

UNIVERSITE LILLE 1

Année 2009

N°d'ordre : 4392

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 1

Discipline : Biologie-Santé

**Rôle des canaux calciques de la membrane
plasmique dans la prolifération des
cellules tumorales hépatiques**

dirigée par le Dr. Thierry CAPIOD

présentée et soutenue publiquement par

Charbel EL BOUSTANY

le 3 Juillet 2009

devant le jury composé de :

Président : Pr. J. Mazurier, Professeur d'Université, Lille
Rapporteurs : Dr. A-M. Lompré, Directeur de Recherche INSERM, Paris
Pr. J-P. Savineau, Professeur d'Université, Bordeaux
Examineurs : Pr. H. Ouadid-Ahidouch, Professeur d'Université, Amiens
Dr. P. Mariot, Maître de conférence, Lille
Dr. T. Capiod, Chargé de Recherche INSERM, Lille

*Thèse réalisée au sein du laboratoire INSERM U800
Villeneuve d'Ascq - Lille*

Rôle des canaux calciques de la membrane plasmique dans la prolifération des cellules tumorales hépatiques

La tumeur maligne primitive du foie la plus fréquente est le carcinome hépatocellulaire. Le développement des cellules tumorales hépatiques dépend d'un influx calcique dont la base moléculaire, dans le foie, est constituée de TRPC6, des STIM1 et 2, et de Orai1. Nous avons recherché si le développement de ces tumeurs était accompagné d'un changement du profil d'expression de ces protéines.

Nous avons montré que le canal TRPC6 est absent des hépatocytes humains sains mais fortement exprimé dans les tumeurs hépatiques, les foyers d'expression de TRPC6 étant visibles uniquement dans les zones tumorales du foie. Le niveau d'expression de TRPC6 dépend de certains facteurs de croissance et cette expression est directement corrélée à l'amplitude de l'entrée de calcium et à la prolifération cellulaire des hépatomes humains. STIM1 et Orai1 sont aussi impliqués dans cette relation, l'inhibition de l'expression de TRPC6, STIM1 ou Orai1 entraînant une baisse de l'expression des cyclines D1 dans ces cellules. Inversement, le blocage du cycle cellulaire va entraîner, de manière réversible (<4heures), une importante réduction de l'entrée de calcium. Les cultures primaires d'hépatocytes humains nous ont permis de confirmer ces résultats, démontrant ainsi la relation étroite entre entrée calcique et prolifération cellulaire. Nos derniers résultats ont montré que la base moléculaire de cette entrée dépend du type cellulaire utilisé mais que Orai1 en est la pièce centrale.

Ce travail de thèse a permis d'élargir les connaissances sur la composition du complexe moléculaire formant l'entrée calcique directement impliquée dans la prolifération cellulaire et le développement de tumeurs hépatiques.

Mots-clés : canaux calciques – TRPC6 – Orai1 – STIM – CCE – hépatomes humains – hépatocytes humains – prolifération – facteurs de croissance – cycle cellulaire – cancer du foie.

Role of plasma membrane calcium channels in tumoral cell proliferation in human liver

Hepatocellular carcinoma is the most frequent primary liver tumor. Tumoral cell proliferation depends on calcium influx which molecular basis in human liver is formed of TRPC6, STIM1 and 2, and Orai1. We have investigated whether tumors' development in human livers was accompanied by a change in the pattern of expression of these proteins.

We have shown that TRPC6 channel is absent in healthy human hepatocytes but strongly expressed in human liver tumors, and TRPC6 expression is only detectable in the tumor zones. TRPC6 expression level depends on growth factors, and this expression is directly correlated with the amplitude of the calcium entry and cell proliferation of human hepatoma cell line. STIM1 and Orai1 also play a major role in this process and inhibition of the expression of TRPC6, STIM1 or Orai1 causes a decrease in cyclin D1 expression in human hepatoma cell line. Conversely, cell cycle block results in a large decrease in calcium influx that quickly reversed in less than 4 hours after cell cycle release. Primary cultures of human hepatocytes allowed us to confirm these results, emphasizing the tight relation between calcium influx and cell proliferation. Our recent data strongly suggested that the molecular basis of this calcium entry varies from one cell type to another, with Orai1 as the core of this plasma membrane complex.

In conclusion, this thesis has expanded the knowledge about the actors of calcium entry and their role in the proliferation of both liver cells and liver cancer development.

Keywords: calcium channels - TRPC6 - Orai1 - STIM - CCE - Human hepatoma - human hepatocytes - proliferation - growth factors - cell cycle - liver cancer.

En premier lieu, j'aimerais remercier vivement, mon directeur de thèse, *Monsieur le Docteur Thierry CAPIOD*, pour l'encadrement, la formation, l'attention et le soutien qu'il a porté à mon travail de doctorant.

Je remercie également *Madame le Professeur Natalia PREVARSKAYA* qui m'a accueilli au sein de son unité INSERM U800.

J'aimerais de même remercier *Madame le Docteur Anne-Marie LOMPRÉ* qui m'a fait l'honneur d'exercer la fonction de rapporteur de ma thèse.

J'exprime mes remerciements à *Monsieur le Professeur Jean-Pierre SAVINEAU* qui a bien voulu accepter d'être un rapporteur pour ce travail.

Mes remerciements s'adressent ensuite aux examinateurs de ma thèse : *Madame le professeur Halima OUADID-AHIDOUCH*, *Monsieur le professeur Joël MAZURIER* et *Monsieur le Docteur Pascal MARIOT*.

Je souhaite inclure dans mes remerciements les personnes qui ont bien voulu me faire part de leur savoir-faire technique, notamment : Monsieur Etienne DEWAILLY, Madame Nathalie JOUY, Monsieur le Docteur Christian SLOMIANNY, Monsieur le Docteur Florian GACKIERE, Monsieur le Docteur Michaël MONET et Monsieur le Docteur Gabriel BIDAUX.

Je remercie chaleureusement le Docteur Maria KATSOGIANNOU et Madame Michèle MASURELLE.

J'aimerais remercier particulièrement : les membres de la ΔT , le cher camarade, Monsieur le directeur, et poupée.

Je remercie tous les collègues de l'Unité 800.

J'adresse mes remerciements au personnel du service de restauration universitaire du CROUS, notamment le personnel du R.U. Pariselle, pour leur amabilité et leur dévouement dans la confection de bons plats et desserts pendant ces 10 dernières années.

A ma famille

MERCI...

Du père au fils

(Il y a de cela dix ans)

جاري نبع العلم و اقص
 و من وقتك للعدرا ارصد
 و اللي مع الله الله معو
 و اللي بيزرع لازم يحصد

الأب الشاعر حلیم البستاني

Longe la source du savoir
 Fie toi à la Vierge de l'espoir

Celui qui cherche Dieu, l'aura à ses cotés
 Celui qui sèmera, finira par récolter

Le père et poète Halim EL BOUSTANY

Table des matières

<i>Glossaire et abréviations</i>	11
<i>Introduction</i>	14
I) Physiologie du foie	15
<i>I.A) Anatomie générale du foie</i>	15
<i>I.B) Vascularisation du foie</i>	17
<i>I.C) Voies biliaires intra et extra-hépatiques</i>	17
<i>I.D) Embryologie du foie</i>	18
<i>I.E) Structure du foie</i>	18
<i>I.F) Cellules du foie</i>	19
<i>I.G) Fonctions du foie</i>	20
<i>Fonction de réservoir sanguin</i>	
<i>Fonction immunitaire</i>	
<i>Fonction métabolique</i>	
<i>Fonction d'excrétion biliaire et de détoxification</i>	
II) Physiopathologie du foie	21
<i>II.A) La régénération du foie</i>	21
<i>II.B) Les pathologies du foie</i>	22
<i>α- Tumeurs hépatiques bénignes</i>	22
<i>β- Cancers primitifs du foie</i>	23
• Carcinome hépatocellulaire	23
1- Définition	
2- Epidémiologie	
3- Diagnostic	
4- Pronostic	
5- Traitements conventionnels	
6- Traitements alternatifs	
• Carcinome fibrolamellaire	28
• Hépatoblastome	29
• Angiosarcome hépatique	29
<i>γ- Cancer secondaire du foie</i>	29
III) Calcium, canaux et physiologie	29

<i>III.A) Le signal calcique</i>	30
<i>III.B) Les acteurs du signal calcique</i>	32
<i>α- Les acteurs réticulaires</i>	32
• Les SERCA	33
• Le IP3R	33
• Le RyR	34
• Les canaux de fuites	35
<i>β- Les acteurs de la membrane plasmique</i>	35
• Les PMCA	35
• L'échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺	36
<i>γ- Les acteurs cytoplasmiques</i>	36
<i>III.C) Les voies de transduction</i>	36
<i>α- L'entrée capacitive ou SOCE ou CCE</i>	37
<i>β- L'entrée non capacitive ou NCCE</i>	39
<i>III.D) La superfamille des canaux calciques TRP</i>	40
<i>α- La famille des TRP</i>	40
<i>β- La structure des TRP</i>	42
<i>γ- Les TRPC</i>	43
<i>III.E) Le canal TRPC6</i>	45
<i>α- trpc6 et hTRPC6</i>	45
<i>β- TRPC6 dans les tissus sains</i>	47
<i>γ- Propriétés du canal TRPC6</i>	47
<i>δ- Régulation du canal TRPC6</i>	48
<i>III.F) Les STIM et les Orai</i>	50
<i>α- La structure des STIM</i>	51
<i>β- La structure des Orai</i>	52
<i>γ- Les STIM et les Orai dans le SOC</i>	53
<i>δ- Les STIM et les Orai dans la physiopathologie</i>	55
<i>III.G) Interactions entre STIM1, Orai1 et certains TRPC</i> ..	55
<i>III.H) STIM, Orai et TRPC6 dans le cancer</i>	56
<i>III.I) Les inhibiteurs du SOC et leur intérêt dans le cancer</i> .	57

