Other Anaplastic Gliomas. *J. Clin. Oncol.* 36, 1702–1709.
- Ong, H.L., de Souza, L.B., and Ambudkar, I.S. (2016). Role of TRPC Channels in Store-Operated Calcium Entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 898, 87–109.
- Ostrom, Q.T., Bauchet, L., Davis, F.G., Deltour, I., Fisher, J.L., Langer, C.E., Pekmezci, M., Schwartzbaum, J.A., Turner, M.C., Walsh, K.M., et al. (2014). The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. *Neuro-Oncology* 16, 896–913.

- Ozawa, T. (2010). Modulation of ryanodine receptor Ca²⁺ channels (Review). *Mol Med Rep* 3, 199–204.
- Paez-Gonzalez, P., Asrican, B., Rodriguez, E., and Kuo, C.T. (2014). Identification of distinct ChAT⁺ neurons and activity-dependent control of postnatal SVZ neurogenesis. *Nat Neurosci* 17, 934–942.
- Palma, V., Lim, D.A., Dahmane, N., Sánchez, P., Brionne, T.C., Herzberg, C.D., Gitton, Y., Carleton, A., Álvarez-Buylla, A., and Altaba, A.R. (2005). Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132, 335–344.
- Parekh, A.B., and Putney, J.W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews* 85, 757–810.
- Park, H.R., Park, M., Choi, J., Park, K.-Y., Chung, H.Y., and Lee, J. (2010). A high-fat diet impairs neurogenesis: involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neurosci. Lett.* 482, 235–239.
- Park Hopson, K., 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–C926.
- Pastrana, E., Cheng, L.-C., and Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6387–6392.
- Patel, A.P., Tirosh, I., Trombetta, J.J., Shalek, A.K., Gillespie, S.M., Wakimoto, H., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., et al. (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344, 1396–1401.
- Peretto, P., Cummings, D., Modena, C., Behrens, M., Venkatraman, G., Fasolo, A., and Margolis, F.L. (2002). BMP mRNA and protein expression in the developing mouse olfactory system. *Journal of Comparative Neurology* 451, 267–278.
- Perroud, J., Bernheim, L., Frieden, M., and Koenig, S. (2017). Distinct roles of NFATc1 and NFATc4 in human primary myoblast differentiation and in the maintenance of reserve cells. *J Cell Sci* 130, 3083–3093.
- Petrovic, M.M., Vales, K., Putnikovic, B., Djulejic, V., and Mitrovic, D.M. (2008). Ryanodine receptors, voltage-gated calcium channels and their relationship with protein kinase A in the myocardium. *Physiol Res* 57, 141–149.
- 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.
- Pierce, G.B., and Wallace, C. (1971). Differentiation of malignant to benign cells. *Cancer Res.* 31, 127–134.