***Problématique et objectifs*** 60

***Matériels et méthodes*** 63

I) La culture cellulaire

 64

<i>I.A) Lignée d'hépatomes humains : Huh-7</i>	64
<i>I.B) Lignée HEK293</i>	64
<i>I.C) Conditions de culture des lignées cellulaires</i>	65
<i>I.D) Cellules primaires d'hépatocytes humains sains</i>	66

II) La transfection	67
<i>II.A) Transfection transitoire des siRNA par lipofection</i>	<i>67</i>
<i>II.B) Transfection transitoire de hTRPC6 par nucleofection .</i>	<i>68</i>
<i>II.C) Création de lignées stables</i>	<i>68</i>
III) La microscopie à lumière transmise	69
IV) L'imagerie calcique	69
<i>IV.A) Mode opératoire</i>	<i>69</i>
<i>IV.B) Sonde calcique Fura2</i>	<i>70</i>
<i>IV.C) Acquisition et traitement d'images</i>	<i>70</i>
V) La microscopie confocale	71
VI) Le patch-clamp	73
VII) L'immunodétection	75
<i>VII.A) Extractions des protéines totales</i>	<i>75</i>
<i>VII.B) Western-Blot</i>	<i>75</i>
<i>VII.C) Immunofluorescence indirecte</i>	<i>77</i>
VIII) Mesure de viabilité cellulaire	77
<i>VIII.A) Test de viabilité : coloration au bleu de trypan</i>	<i>77</i>
<i>α-Le principe</i>	<i>77</i>
<i>β-Le protocole</i>	<i>77</i>
<i>VIII.B) Test de viabilité : MTS</i>	<i>78</i>
IX) La cytométrie de flux	78
<i>IX.A) Le principe</i>	<i>78</i>
<i>IX.B) Le protocole</i>	<i>79</i>
X) Analyse des données	80
<i>Résultats</i>	<i>80</i>

I) Article 1	81
Résultats supplémentaires 1	94
II) Article 2	100
Résultats supplémentaires 2	119
<i>Discussion et perspectives</i>	123
TRPC et CCE	124
TRPC6 et CCE	125
TRPC et prolifération	126
TRPC6 et prolifération	128
TRPC, STIM1, Orai1 et CCE dans le foie sain et tumoral	128
STIM1, STIM2, Orai1 et CCE	131
STIM1, STIM2, Orai1 et prolifération	131
Calcium, cycline-cdk et prolifération	135
Localisation du signal calcique au niveau des microdomaines lipidiques	136
TRPC6 dans une future thérapie génique	138
<i>Conclusion générale</i>	141
<i>Publication (s) et communications personnelles</i>	143
<i>Bibliographie</i>	145

Glossaire et abréviations

2-APB	: 2-AminoethylDiPhenyl Borate
48h - SVF	: Privation de SVF pendant 48 heures
4h + SVF	: Privation de SVF pendant 48 heures suivit d'une remise en SVF pendant 4 heures
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ARN	: Acide RiboNucléique
ARN_m	: Acide RiboNucléique messager
BAPTA	: (1.2-Bis(2-AminoPhenoxy)ethane N,N,N',N'Tetraacetic Acid)
Ca²⁺	: Calcium
[Ca²⁺]_i	: Concentration intracellulaire en ion Ca ²⁺
CAI	: Carboxy Amido-trIazole
CCE	: Capacitative Calcium Entry
CDK	: Cyclin Dependant Kinase
cDNA	: Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
CO₂	: Dioxyde de Carbone
CRAC	: Calcium Release Activated Channel
Ct	: Carboxy terminal
CTRL	: Condition contrôle
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	: Ethylène Diamine TétraAcétique
EGF	: Epidermal Growth Factor
EGTA	: Ethylène Glycol bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetic Acid
FFA	: FluFenamic Acid
Fura2/AM	: (1-[2-(5-carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzoFURAn-5-oxyl-2-(2'-Amino-5'-Methyl-phenoxy)]-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid, penta acetoxymethyl ester]
GFP	: Green Fluorescent Protein
HBV	: Hepatitis B virus
HCV	: Hepatitis C virus
HEK293	: Human Embryonic Kidney293
HEKm3	: Human Embryonic Kidney muscarinic receptor M3
HEPES	: (N-[2-HydroxyEthyl] Piperazine-N-[2-Ethane Sulfonic acid])
HGF	: Hepatocyte Growth Factor
Huh-7	: Human Hepatocarcinoma 7
hTRPC6	: human TRPC6
IP₃R	: IP ₃ Receptor
kDa	: kiloDalton
La³⁺	: Lanthane
mTRPC6	: mouse TRPC6
NCX	: Natrium-Calcium Exchanger
NFAT	: Nuclear Factor of Activated T-cell
Nt	: Amino terminal
OAG	: 1-Oleoyl-2-Acetyl-sn-Glycerol
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
qPCR	: PCR en temps réel

PIP2	: Phosphatidyl Inositol-4,5-bisPhosphate
PKC	: Protéine Kinase C
PLC	: Phospholipase C
PMCA	: Plasma Membrane Ca ²⁺ ATPase
RE	: Reticulum Endoplasmique
RIPA	: Radio ImmunoPrecipitation Assay Buffer
ROC	: Receptor-Operated Channel
RYR	: Ryanodine Receptor
SDS-PAGE	: SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SERCA	: Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPase
shRNA	: short hairpined ARN
siRNA	: small interfering ARN
SOC	: Store-Operated Channel
SOCE	: Store-Operated Calcium Entry
SVF	: Sérum de Veau Foetal
TG	: ThapsiGargine
TGF-alpha	: Transforming Growth Factor alpha
TRP	: Transient Receptor Potential
TRPA	: TRPAnkyrine
TRPC	: TRPCanonical
TRPM	: TRPMelastatin
TRPML	: TRPMucolipins
TRPN	: TRPNO mechanotransducer potential C
TRPP	: TRPPolycystin
TRPV	: TRPVanilloid

Introduction

I) Physiologie du foie

I.A) Anatomie générale du foie

Le foie est un organe thoraco-abdominal impair et asymétrique, logé chez l'homme dans l'hypochondre droit. C'est le plus volumineux des viscères humains (2 % du poids corporel, soit une moyenne de 1,5 kg pour un individu de 75 kg) (Fig. 1). La majeure partie de cet organe est logée sous la coupole diaphragmatique droite qui le sépare du poumon droit et d'une partie du coeur. Il surplombe la partie droite des viscères abdominaux auxquels il est relié d'une part par les vaisseaux sanguins et d'autre part par les voies biliaires. Le foie est entouré par une capsule conjonctive (la capsule de Glisson) qui s'invagine dans le parenchyme hépatique permettant de déterminer des lobes.

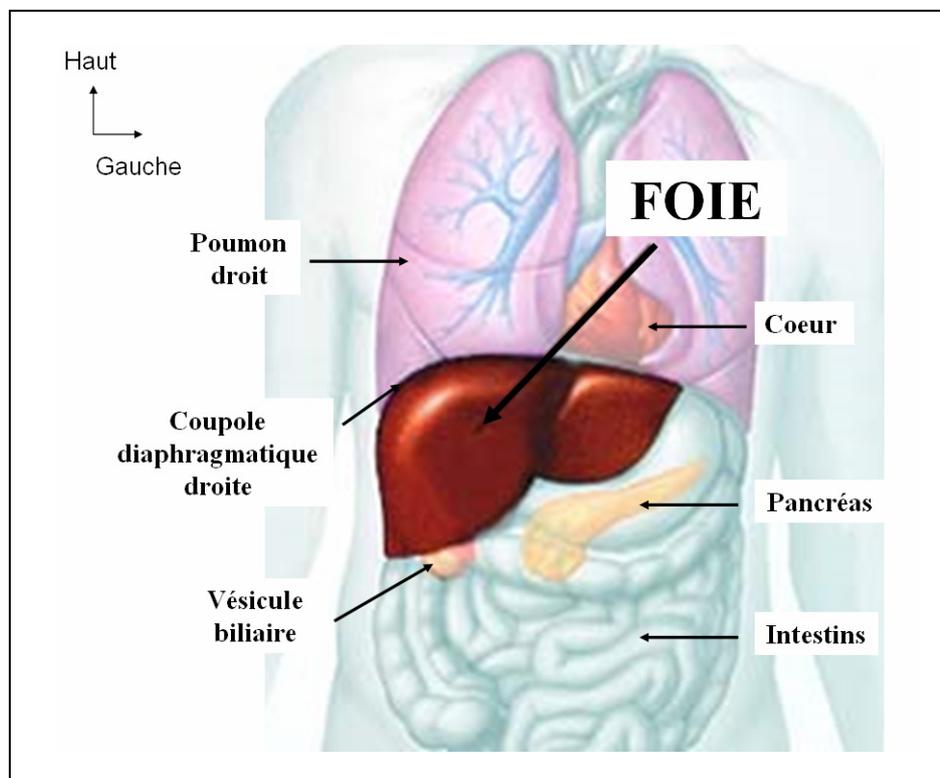


Fig. 1 : Schéma du système digestif humain vu de face.

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2e/Liver_1.jpg).

Selon la segmentation hépatique de Couinaud (Fig. 2), basée sur la division de la veine porte et du pédicule hépatique (artère hépatique et voie biliaire), le foie est divisé en huit segments numérotés de I à VIII [Dawson and Tan, 1992]. Selon la division anatomique (Fig.

2&3), le foie est composé d'un lobe gauche (1/3 du volume: segments I, II et III) et d'un lobe droit (2/3 du volume : segments IV, V, VI, VII et VIII) séparés par le ligament falciforme.

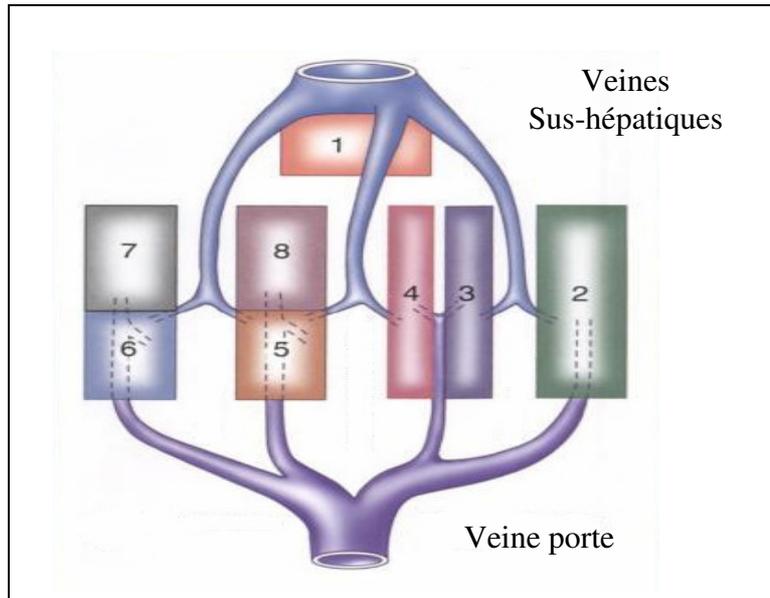


Fig. 2 : Représentation schématique de la segmentation du foie selon Couinaud (modifiée à partir de : *Chirurgie du foie et de l'hypertension portale*, éditions Masson).

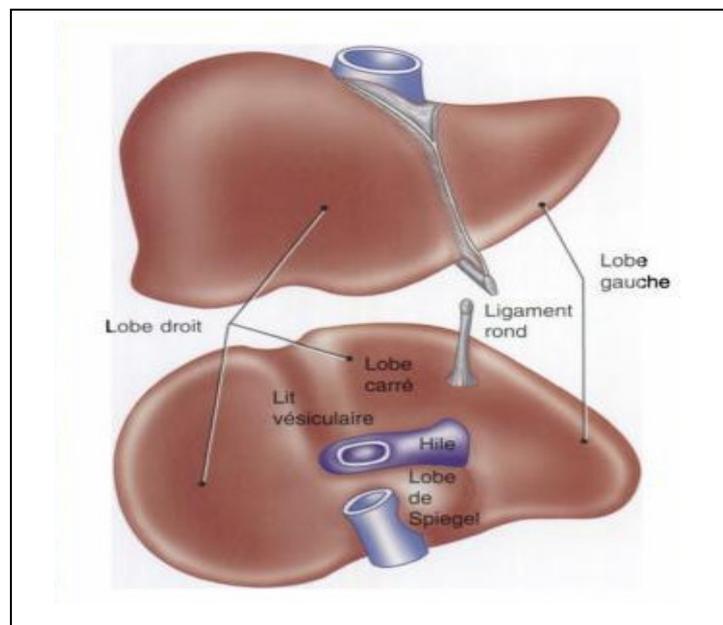


Fig. 3 : Morphologie du foie.

Sur la face antérieure : le lobe gauche et le lobe droit séparés par le ligament falciforme. Sur la face inférieure : le lobe droit est divisé par le hile et par la fossette du lit. (*Chirurgie du foie et de l'hypertension portale*, éditions Masson).

I.B) Vascularisation du foie

Le foie possède une double vascularisation : d'une part l'artère hépatique (branche de l'aorte) fournit le sang oxygéné à cet organe et d'autre part la veine porte ramène le sang du tube digestif riche en nutriments en période post-prandiale. Le sang de ces deux vaisseaux se mélange dans les sinusoides hépatiques qui cheminent entre les travées d'hépatocytes pour se réunir dans la veine centrolobulaire. Le retour veineux du foie s'effectue par les veines sus-hépatiques qui se jettent dans la veine cave inférieure (Fig. 4). De par sa vascularisation abondante, le foie est un organe non innervé et donc insensible à la douleur. Néanmoins, une douleur au niveau du foie peut être due à la capsule de Glisson (entourant le foie) car cette dernière est innervée et sujette à des phénomènes inflammatoires.

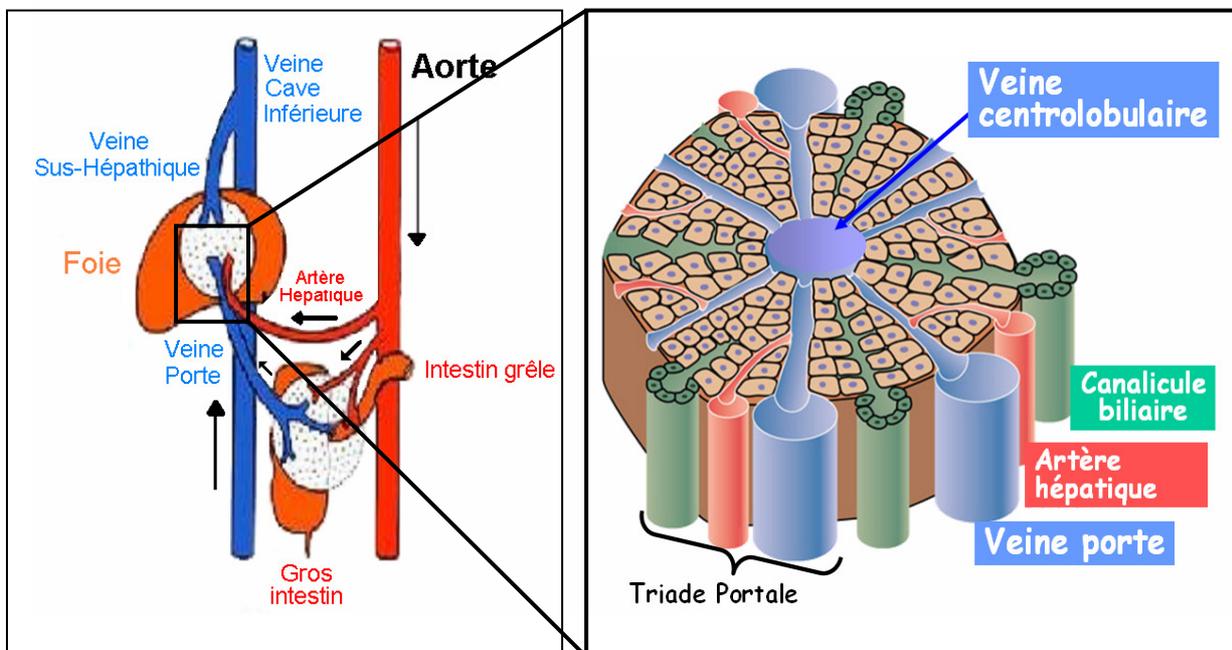


Fig. 4 : Vascularisation du foie

A gauche : schéma de la vascularisation générale du foie comportant en rouge le système artériel et en bleu le système veineux. A droite : les vaisseaux se mélangent dans les travées hépatocytaires et se jettent dans la veine centrolobulaire.

I.C) Voies biliaires intra et extra-hépatiques

Les hépatocytes sécrètent la bile (plus de détails voir partie I.G) dans les canalicules biliaires (Fig. 4) qui confluent et forment les canaux hépatiques droit et gauche dont la réunion forme le canal hépatique commun qui quitte le foie au niveau du hile hépatique. Le canal

cystique, issu de la vésicule biliaire, se jette dans le canal hépatique commun qui devient le cholédoque, lequel s'abouche dans le duodénum (Fig. 5).

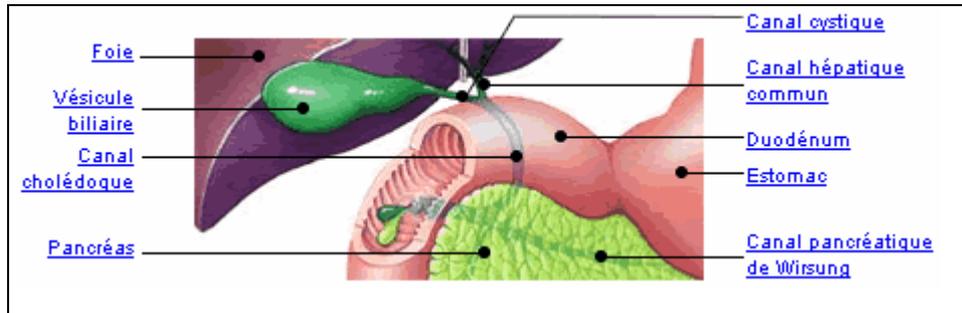


Fig. 5 : Voies biliaires extra-hépatiques.

(<http://www.doctissimo.fr/html/sante/atlas/fiches-corps-humain/pancreas-voie-biliaire.htm>).

I.D) Embryologie du foie

Le foie se développe à partir de l'anneau hépato-pancréatique. Au cours du premier mois de la vie embryonnaire, l'anneau hépato-pancréatique se présente sous forme d'une évagination entoblastique correspondant au futur duodénum et comportant une ébauche ventrale à l'origine du foie, une ébauche dorsale et deux ébauches latérales qui donneront le pancréas. Durant cette phase précoce du développement l'alpha-fœtoprotéine, appelée également fœtuine, est exprimée dans les hépatoblastes (hépatocytes non encore différenciés) et disparaît deux semaines après la naissance [Shiojiri *et al.*, 1991]. Son expression étant limitée à la phase de développement foetal, cette protéine est utilisée comme indicateur de la différenciation des hépatocytes. Toutefois, l'expression de l'alpha-fœtoprotéine augmente également lors de certains cancers du foie suite à la dédifférenciation des hépatocytes. De ce fait, le dosage de cette protéine représente un intérêt majeur en cancérologie et plus précisément son expression peut être un bon reflet de l'efficacité d'un traitement anticancéreux.