- Pizzo, P., Lissandron, V., Capitanio, P., and Pozzan, T. (2011). Ca²⁺ signalling in the Golgi apparatus. *Cell Calcium* 50, 184–192.
- Pla, A.F., Maric, D., Brazer, S.-C., Giacobini, P., Liu, X., Chang, Y.H., Ambudkar, I.S., and Barker, J.L. (2005). Canonical Transient Receptor Potential 1 Plays a Role in Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)/FGF Receptor-1-Induced Ca²⁺ Entry and Embryonic Rat Neural Stem Cell Proliferation. *J. Neurosci.* 25, 2687–2701.
- Ponti, D., Costa, A., Zaffaroni, N., Pratesi, G., Petrangolini, G., Coradini, D., Pilotti, S., Pierotti, M.A., and Daidone, M.G. (2005). Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 65, 5506–5511.
- Porlan, E., Martí-Prado, B., Morante-Redolat, J.M., Consiglio, A., Delgado, A.C., Kypta, R., López-Otín, C., Kirstein, M., and Fariñas, I. (2014). MT5-MMP regulates adult neural stem cell functional quiescence through the cleavage of N-cadherin. *Nat. Cell Biol.* 16, 629–638.
- Prakriya, M., and Lewis, R.S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 95, 1383–1436.
- Putney, J.W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1–12.
- Qiu, R., and Lewis, R.S. (2019). Structural features of STIM and Orai underlying store-operated calcium entry. *Current Opinion in Cell Biology* 57, 90–98.
- Qu, Q., Sun, G., Li, W., Yang, S., Ye, P., Zhao, C., Yu, R.T., Gage, F.H., Evans, R.M., and Shi, Y. (2010). Orphan nuclear receptor TLX activates Wnt/ β -catenin signalling to stimulate neural stem cell proliferation and self-renewal. *Nat Cell Biol* 12, 31–40.
- Racioppi, L., Lento, W., Huang, W., Arvai, S., Doan, P.L., Harris, J.R., Marcon, F., Nakaya, H.I., Liu, Y., and Chao, N. (2017). Calcium/calmodulin-dependent kinase kinase 2 regulates hematopoietic stem and progenitor cell regeneration. *Cell Death Dis* 8, e3076.
- Rakic, P. (1988). Specification of cerebral cortical areas. *Science* 241, 170–176.
- Ramírez-Castillejo, C., Sánchez-Sánchez, F., Andreu-Agulló, C., Ferrón, S.R., Aroca-Aguilar, J.D., Sánchez, P., Mira, H., Escribano, J., and Fariñas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9, 331–339.
- Ramos-Rodriguez, J.J., Molina-Gil, S., Ortiz-Barajas, O., Jimenez-Palomares, M., Perdomo, G., Cozar-Castellano, I., Lechuga-Sancho, A.M., and Garcia-Alloza, M. (2014). Central Proliferation and Neurogenesis Is Impaired in Type 2 Diabetes and Prediabetes Animal Models. *PLoS One* 9.
- Rana, A., Yen, M., Sadaghiani, A.M., Malmersjö, S., Park, C.Y., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2015). Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *J Cell Biol* 209, 653–670.
- Reni, M., Mazza, E., Zanon, S., Gatta, G., and Vecht, C.J. (2017). Central nervous system gliomas. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 113, 213–234.

- Renoux, B., Raes, F., Legigan, T., Péraudeau, E., Eddhif, B., Poinot, P., Tranoy-Opalinski, I., Alsarraf, J., Koniev, O., Kolodych, S., et al. (2017). Targeting the tumour microenvironment with an enzyme-responsive drug delivery system for the efficient therapy of breast and pancreatic cancers. *Chem. Sci.* *8*, 3427–3433.
- 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., Lombardi, D.G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Todaro, M., Peschle, C., and De Maria, R. (2007). Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* *445*, 111–115.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., and Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* *13*, 566–578.
- Robil, N., Petel, F., Kilhoffer, M.-C., and Haiech, J. (2015). Glioblastoma and calcium signaling - analysis of calcium toolbox expression. *The International Journal of Developmental Biology* *59*, 407–415.
- Rodney, G.G., Wilson, G.M., and Schneider, M.F. (2005). A calmodulin binding domain of RyR increases activation of spontaneous Ca²⁺ sparks in frog skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* *280*, 11713–11722.
- Rodríguez-Moyano, M., Díaz, I., Dionisio, N., Zhang, X., Avila-Medina, J., Calderón-Sánchez, E., Trebak, M., Rosado, J.A., Ordóñez, A., and Smani, T. (2013). Urotensin-II promotes vascular smooth muscle cell proliferation through store-operated calcium entry and EGFR transactivation. *Cardiovasc. Res.* *100*, 297–306.
- Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A.V., Ohlsen, K., Lioudyno, 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 Ca²⁺ channel function. *J. Cell Biol.* *169*, 435–445.
- Rosenberg, S.S., and Spitzer, N.C. (2011). Calcium Signaling in Neuronal Development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*, a004259.
- Sabbioni, S., Barbanti-Brodano, G., Croce, C.M., and Negrini, M. (1997). GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development. *Cancer Res.* *57*, 4493–4497.
- Sabourin, J., Lamiche, C., Vandebrouck, A., Magaud, C., Rivet, J., Cognard, C., Bourmeyster, N., and Constantin, B. (2009). Regulation of TRPC1 and TRPC4 Cation Channels Requires an α 1-Syntrophin-dependent Complex in Skeletal Mouse Myotubes. *J. Biol. Chem.* *284*, 36248–36261.
- Sachdeva, R., Wu, M., Johnson, K., Kim, H., Celebre, A., Shahzad, U., Graham, M.S., Kessler, J.A., Chuang, J.H., Karamchandani, J., et al. (2019). BMP signaling mediates glioma stem cell quiescence and confers treatment resistance in glioblastoma. *Sci Rep* *9*, 1–14.
- Sanai, N., Tramontin, A.D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-García Verdugo, J., et al. (2004).

Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427, 740–744.

Sandberg, C.J., Vik-Mo, E.O., Behnan, J., Helseth, E., and Langmoen, I.A. (2014). Transcriptional Profiling of Adult Neural Stem-Like Cells from the Human Brain. *PLoS One* 9.

Santulli, G., Lewis, D., Georges, A. des, Marks, A.R., and Frank, J. (2018). Ryanodine Receptor Structure and Function in Health and Disease. *Sub-Cellular Biochemistry* 87, 329.

Sauvageot, C.M., and Stiles, C.D. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 12, 244–249.

Schleifer, H., Doleschal, B., Lichtenegger, M., Oppenrieder, R., Derler, I., Frischauf, I., Glasnov, T., Kappe, C., Romanin, C., and Groschner, K. (2012). Novel pyrazole compounds for pharmacological discrimination between receptor-operated and store-operated Ca²⁺ entry pathways: Modulation of cellular Ca²⁺ handling by pyrazoles. *Br J Pharmacol* 167, 1712–1722.

Schwaller, B. (2010). Cytosolic Ca²⁺ buffers. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a004051.

Scopa, C., Marrocco, F., Latina, V., Ruggeri, F., Corvaglia, V., Regina, F.L., Ammassari-Teule, M., Middei, S., Amadoro, G., Meli, G., et al. (2019). Impaired adult neurogenesis is an early event in Alzheimer's disease neurodegeneration, mediated by intracellular A β oligomers. *Cell Death Differ* 1–15.

Scrideli, C.A., Carlotti, C.G., Okamoto, O.K., Andrade, V.S., Cortez, M.A.A., Motta, F.J.N., Lucio-Eterovic, A.K., Neder, L., Rosemberg, S., Oba-Shinjo, S.M., et al. (2008). Gene expression profile analysis of primary glioblastomas and non-neoplastic brain tissue: identification of potential target genes by oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *J. Neurooncol.* 88, 281–291.

Secondo Agnese, Petrozziello Tiziana, Tedeschi Valentina, Boscia Francesca, Vinciguerra Antonio, Ciccone Roselia, Pannaccione Anna, Molinaro Pasquale, Pignataro Giuseppe, and Annunziato Lucio (2019). ORA1/STIM1 Interaction Intervenes in Stroke and in Neuroprotection Induced by Ischemic Preconditioning Through Store-Operated Calcium Entry. *Stroke* 50, 1240–1249.

Segerman, A., Niklasson, M., Haglund, C., Bergström, T., Jarvius, M., Xie, Y., Westermark, A., Sönmez, D., Hermansson, A., Kastemar, M., et al. (2016). Clonal Variation in Drug and Radiation Response among Glioma-Initiating Cells Is Linked to Proneural-Mesenchymal Transition. *Cell Reports* 17, 2994–3009.

Segura, S., Efthimiadi, L., Porcher, C., Courtes, S., Coronas, V., Krantic, S., and Moyse, E. (2015). Leptin-dependent neurotoxicity via induction of apoptosis in adult rat neurogenic cells. *Front Cell Neurosci* 9, 350.

Seufert, J., Kieffer, T.J., Leech, C.A., Holz, G.G., Moritz, W., Ricordi, C., and Habener, J.F. (1999). Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic

islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *84*, 670–676.