I.E) Structure du foie

Le parenchyme hépatique (Fig. 6) est constitué d'unités microscopiques, les lobules hépatiques, de forme hexagonale en coupe. Il comporte trois types d'éléments : les travées de Remak, les capillaires sinusoides (ou capillaires radiés) et les canalicules biliaires. Au milieu de chaque lobule se trouve la veine centrolobulaire. Ce parenchyme est parsemé d'espaces conjonctifs, également appelés espaces de Kiernan ou espaces portes. Chaque espace conjonctif

regroupe une branche de l'artère hépatique, une branche de la veine porte et un canal biliaire (UCLB - N. Vacheret).

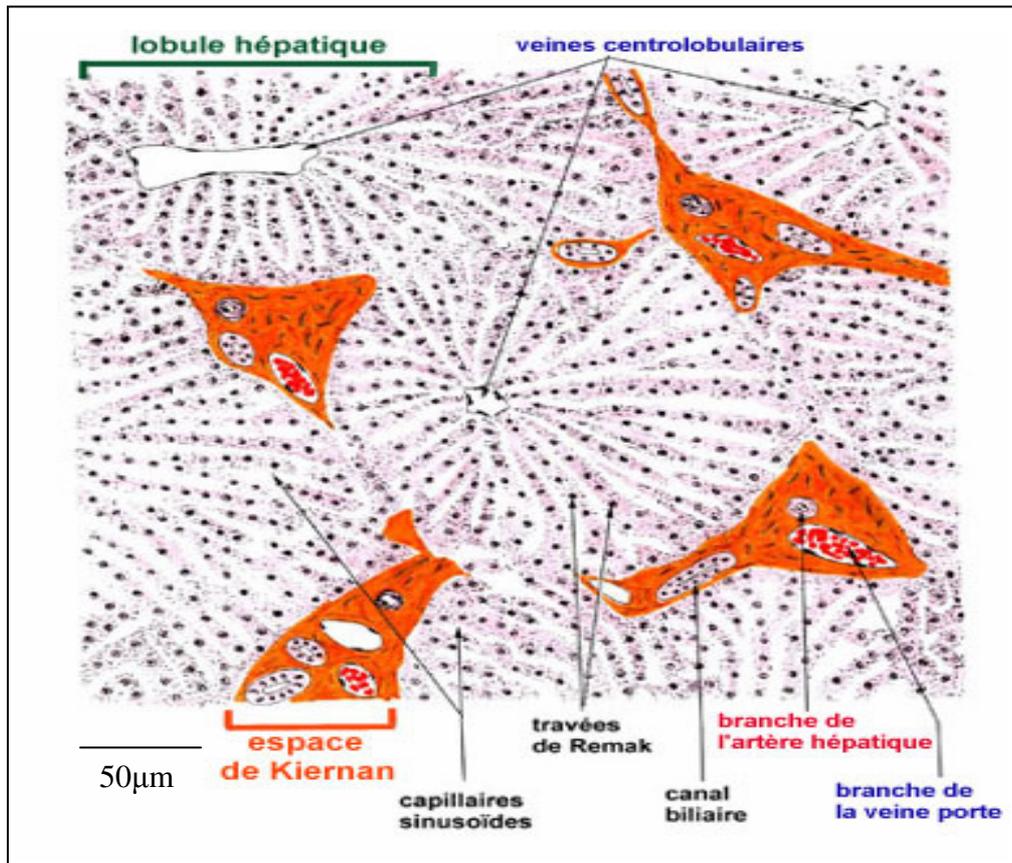


Fig. 6 : Schéma représentant une coupe du parenchyme hépatique montrant les principaux éléments structuraux.

(N. Vacheret, UCBL).

I.F) Cellules du foie

Le foie est constitué majoritairement de cellules hépatiques ou hépatocytes (plus de 80 % des cellules totales) organisées en travées (travées de Remak) autour des capillaires sinusoides. Ce sont des cellules polygonales de grande taille au noyau central (parfois binucléées), rond, volumineux et au cytoplasme éosinophile granuleux. Néanmoins, il existe d'autres types cellulaires dans le foie : cellules des canaux biliaires, cellules endothéliales, cellules de Küpffer (possédant une fonction macrophage), cellules de Ito ou cellules hépatiques stellaires (impliquées dans le métabolisme de la vitamine A et la synthèse de la matrice extracellulaire) (Fig. 7). Enfin, il existe dans le foie des cellules souches qui ont pour fonction physiologique essentielle le renouvellement des cellules différenciées parvenues au terme de leur durée de vie normale. Leur existence est définitivement établie dans cet organe et leur origine peut être intra-

hépatique (cellules souches résiduelles appelées également cellules ovales [Sell *et al.*, 1981] chez les rongeurs, cellules ductulaires ou cholangiolaires chez l'homme) ou extra-hépatique (d'origine médullaire [Jeffery *et al.*, 2009] ou ombilicale [Teramoto *et al.*, 2005]). Les cellules souches permettent également, après une agression, la régénération du tissu lésé. Ces cellules expriment différents marqueurs comme la cytokératine 14, la protéine c-kit, l'alphafoetoprotéine et la protéine OV-6.

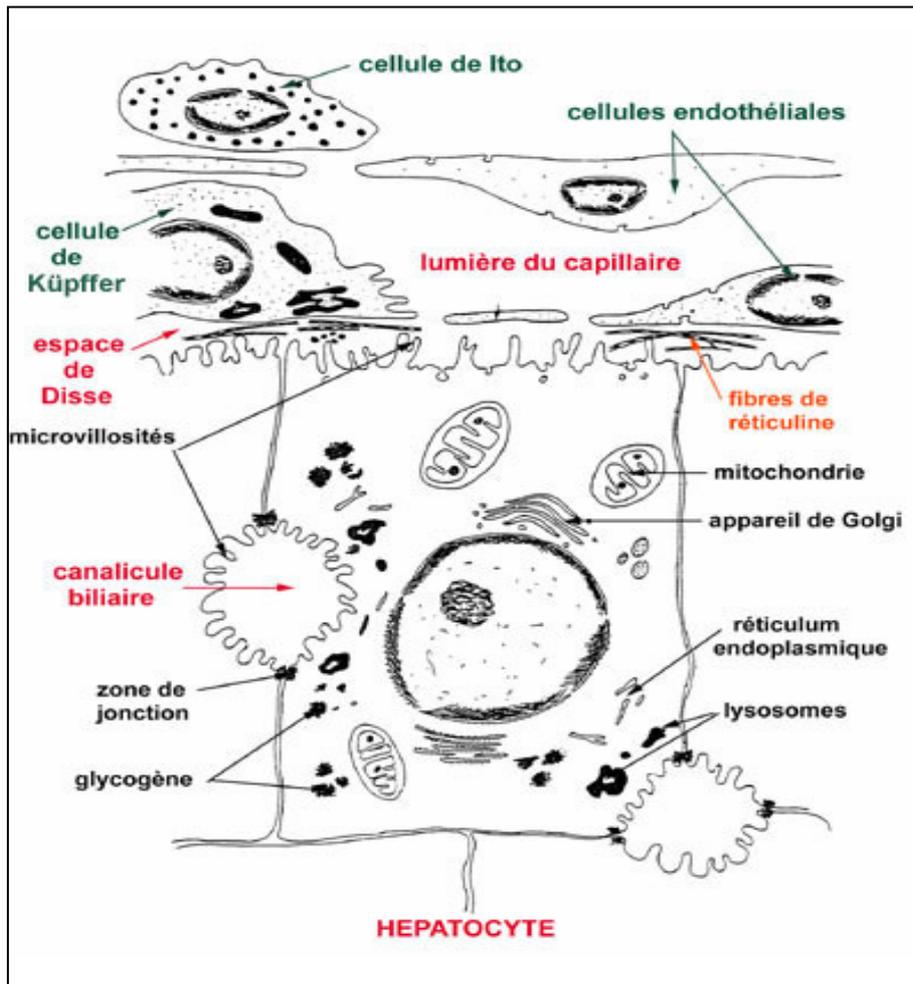


Fig. 7 : Ultrastructure du parenchyme hépatique.

(N. Vacheret, UCBL).

I.G) Fonctions du foie

Les multiples fonctions du foie lui octroient une position centrale au sein de l'organisme vivant. Ces différentes fonctions peuvent être classées globalement en quatre groupes :

Fonction de réservoir sanguin : le foie reçoit environ 500 ml de sang par minute et peut contenir en permanence 450 ml de sang soit 10 % du volume sanguin total. Cette capacité peut atteindre 1,5 litres en cas d'insuffisance cardiaque.

Fonction immunitaire : cette fonction essentielle à la survie des hépatocytes est majoritairement assurée par les cellules de Küpffer.

Fonction métabolique : cette fonction inclut plusieurs éléments. Tout d'abord, la régulation de la glycémie qui s'effectue à deux niveaux : d'une part par la dégradation de certaines hormones telles que l'insuline et d'autre part par le biais du métabolisme glucidique (la glycogénolyse, la glycogénogenèse et la néoglucogenèse). Le métabolisme lipidique, quant à lui, est impliqué dans les réactions d'oxydation des acides gras (production d'énergie), la synthèse des triglycérides, la synthèse de cholestérol et ses dérivés (hormones stéroïdes, ...) et la transformation du glucose et des protéines en graisse permettant leur stockage dans les adipocytes. Il existe également d'autres fonctions métaboliques impliquant les protéines et en particulier la synthèse de presque 90 % des protéines plasmatiques (albumine, ...). De plus, le foie, dans le cadre de sa fonction métabolique, intervient dans des fonctions telles que le stockage des vitamines (vitamines A, B12, D, E et K) et du fer (suite à la destruction des hématies vieilles). Enfin, cet organe intervient également dans la synthèse de certains facteurs de coagulation I (fibrinogène), II (prothrombine), V, VII, IX, X et XI ...

Fonction d'excrétion biliaire et de détoxification : le foie produit et stocke la bile dans la vésicule biliaire en attendant son évacuation dans le tube digestif. Il sécrète 600 à 1200 ml de bile par jour. Cette dernière possède un double rôle d'une part, l'émulsification des lipides facilitant ainsi leur digestion et d'autre part, l'élimination de certains produits toxiques à l'organisme. Le foie peut être comparé à une station d'épuration chez un être vivant et les hépatocytes représenteraient le filtre de cette station. Ces derniers filtrent le sang et éliminent les déchets non solubles dans l'eau. Cette fonction permettrait alors l'élimination de substances toxiques telles que l'alcool, différentes drogues (médicaments, ...) ainsi que les molécules issues de la dégradation de certains produits du métabolisme lipidique (cholestérol, ...). Il détruit également les leucocytes et les hématies en fin de vie mais aussi de nombreux agents pathogènes (radicaux libres, bactéries, virus, champignons, parasites...). Ces deux fonctions sont intimement liées et permettent l'élimination de toutes ces substances en les sécrétant dans la bile.

II) Physiopathologie du foie

II.A) La régénération du foie

Bien que le foie adulte soit un organe quiescent, il possède néanmoins une capacité unique lui permettant de réguler sa croissance et sa masse. Les hépatocytes sains possèdent une longue durée de vie et une prolifération très faible. Par exemple, chez le rat moins de 1 hépatocyte sur 10 000 se divise et cette caractéristique est accompagnée par une apoptose négligeable. Toutefois, ces cellules sont capables de reprendre leur prolifération suite à une agression par des agents toxiques ou des virus voire même après une hépatectomie partielle [Bucher, 1963 ; Michalopoulos and DeFrances, 1997 ; Fausto, 2000]. L'hépatectomie partielle standard consiste en une ablation des deux tiers du foie induisant une régénération de la totalité de la masse hépatique après quatre à six semaines. Cette régénération est sous l'influence de différents facteurs de croissance tels que l'EGF [Mullhaupt *et al.*, 1994], l'HGF et le TGF-alpha [Fausto *et al.*, 1995 ; Michalopoulos and DeFrances, 1997]. Dans ces conditions, la croissance s'arrête une fois la taille initiale atteinte.

II.B) Les pathologies

Les différentes maladies les moins fréquentes (< 1 %) qui peuvent se développer au niveau du foie sont : la cirrhose hépatique (liée à la mise en place d'une fibrose dans le tissu hépatique ce qui gêne la fonction hépatique), la cirrhose biliaire primitive (maladie auto-immune chronique des voies biliaires), l'hépatite alcoolique aiguë (affection sévère du foie liée à la toxicité indirecte de l'alcool qui entraîne une mort cellulaire brutale et plus ou moins étendue), les hépatites virales (regroupent les infections provoquées par des virus se développant aux dépens du tissu hépatique), l'hémochromatose (maladie autosomique récessive se caractérisant par une surcharge de fer dans l'organisme), la maladie de Wilson (maladie génétique secondaire à une accumulation de cuivre dans l'organisme), la stéatose hépatique (augmentation du taux des triglycérides dans le foie : foie gras), le syndrome de Budd-Chiari (dû à l'obstruction de la veine hépatique) et la maladie de Gilbert (due à une anomalie génétique du métabolisme de la bilirubine).

Les maladies les plus fréquentes sont :

α- Tumeurs hépatiques bénignes

L'angiome, également appelé hémangiome, est une tumeur bénigne (non cancéreuse) des cellules qui tapissent les vaisseaux sanguins. C'est la tumeur hépatique bénigne la plus fréquente au niveau du foie (1 à 2 %). Elle survient sur un foie sain et elle est généralement sans complication.

L'adénome solitaire du foie est une tumeur bénigne du foie dont le diamètre peut aller de 1 à 20 cm. C'est une tumeur rare qui survient généralement chez les femmes entre 20 et 40 ans. Elle est due à un traitement contraceptif fortement dosé en œstrogènes.

L'hyperplasie nodulaire focale est une tumeur bénigne rare du foie dont la taille varie de 1 à 10 cm. Elle est peut être associée à des adénomes mais ne se complique jamais.

β- Cancers primitifs du foie:

- Carcinome hépatocellulaire

1- Définition

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) ou hépatocarcinome (Fig. 8) est le cancer primitif majoritaire du foie. Ce dernier est dû soit à une prolifération maligne d'hépatocytes, soit à une résistance à l'apoptose soit aux deux à la fois. Les hépatocytes se transforment en hépatomes et perdent, au fur et à mesure, leur différenciation et par suite leur phénotype tumoral s'éloigne de plus en plus du phénotype sain et de leur architecture initiale. Cette perte phénotypique s'accompagne d'une perte de leurs multiples fonctions.

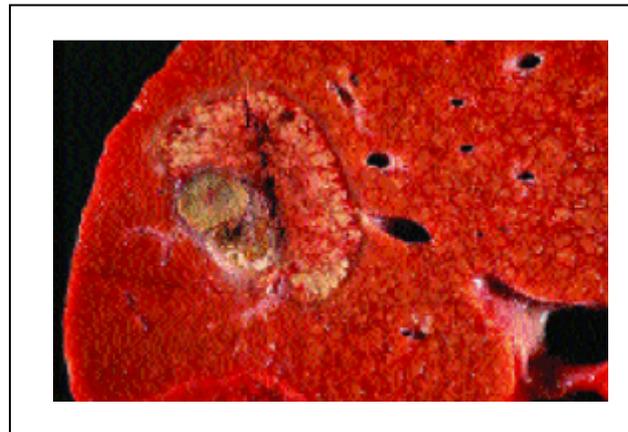


Fig. 8 : Image macroscopique d'une cirrhose compliquée d'un carcinome hépatocellulaire. (Modifiée à partir de : http://titan.medhyg.ch/mh/formation/art/Images/23418_1.gif).

2- Epidémiologie

Considéré comme le 8^{ème} cancer dans le monde par ordre de fréquence, le CHC est le plus fréquent des cancers primitifs du foie. Il survient presque toujours sur une maladie

hépatique préexistante, exceptionnellement sur un foie sain. De ce fait, le principal facteur de risque de ce cancer est la cirrhose hépatique représentant à elle seule 80-90 % des cas. Cette dernière peut survenir, dans au moins 60 % des cas, suite à l'évolution d'une maladie alcoolique ou infectieuse chronique telle que l'hépatite B ou C (HBV ou HCV).

En fonction des zones géographiques, les populations sont plus ou moins touchées par le CHC survenant à la suite de ces hépatites. Dans ces conditions, l'apparition du CHC est étroitement corrélée à la prévalence des virus de l'hépatite B ou C (Fig. 9). A titre indicatif, l'Afrique du Sud et l'Asie du Sud-Est présentent l'incidence la plus élevée d'infection par le HCV tandis qu'en région méditerranéenne ainsi qu'en Russie l'incidence est moyenne. Par contre, au sein de l'Europe du Nord, une partie de l'Amérique du Nord et du sud et l'Australie, cette incidence est très faible et le CHC se voit plutôt associé à la cirrhose d'origine alcoolique. Toutefois, en France plus de 5 000 décès par an sont dus aux CHC survenus suite à une hépatite virale. De plus, l'incidence du CHC, dans les pays développés et surtout durant ces vingt dernières années, n'a cessé d'augmenter en raison de l'augmentation de l'incidence de la cirrhose due au HBV et au HCV. Ce nombre va vraisemblablement augmenter, en France, de l'ordre de 150 % chez les hommes et de 200 % chez les femmes d'ici 2020, dû au nombre croissant de personnes contaminées par le HCV [Deuffic *et al.*, 1999].

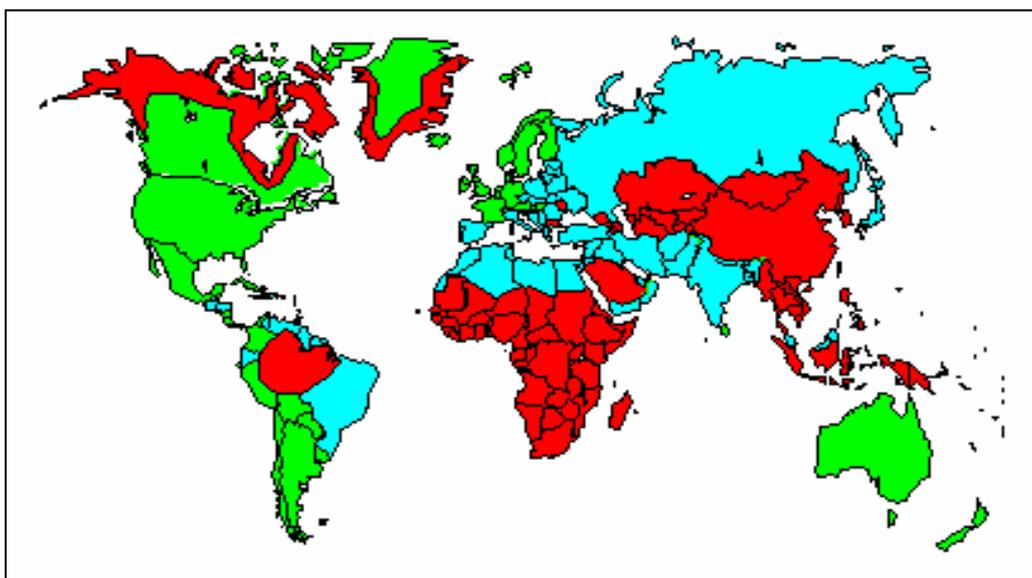


Fig. 9 : Prévalence de l'hépatite C en fonction des zones géographiques.