Shanley, L.J., Irving, A.J., and Harvey, J. (2001). Leptin Enhances NMDA Receptor Function and Modulates Hippocampal Synaptic Plasticity. *J Neurosci* *21*, RC186.

Shanley, L.J., O'Malley, D., Irving, A.J., Ashford, M.L., and Harvey, J. (2002). Leptin inhibits epileptiform-like activity in rat hippocampal neurones via PI 3-kinase-driven activation of BK channels. *J Physiol* *545*, 933–944.

Shen, Q., Wang, Y., Kokovay, E., Lin, G., Chuang, S.-M., Goderie, S.K., Roysam, B., and Temple, S. (2008). Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: A quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell* *3*, 289–300.

Shen, R., Mo, Q., Schultz, N., Seshan, V.E., Olshen, A.B., Huse, J., Ladanyi, M., and Sander, C. (2012). Integrative Subtype Discovery in Glioblastoma Using iCluster. *PLOS ONE* *7*, e35236.

Shimokawa, M., Ohta, Y., Nishikori, S., Matano, M., Takano, A., Fujii, M., Date, S., Sugimoto, S., Kanai, T., and Sato, T. (2017). Visualization and targeting of LGR5+ human colon cancer stem cells. *Nature* *545*, 187–192.

Shin, D.M., Son, A., Park, S., Kim, M.S., Ahuja, M., and Muallem, S. (2016). The TRPCs, Orais and STIMs in ER/PM Junctions. *Adv. Exp. Med. Biol.* *898*, 47–66.

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 Research* *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.

Sinnaeve, J., Mobley, B.C., and Ihrie, R.A. (2018). Space Invaders: Brain Tumor Exploitation of the Stem Cell Niche. *Am J Pathol* *188*, 29–38.

Somasundaram, A., Shum, A.K., McBride, H.J., Kessler, J.A., Feske, S., Miller, R.J., and Prakriya, M. (2014). Store-operated CRAC channels regulate gene expression and proliferation in neural progenitor cells. *J. Neurosci.* *34*, 9107–9123.

Sorrells, S.F., Paredes, M.F., Cebrian-Silla, A., Sandoval, K., Qi, D., Kelley, K.W., James, D., Mayer, S., Chang, J., Auguste, K.I., et al. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* *555*, 377–381.

Sorrentino, V. (2003). Ryanodine receptor type 3: why another ryanodine receptor isoform? *Front. Biosci.* *8*, d176-182.

Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S.G.M., Touloumis, A., Collins, V.P., Marioni, J.C., Curtis, C., Watts, C., and Tavaré, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *PNAS* *110*, 4009–4014.