En rouge : prévalence élevée (supérieure à 8 %)

En cyan : prévalence intermédiaire (2 à 8 %)

En vert : prévalence faible (moins de 2 %)

(Modifiée à partir de :

http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2005-mai/DESC-mai-2005-Bronowicki.pdf).

3- Diagnostic

Lors de la présence d'un CHC, le bilan hépatique montre l'apparition ou l'aggravation de la cholestase (obstruction empêchant l'évacuation de la bile) et le taux de l'alpha-fœtoprotéine sérique (normalement absente du sang chez l'adulte) devient très élevé pouvant atteindre les 500 ng/ml. Toutefois, pour des nodules de petite taille, l'alpha-fœtoprotéine sérique reste non détectable dans 50 % des cas d'où la nécessité d'examen complémentaires tels que l'imagerie médicale (Ecographie, Tomodensitométrie, Artériographie lipiodolée, Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire...) permettant la détection de nodules hypervascularisés et de taille supérieure à 2 cm (Fig. 10).

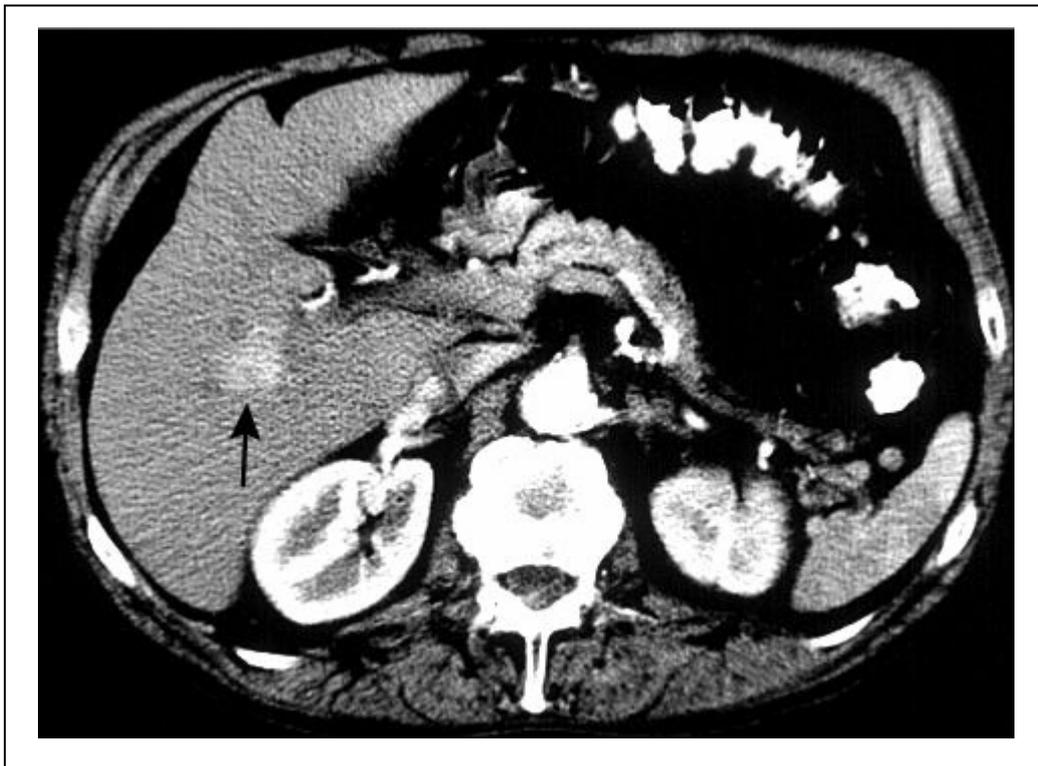


Fig. 10 : Carcinome hépatocellulaire développé suite à une cirrhose virale.

Image tomodensitométrie obtenue à la phase précoce après injection de produit de contraste, il existe un nodule hypervasculaire (flèche) correspondant à un carcinome hépatocellulaire.

(http://www.jle.com/en/revues/medecine/bdc/e-docs/00/04/10/38/texte_alt_jlebd00099_gr3a.jpg).

4- Pronostic

Le CHC, habituellement découvert à un stade très tardif, est généralement corrélé à un pronostic défavorable puisque la médiane de survie est de quelques mois. De plus, pratiquement tous les patients sont porteurs d'une cirrhose. Alors dans ces conditions, la tumeur présente un aspect diffus couplé ou non à une masse volumineuse importante voire à une extension vasculaire tout particulièrement portale excluant tout traitement à visée curative.

Notons toutefois que le pronostic du CHC est meilleur dans un très petit groupe de patients atteints de cirrhose, correspondant à la classe A du score de Child-Pughet (Score permettant l'appréciation de la gravité d'une cirrhose, la classe A représente l'état cirrhotique le moins grave). Ces patients présentent alors une tumeur inférieure ou égale à 3 cm sans extension vasculaire ni de métastase. 50 % de ces patients peuvent espérer une survie allant jusqu'à 3 ans et moins de 10 % appartenant à ce groupe sont potentiellement curables.

5- Traitements conventionnels

Il existe de nombreuses méthodes thérapeutiques, hélas souvent inefficaces, dont les principales sont les suivantes :

La radiothérapie n'est envisageable que si elle permet de préserver une partie suffisante de l'organe sain en évitant au maximum l'irradiation des poumons. Pour cela, cette technique est désormais combinée à l'application de l'apnée en inspiration profonde sous contrôle spirométrique, initialement développée dans le cadre des irradiations pulmonaires. Toutefois, cette voie présente pratiquement une efficacité limitée.

La résection chirurgicale reste généralement déconseillée car elle présente un haut risque de récurrence.

L'alcoolisation percutanée des tumeurs du foie peut être réalisée en cas de petite tumeur (inférieure à 5 cm) chez un patient avec contre-indication chirurgicale. Le principe passe par des injections répétées d'alcool 95° directement dans la tumeur provoquant ainsi la nécrose des cellules cancéreuses et permettant au patient de bénéficier d'une durée de vie prolongée.

La seule méthode thérapeutique à potentiel curatif est la transplantation hépatique. Comme déjà décrit, le plus souvent un foie endommagé se régénère spontanément. Dans le cas contraire, le foie peut être remplacé chirurgicalement. La première transplantation hépatique dans le monde fut effectuée en 1963 par l'équipe du docteur Thomas Starzl aux Etats-Unis à Denver dans le Colorado [Starzl *et al.*, 1963]. A l'origine, le foie destiné à la transplantation provenait d'un cadavre mais malheureusement, l'offre de l'allogreffe de foie de donneurs non

vivants est très faible par rapport au nombre de bénéficiaires potentiels. Cette réalité a favorisé, à partir de 1986, le développement du principe des donneurs vivants pour la transplantation hépatique. Dans ce dernier cas, le donneur vivant se voit retirer une partie de son foie qui sera transplantée chez le malade appelé receveur [Kremer *et al.*, 1994] (Fig. 11). Chaque moitié du foie se régénère en un foie complet. Cette technique présente un double avantage pour les patients aussi bien pour le traitement du CHC et/ou de la cirrhose hépatique. Le pronostic est assez bon et même s'il n'existe pas de modèle précis pour prédire les taux de survie, ceux qui ont subi une transplantation présentent 58 % de chance de survie. Toutefois, pour obtenir de meilleurs résultats dans le cadre du CHC, elle doit s'adresser à des patients à tumeur unique, petite, de moins de 5 cm de diamètre ou bien 2 à 3 petites tumeurs de moins de 3 cm. Dans ces conditions, la survie serait bien meilleure (75 % à 4 ans). Même avec le principe des donneurs vivants, cette intervention ne s'adresse qu'à peu d'élus et cela pour diverses raisons : le faible nombre de candidats potentiels (la détection du CHC est tardive), la pénurie de greffons et le coût de cette méthode [Boudjema *et al.*, 2005].

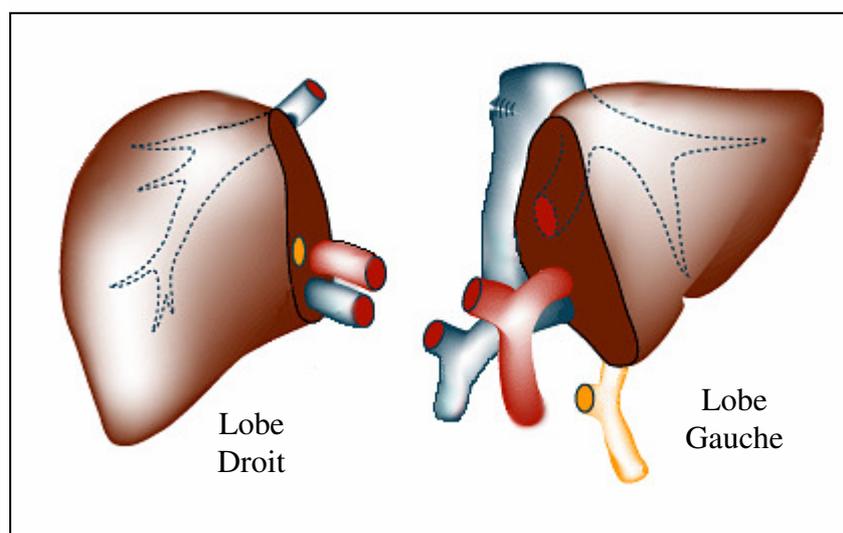


Fig. 11 : Schéma d'une transplantation à partir du foie d'un donneur vivant.

Le lobe gauche et sa vascularisation restent pour le donneur.

Le lobe droit et sa vascularisation seront implantés chez le receveur.

(Modifié à partir de : <http://www.hivandhepatitis.com/images2007/liverfinal31.gif>).

6- Traitements alternatifs

Lorsqu'un carcinome hépatocellulaire est détecté, peu d'options thérapeutiques sont envisageables. Comme décrit précédemment, la transplantation hépatique, l'ablation

percutanée et l'ablation par radiothérapie sont considérées comme des options thérapeutiques curatives. Néanmoins, la transplantation hépatique, bien qu'elle donne les meilleurs résultats, reste difficilement applicable pour les raisons déjà décrites. Quant à l'alcoolisation percutanée, elle provoque une nécrose qui s'étend au niveau des tissus sains. La radiothérapie de son côté a longtemps été écartée vu la résistance que présentait le CHC à cette technique. Aujourd'hui la radiothérapie de conformation (RTC) commence à émerger. Celle-ci permet une irradiation de la tumeur avec des doses très élevées en épargnant le parenchyme hépatique tumoral mais cette technique reste en essais et nécessite une évolution complémentaire.

Une autre voie envisageable est la chimiothérapie qui reste peu efficace et modérément tolérée étant donné que la quasi totalité des CHC surviennent sur un foie cirrhotique dont sa fonction de détoxification est déjà altérée. Elle était représentée jusqu'à récemment par la doxorubicine et le cisplatine. Ces molécules ne présentaient qu'un très faible taux de réponse, inférieur à 20 %. Des dérivés du 5-Fluoro-Uracile (gemcitabine, irinotécan, oxaliplatine, ...) ont été utilisés en essais cliniques mais aucune amélioration significative a pu être notée, même s'ils étaient administrés avec d'autres substances dans le cadre des polychimiothérapies. Plus récemment, la chimiothérapie s'est tournée vers la pratique des thérapies ciblées. Globalement, elle est basée sur l'utilisation des inhibiteurs pouvant cibler de façon plus ou moins spécifique certaines protéines cellulaires, comme par exemple le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor), qui sont des protéines possédant des domaines tyrosine kinase (imatinib ou gleevec, erlotinib ou tarceva, sorafenib ou nexavar, ...). Cette méthodologie, efficace dans le cadre des tumeurs digestives et du cancer du rein s'avère peu efficace dans le cadre du CHC, en raison d'un échappement thérapeutique. L'hormonothérapie par le Tamoxifène, un antioestrogénique utilisé dans le cadre du cancer du sein, reste elle aussi controversée dans son efficacité réelle.

De ce fait de nouvelles cibles thérapeutiques sont à mettre en évidence dans le cadre du carcinome hépatocellulaire. Ces dernières doivent être d'une part, spécifiques d'une protéine impliquée dans les phénomènes de prolifération ou d'apoptose des cellules tumorales et d'autre part, spécifiques des cellules tumorales avec le moins d'effets secondaires possible, voire idéalement aucun, sur les cellules saines.

Enfin, de nouvelles stratégies commencent à émerger pour agir, *in vivo*, sur ces nouvelles cibles par exemple, les techniques de lipofection par des nano-particules ou des lipoplexes.

- Carcinome fibrolamellaire

Autre que le carcinome hépatocellulaire, le carcinome fibrolamellaire est un cancer primitif du foie. C'est un cancer rare possédant la particularité de se développer sur un foie sain non cirrhotique et atteint plutôt les gens jeunes de moins de 40 ans. Le dosage de l'alpha-foetoprotéine est normal et la tumeur est composée de cellules hépatocytaires séparées par des travées fibreuses. Cette tumeur est à croissance lente et métastase rarement. Son pronostic est meilleur que celui du CHC même si sa taille peut aller jusqu'à 10 voire 20 cm.

- Hépatoblastome

L'hépatoblastome est le cancer primitif le plus fréquent chez l'enfant de moins de 3 ans. Ce cancer est marqué par une forte prédominance masculine, avec un sex-ratio de 2. Il est en général reconnu suite à une importante hépatomégalie (augmentation du volume du foie), avec un taux élevé d'alpha-foetoprotéine. L'imagerie montre une tumeur solide avec présence de calcifications.

- Angiosarcome hépatique

Un angiosarcome a pour origine la prolifération anarchique de cellules endothéliales situées dans la paroi des vaisseaux. La survenue de ces tumeurs peut être facilitée par le contact avec certaines substances. Cette tumeur peut par exemple être favorisée par l'arsenic contenu dans les pesticides ou le chlorure de polyvinyle présent dans les matières plastiques.

γ- Cancers secondaires

Les cancers secondaires, à la différence des cancers primitifs, sont des métastases. Ces métastases secondaires hépatiques proviennent de carcinomes tels que le carcinome du colon, des bronches, du sein, de la prostate ou du rein. Mais également ils peuvent apparaître suite à des cancers endocrines tels que le cancer du pancréas ou des mélanomes, plus particulièrement les mélanomes choroïdiens.

III) Calcium, canaux et physiologie

Depuis plusieurs décennies, le calcium est reconnu comme constituant du corps humain. Il représente 1,5 % du poids corporel total (environ 1 kg pour un homme de 75 kg) [Baba *et al.*, 2006]. Il est concentré majoritairement dans les os, les ongles et les dents où il joue un rôle structural important (pour revues, [Berridge *et al.*, 1998] et [Berridge *et al.*, 2000]). Néanmoins,

sa localisation ne se limite pas aux organes déjà décrits. En effet, l'ion calcique (Ca^{2+}) est présent dans le milieu extracellulaire et les premières descriptions de l'importance du Ca^{2+} dans la physiologie cellulaire remontent aux travaux de Ringer (contraction cardiaque) [Ringer, 1882 ; Carafoli, 2002] et Locke (transmission neuro-musculaire) [Locke, 1894]. A la suite de ces travaux, beaucoup de données ont émergé démontrant la régulation, par le Ca^{2+} , de nombreux phénomènes physiologiques tels que la sécrétion, l'apoptose, l'excitation, la fécondation, la contraction, la régulation de la transcription génique et la prolifération cellulaire (pour revues : [Berridge *et al.*, 1998] et [Berridge *et al.*, 2000]).

III.A) *Le signal calcique*

Les différentes fonctions vitales, déjà présentées, sont dépendantes du calcium et plus précisément du gradient électrochimique calcique. Ce dernier, comme c'est le cas pour d'autres ions, est dû d'une part à la différence de la concentration des ions calciques (de part et d'autre de la membrane plasmique) et d'autre part à la charge électrique que portent ces ions. En effet, la concentration calcique cytosolique ($\sim 10^{-7}$ M) est 10 à 20 000 fois inférieure à la concentration calcique extracellulaire ($\sim 10^{-3}$ M). Ainsi, pour établir et maintenir ce gradient la cellule doit faire une dépense énergétique conséquente. Des organites intracellulaires participent également à la mise en place de ce gradient, par exemple le réticulum endoplasmique (RE) peut être assimilé à un réservoir contenant des ions calciques à une concentration presque identique au milieu extracellulaire [Hofer and Machen, 1993]. Les mitochondries, quant à elles, peuvent également stocker, de façon transitoire, les ions calciques avec une capacité totale plus faible que le réticulum endoplasmique mais une cinétique de recapture du calcium plus rapide [Carafoli, 2002 ; Bianchi *et al.*, 2004]. Enfin, le noyau et l'appareil de golgi peuvent également stocker, dans certaines conditions, le calcium [Berridge *et al.*, 2000 ; Rojas *et al.*, 2000]. Grâce au gradient de Ca^{2+} , faisant intervenir ces différents organites, les vertébrés peuvent assurer leurs différentes fonctions physiologiques dont l'une des principales est le renouvellement cellulaire.

Même si le calcium est à la base d'une grande quantité de fonctions physiologiques, son action envers chacune d'entre elles reste spécifique. En effet, le signal calcique peut être régulé à trois niveaux (l'espace, le temps et l'amplitude) conférant ainsi une réponse spécifique à chaque entrée calcique.

Premièrement, la localisation de cette entrée peut-être soit limitée à une petite région sous-membranaire de la cellule soit étendue à la globalité de la cellule. Cette différence spatiale peut engendrer des réponses physiologiques différentes, par exemple une entrée localisée peut-

être à l'origine de phénomènes sécrétoires (sécrétion de neurotransmetteurs) [Llinas *et al.*, 1992] et à l'inverse une vague calcique peut être à l'origine de contraction musculaire (contraction du muscle lisse du colon chez l'homme) [Kovac *et al.*, 2008].

Deuxièmement, les réponses physiologiques peuvent varier en fonction de la fréquence et du temps de l'entrée calcique. A titre indicatif, des signaux transitoires calciques, également appelés oscillations calciques, peuvent être à l'origine de la translocation de certains facteurs de transcription comme le NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) [Shuttleworth *et al.*, 2004], par contre, une entrée calcique soutenue peut jouer un rôle majeur dans la prolifération des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) et des cellules endothéliales humaines de l'artère pulmonaire [Abdullaev *et al.*, 2008] voire à l'inverse dans l'apoptose des cellules prostatiques cancéreuses [Vanoverberghe *et al.*, 2003].