- de Sousa e Melo, F., Kurtova, A.V., Harnoss, J.M., Kljavin, N., Hoeck, J.D., Hung, J., Anderson, J.E., Storm, E.E., Modrusan, Z., Koeppen, H., et al. (2017). A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* 543, 676–680.
- Stathopoulos, P.B., Zheng, L., and Ikura, M. (2009). Stromal Interaction Molecule (STIM) 1 and STIM2 Calcium Sensing Regions Exhibit Distinct Unfolding and Oligomerization Kinetics. *J. Biol. Chem.* 284, 728–732.
- Stauffer, T.P., Guerini, D., and Carafoli, E. (1995). Tissue Distribution of the Four Gene Products of the Plasma Membrane Ca Pump A STUDY USING SPECIFIC ANTIBODIES. *J. Biol. Chem.* 270, 12184–12190.
- Stewart, T.A., Yapa, K.T.D.S., and Monteith, G.R. (2015). Altered calcium signaling in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1848, 2502–2511.
- Strehler, E.E., Filoteo, A.G., Penniston, J.T., and Caride, A.J. (2007). Plasma-membrane Ca(2+) pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 919–922.
- Stump, G., Durrer, A., Klein, A.-L., Lütolf, S., Suter, U., and Taylor, V. (2002). Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain. *Mechanisms of Development* 114, 153–159.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *New England Journal of Medicine* 352, 987–996.
- Sun, M., Liao, B., Tao, Y., Chen, H., Xiao, F., Gu, J., Gao, S., and Jin, Y. (2016). Calcineurin-NFAT Signaling Controls Somatic Cell Reprogramming in a Stage-Dependent Manner: CALCINEURIN-NFAT SIGNALING IN REPROGRAMMING. *Journal of Cellular Physiology* 231, 1151–1162.
- Sun, S., Zhang, H., Liu, J., Popugaeva, E., Xu, N.-J., Feske, S., White, C.L., and Bezprozvanny, I. (2014). Reduced Synaptic STIM2 Expression and Impaired Store-Operated Calcium Entry Cause Destabilization of Mature Spines in Mutant Presenilin Mice. *Neuron* 82, 79–93.
- Swartling, F.J., Bolin, S., Phillips, J.J., and Persson, A.I. (2014). Signals that regulate the oncogenic fate of neural stem cells and progenitors. *Experimental Neurology* 260, 56–68.
- Tajeddine, N., and Gailly, P. (2012). TRPC1 Protein Channel Is Major Regulator of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling. *J Biol Chem* 287, 16146–16157.
- Takahashi, Y., Murakami, M., Watanabe, H., Hasegawa, H., Ohba, T., Munehisa, Y., Nobori, K., Ono, K., Iijima, T., and Ito, H. (2007). Essential role of the N-terminus of murine Orai1 in store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 45–52.
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S.S.W., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S.A.K., Shimada, Y., and Wang, T.C. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells* 27, 1006–1020.

- Tano, J.-Y.K., Lee, R.H., and Vazquez, G. (2012). Macrophage function in atherosclerosis. *Channels (Austin)* 6, 141–148.
- Teo, W.-Y., Sekar, K., Seshachalam, P., Shen, J., Chow, W.-Y., Lau, C.C., Yang, H., Park, J., Kang, S.-G., Li, X., et al. (2019). Relevance of a TCGA-derived Glioblastoma Subtype Gene-Classifer among Patient Populations. *Sci Rep* 9, 1–10.
- Terrié, E., Coronas, V., and Constantin, B. (2019). Role of the calcium toolkit in cancer stem cells. *Cell Calcium* 80, 141–151.
- Theocharidis, U., Long, K., French-Constant, C., and Faissner, A. (2014). Regulation of the neural stem cell compartment by extracellular matrix constituents. In *Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 3–28.
- Tobin, M.K., Musaraca, K., Disouky, A., Shetti, A., Bheri, A., Honer, W.G., Kim, N., Dawe, R.J., Bennett, D.A., Arfanakis, K., et al. (2019). Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer’s Disease Patients. *Cell Stem Cell* 24, 974-982.e3.
- Tomaso, T.D., Mazzoleni, S., Wang, E., Sovena, G., Clavenna, D., Franzin, A., Mortini, P., Ferrone, S., Doglioni, C., Marincola, F.M., et al. (2010). Immunobiological Characterization of Cancer Stem Cells Isolated from Glioblastoma Patients. *Clin Cancer Res* 16, 800–813.
- Tong, C.K., Chen, J., Cebrián-Silla, A., Mirzadeh, Z., Obernier, K., Guinto, C.D., Tecott, L.H., García-Verdugo, J.M., Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Axonal Control of the Adult Neural Stem Cell Niche. *Cell Stem Cell* 14, 500–511.
- Tramontin, A.D., García-Verdugo, J.M., Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2003). Postnatal Development of Radial Glia and the Ventricular Zone (VZ): a Continuum of the Neural Stem Cell Compartment. *Cereb Cortex* 13, 580–587.
- Tropepe, V., Sibilio, M., Ciruna, B.G., Rossant, J., Wagner, E.F., and van der Kooy, D. (1999). Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Developmental Biology* 208, 166–188.
- Trusolino, L., Bertotti, A., and Comoglio, P.M. (2010). MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 834–848.
- Vachel, L., Norez, C., Jayle, C., Becq, F., and Vandebrouck, C. (2015). The low PLC- δ 1 expression in cystic fibrosis bronchial epithelial cells induces upregulation of TRPV6 channel activity. *Cell Calcium* 57, 38–48.
- Van Coppenolle, F., Vanden Abeele, F., Slomianny, C., Flourakis, M., Hesketh, J., Dewailly, E., and Prevarskaya, N. (2004). Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J. Cell. Sci.* 117, 4135–4142.
- Vandebrouck, C., Martin, D., Schoor, M.C.-V., Debaix, H., and Gailly, P. (2002). Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *The Journal of Cell Biology* 158, 1089–1096.

- Vandecaetsbeek, I., Vangheluwe, P., Raeymaekers, L., Wuytack, F., and Vanoevelen, J. (2011). The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Gordienko, D., Beck, B., Panchin, Y.V., Baranova, A.V., Ivanov, D.V., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006). Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J. Cell Biol.* 174, 535–546.
- Vennekens, R., Menigoz, A., and Nilius, B. (2012). TRPs in the Brain. In *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 163, B. Nilius, S.G. Amara, T. Gudermann, R. Jahn, R. Lill, S. Offermanns, and O.H. Petersen, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 27–64.
- Verbert, L., Lee, B., Kocks, S.L., Assefa, Z., Parys, J.B., Missiaen, L., Callewaert, G., Fissore, R.A., De Smedt, H., and Bultynck, G. (2008). Caspase-3-truncated type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor enhances intracellular Ca²⁺ leak and disturbs Ca²⁺ signalling. *Biol. Cell* 100, 39–49.
- Verhaak, R.G.W., 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 Melo, 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.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., et al. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* 312, 1220–1223.
- Wang, J., Shen, J., Zhao, K., Hu, J., Dong, J., and Sun, J. (2019). STIM1 overexpression in hypoxia microenvironment contributes to pancreatic carcinoma progression. *Cancer Biol Med* 16, 100–108.
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A.C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., et al. (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* 32, 42–56.e6.
- Wang, X., Mao, X., Xie, L., Sun, F., Greenberg, D.A., and Jin, K. (2012). Conditional Depletion of Neurogenesis Inhibits Long-Term Recovery after Experimental Stroke in Mice. *PLOS ONE* 7, e38932.
- Wee, B., Pietras, A., Ozawa, T., Bazzoli, E., Podlaha, O., Antczak, C., Westermarck, B., Nelander, S., Uhrbom, L., Forsberg-Nilsson, K., et al. (2016). ABCG2 regulates self-renewal and stem cell marker expression but not tumorigenicity or radiation resistance of glioma cells. *Sci Rep* 6, 1–9.

- Wee, S., Niklasson, M., Marinescu, V.D., Segerman, A., Schmidt, L., Hermansson, A., Dirks, P., Forsberg-Nilsson, K., Westermarck, B., Uhrbom, L., et al. (2014). Selective Calcium Sensitivity in Immature Glioma Cancer Stem Cells. *PLoS One* 9.
- Wrensch, M., Lee, M., Miike, R., Newman, B., Bargar, G., Davis, R., Wiencke, J., and Neuhaus, J. (1997). Familial and Personal Medical History of Cancer and Nervous System Conditions among Adults with Glioma and Controls. *Am J Epidemiol* 145, 581–593.
- Wu, A., Wei, J., Kong, L.-Y., Wang, Y., Priebe, W., Qiao, W., Sawaya, R., and Heimberger, A.B. (2010). Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol* 12, 1113–1125.
- Wu, S., Cioffi, E.A., Alvarez, D., Sayner, S.L., Chen, H., Cioffi, D.L., King, J., Creighton, J.R., Townsley, M., Goodman, S.R., et al. (2005). Essential role of a Ca²⁺-selective, store-operated current (ISOC) in endothelial cell permeability: determinants of the vascular leak site. *Circ. Res.* 96, 856–863.
- Xie, J., Pan, H., Yao, J., Zhou, Y., and Han, W. (2016). SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives: SOCE and cancer. *International Journal of Cancer* 138, 2067–2077.
- Yáñez, M., Gil-Longo, J., and Campos-Toimil, M. (2012). Calcium binding proteins. *Adv. Exp. Med. Biol.* 740, 461–482.
- Yoshida, Y., Nakada, M., Sugimoto, N., Harada, T., Hayashi, Y., Kita, D., Uchiyama, N., Hayashi, Y., Yachie, A., Takuwa, Y., et al. (2010). Sphingosine-1-phosphate receptor type 1 regulates glioma cell proliferation and correlates with patient survival. *Int. J. Cancer* 126, 2341–2352.
- Young, G.S., Macklin, E.A., Setayesh, K., Lawson, J.D., Wen, P.Y., Norden, A.D., Drappatz, J., and Kesari, S. (2011). Longitudinal MRI evidence for decreased survival among periventricular glioblastoma. *J. Neurooncol.* 104, 261–269.
- Zanou, N., Schakman, O., Louis, P., Ruegg, U.T., Dietrich, A., Birnbaumer, L., and Gailly, P. (2012). Trpc1 Ion Channel Modulates Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway during Myoblast Differentiation and Muscle Regeneration. *J. Biol. Chem.* 287, 14524–14534.
- Zhang, R., Zhang, Z., Zhang, C., Zhang, L., Robin, A., Wang, Y., Lu, M., and Chopp, M. (2004). Stroke Transiently Increases Subventricular Zone Cell Division from Asymmetric to Symmetric and Increases Neuronal Differentiation in the Adult Rat. *J. Neurosci.* 24, 5810–5815.
- Zhang, S.L., Yeromin, A.V., Hu, J., Amcheslavsky, A., Zheng, H., and Cahalan, M.D. (2011). Mutations in Orai1 transmembrane segment 1 cause STIM1-independent activation of Orai1 channels at glycine 98 and channel closure at arginine 91. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 17838–17843.
- Zhang, Y., Cruickshanks, N., Yuan, F., Wang, B., Pahuski, M., Wulfkühle, J., Gallagher, I., Koepfel, A.F., Hatfield, S., Papanicolas, C., et al. (2017). Targetable T-type Calcium Channels Drive Glioblastoma. *Cancer Research* 77, 3479–3490.

Zhao, C., Blum, J., Chen, A., Kwon, H.Y., Jung, S.H., Cook, J.M., Lagoo, A., and Reya, T. (2007). Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell* *12*, 528–541.

Zheng, L., Stathopoulos, P.B., Li, G.-Y., and Ikura, M. (2008). Biophysical characterization of the EF-hand and SAM domain containing Ca²⁺ sensory region of STIM1 and STIM2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *369*, 240–246.

Zhou, Q., Yen, A., Rymarczyk, G., Asai, H., Trengrove, C., Aziz, N., Kirber, M.T., Mostoslavsky, G., Ikezu, T., Wolozin, B., et al. (2016). Impairment of PARK14 -dependent Ca²⁺ signalling is a novel determinant of Parkinson's disease. *Nat Commun* *7*, 1–14.

Zhu, X., Jiang, M., Peyton, M., Boulay, G., Hurst, R., Stefani, E., and Birnbaumer, L. (1996). *trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell* *85*, 661–671.

Zigova, T., Pencea, V., Wiegand, S.J., and Luskin, M.B. (1998). Intraventricular Administration of BDNF Increases the Number of Newly Generated Neurons in the Adult Olfactory Bulb. *Molecular and Cellular Neuroscience* *11*, 234–245.

Zitt, C., Zobel, A., Obukhov, A.G., Harteneck, C., Kalkbrenner, F., Lückhoff, A., and Schultz, G. (1996). Cloning and functional expression of a human Ca²⁺-permeable cation channel activated by calcium store depletion. *Neuron* *16*, 1189–1196.

Rôle de la signalisation calcique dépendante des Store-Operated Channels (SOC) dans les cellules souches neurales adultes et les cellules souches cancéreuses de glioblastomes.

Des cellules souches neurales (CSN) persistent dans le cerveau adulte et produisent des neurones et des cellules gliales tout au long de la vie de l'individu. Les CSN suscitent un intérêt considérable pour la médecine régénératrice mais leur utilisation thérapeutique potentielle nécessite au préalable d'approfondir les connaissances sur leurs mécanismes de régulation. Les glioblastomes, quant à eux, sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte et les plus mortelles. Au sein de ces tumeurs, les cellules souches de glioblastomes (CSG) seraient issues de la transformation maligne des CSN et seraient responsables de l'initiation, de la propagation et de la résistance aux traitements des tumeurs.

Des analyses transcriptomiques ont suggéré un rôle majeur de la signalisation calcique au sein des CSN et des CSG. Représentant une des voies principales d'entrée du calcium dans la cellule, les canaux calciques SOC (Store-Operated Channels) régulent de nombreux processus cellulaires, y compris la progression tumorale. L'objectif des travaux de cette thèse est d'évaluer le rôle des SOC dans les CSN et les CSG.

Nous avons établi par des approches *in vitro* et *in vivo*, que les CSN de souris adulte expriment des SOC fonctionnels et que leur inhibition pharmacologique diminue la prolifération et l'autorenouvellement des CSN, propriété indispensable au maintien de la population souche. La deuxième partie de nos travaux montre que les CSG issues de cultures primaires de patients expriment des SOC dont l'inhibition altère la prolifération et l'autorenouvellement de ces cellules.

Ainsi, les résultats obtenus lors de cette thèse mettent en évidence un rôle essentiel des SOC dans la régulation de l'autorenouvellement des CSN et des CSG. Les CSG étant responsables de la résistance aux traitements dans le glioblastome, ces travaux ouvrent des perspectives thérapeutiques ciblant les canaux calciques pour contrer cette pathologie au pronostic sombre.

Mots clefs : cellule souche adulte, cellule souche neurale, glioblastome, cellule souche cancéreuse, signalisation calcique, Ca²⁺, store-operated channels, SOC, Orai1/TRPC1/STIM, autorenouvellement

Role of Store-Operated Channels (SOC) –dependent calcium signaling in neural stem cells and cancer stem cells from glioblastomas.

Neural stem cells (NSC) persist in the brain of adult mammals and fuel the brain with new neurons and glial cells all lifelong. Recruited by brain injuries, NSC are considered with great interest by regenerative medicine. However, the development of new therapeutic approaches based on the use of NSC requires an in-depth knowledge of the mechanism regulating these cells. Glioblastomas are the most frequent and deadliest form of adult brain tumors. Within the tumor, glioblastoma stem cells (GSC) form a subpopulation of cells that is considered as responsible of tumor initiation, propagation and relapse, as these cells are particularly resistant to treatments. GSC and NSC share key characteristics and numerous studies suggest that GSC arise from transformed NSC.

Transcriptomic analysis of NSC and of GSC revealed an enrichment of calcium signaling transcripts in these two cell populations. Representing a major way of calcium influx into cells, Store-Operated Channels (SOC) are mobilized in response to a wide range of extracellular factors. SOC regulate many cellular processes and are often hijacked in cancer to promote tumor progression.

The aim of this thesis is to evaluate potential SOC involvement in NSC and GSC regulation.

The first part of this work, relying on *in vitro* and *in vivo* studies, demonstrates that NSC from adult mice express functional SOC whose inhibition by pharmacological agents reduces NSC proliferation and self-renewal. In the second part of this thesis, we demonstrate that GSC from primary cultures derived from patients express SOC, as do NSC, and that SOC inhibition reduces GSC ability to proliferate and self-renew.

Accordingly, the results of this thesis demonstrate that SOC regulate NSC and GSC self-renewal, a property that is essential to maintain stem cells pool. As GSC are responsible for glioblastomas treatment resistance, our studies point to a potential new therapeutic way, *via* calcium channels, against this deadly pathology.

Key words: adult stem cells, neural stem cells, cancer stem cells, glioblastoma, self-renewal, Ca²⁺, calcium signaling, store-operated channels, SOC, Orai1/TRPC1/STIM1