Troisièmement, le signal calcique est une sommation d'événements calciques élémentaires. La somme de ces éléments est traduite par l'intensité ou l'amplitude du signal calcique. Cette propriété d'intensité est à l'origine du seuil d'activation des protéines effectrices dépendantes du calcium telle que la CAMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II). Cette protéine, senseur du calcium, possède une cinétique de type « ON-OFF » lui permettant de moduler son activité en fonction de la stimulation. En effet, en présence de la CaM (Ca²⁺-Calmoduline) le domaine catalytique de la CAMKII devient libre engendrant ainsi une série d'autophosphorylations, entre différentes CAMKII, suite à de brèves entrées calciques [Hudmon and Schulman, 2002] (Fig. 12). Ces autophosphorylations permettent l'activation pointue et en escalier de cette enzyme. De ce fait, ces protéines senseurs peuvent former un relais entre les variations calciques cytosoliques et certains effets physiologiques telle que, l'activation de la transcription de certains gènes [Dolmetsch *et al.*, 1997].

En plus de cet aspect tridimensionnel, des études ont démontré l'implication des microdomaines membranaires, qui sont des radeaux lipidiques (« lipid rafts ») majoritairement composés de stérols et de sphingolipides, dans la signalisation calcique induisant différents effets physiologiques (pour revue : [Isshiki and Anderson, 2003]).

Le calcium est donc impliqué dans de nombreux phénomènes physiologiques. De ce fait, divers acteurs et différentes voies de transduction sont nécessaires pour bien décoder ce signal calcique.

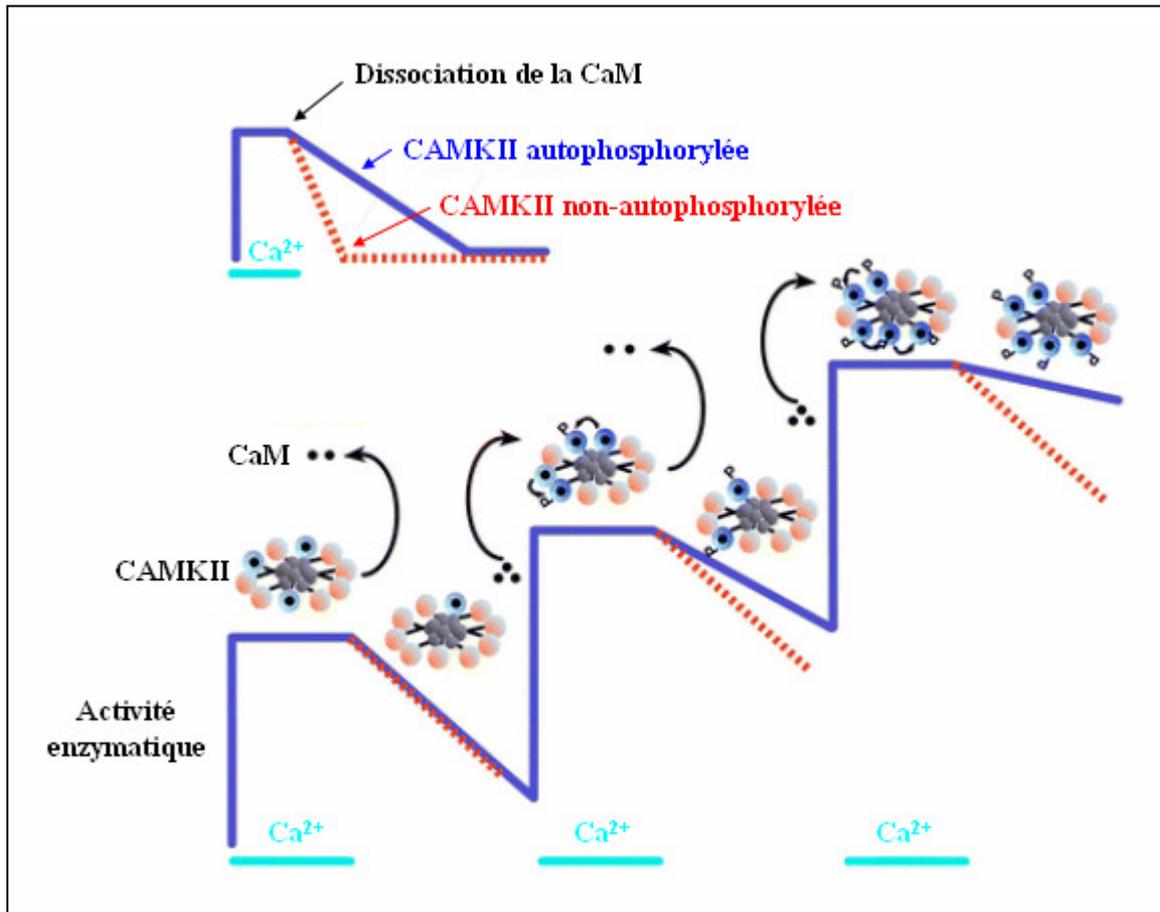


Fig. 12 : L'autophosphorylation de la CAMKII améliore son association à la CaM (en haut). Liaison facilitée de la CaM à la CAMKII suite à des pics calciques successifs (en bas). (Modifiée à partir de : [Hudmon and Schulman, 2002]).

III.B) Les acteurs du signal calcique

Comme déjà rapportée précédemment, la concentration cytosolique en calcium libre est finement régulée. Pour cela, la cellule doit continuellement réagir pour conserver une concentration aussi faible. Ceci est rendu possible principalement grâce à l'intervention de différents acteurs réticulaires, membranaires et cytoplasmiques.

α- Les acteurs réticulaires

Le RE est un organite cellulaire eucaryotique intervenant dans diverses fonctions cellulaires dont la synthèse protéique et lipidique, la maturation des protéines, le stockage de calcium... [Berridge and Irvine, 1989 ; Pozzan *et al.*, 1994 ; Galili *et al.*, 1998] et donc par cette dernière fonction le RE intervient dans l'homéostasie calcique dont le maintien nécessite

l'intervention de différents acteurs comme : les pompes Ca^{2+} ATP dépendantes appelées SERCA (Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase), les récepteurs à l' IP_3 (IP_3R), les récepteurs à la ryanodine (RyR) et les canaux de fuite (Fig. 13).

• Les SERCA

Les pompes calciques SERCA appartiennent à la famille des ATPases de type P. Ce sont des enzymes transportant les ions Ca^{2+} , à travers la membrane du RE, contre leur gradient électrochimique. Elles sont impliquées dans le stockage du calcium dans les réserves intracellulaires du RE par le biais d'un transport actif utilisant l'ATP comme source énergétique. Elles sont rassemblées en tétramères formant ainsi l'unité fonctionnelle d'une pompe Ca^{2+} ATP réticulaire. Ces protéines interviennent dans la régulation de certaines fonctions physiologiques telles que la régulation de la prolifération [Meehan *et al.*, 1997] et la différenciation cellulaire [Gelebart *et al.*, 2003]. Il existe trois gènes codant les SERCA d'où l'existence de trois familles différentes : SERCA1, 2 et 3 [Misquitta *et al.*, 1999 ; Martonosi and Pikula, 2003]. Chaque famille de SERCA présente différentes isoformes. A titre indicatif, la famille des SERCA1 possède 2 isoformes appelées SERCA1a et b, les SERCA2 possèdent 3 isoformes appelées SERCA2a, b et c et la famille des SERCA3 possède 6 isoformes appelées SERCA3a, b, c, d, e et f. L'expression de ces différentes isoformes est fonction de divers facteurs tels que la localisation tissulaire, le stade de développement (SERCA1b diminue, au niveau des muscles squelettiques, au cours du développement au profit de l'isoforme adulte SERCA1a) [Brandl *et al.*, 1987] et l'âge (l'expression des SERCA2a, au niveau du cœur, diminue au cours de la sénescence chez le rat) [Lompre *et al.*, 1991].

• Les IP_3R

Les récepteurs à l' IP_3 sont responsables de la libération du calcium réticulaire. Il existe 3 gènes différents codant pour ce récepteur donnant lieu à 3 protéines ($\text{IP}_3\text{R}1$, $\text{R}2$, $\text{R}3$) [Nakagawa *et al.*, 1991] et les épissages alternatifs des ARN messagers donnent lieu à de multiples isoformes. La structure du IP_3R (en particulier le récepteur de type 1 qui possède la structure la mieux connue) est généralement composée de trois domaines différents : le domaine N-terminal cytoplasmique correspond au domaine de fixation à l' IP_3 , le domaine C-terminal cytoplasmique permettant la régulation de l'activité du récepteur et un domaine central contenant six domaines transmembranaires portant la fonction canal. C'est un tétramère (homo ou hétérotétramère), où chacune des sous-unités porte 1 site de fixation à l' IP_3 , dont l'activité est régulée par la concentration de calcium cytosolique [Bezprozvanny *et al.*, 1991]. Il peut être impliqué dans

différents phénomènes physiologiques tels que l'activation des lymphocytes T [Hirota *et al.*, 1998].

- Les RyR

Les récepteurs à la ryanodine forment une famille de récepteurs présentant de fortes homologies avec le récepteur IP_3 . Comme pour le récepteur IP_3 , il existe 3 gènes codant pour 3 isoformes (RyR1-3) [Serysheva *et al.*, 2005] donnant lieu à un tétramère. Initialement, ces récepteurs ont été mis en évidence au niveau du réticulum sarcoplasmique des muscles squelettiques (RyR1) et cardiaques (RyR2). Le RyR intervient dans des mécanismes physiologiques tels que le couplage excitation-contraction au niveau du muscle squelettique. Toutefois, les récepteurs à la ryanodine (RyR3) ont été identifiés dans d'autres types cellulaires comme le cerveau (pour revues : [Petrovic *et al.*, 2008] et [Sorrentino, 2003]).

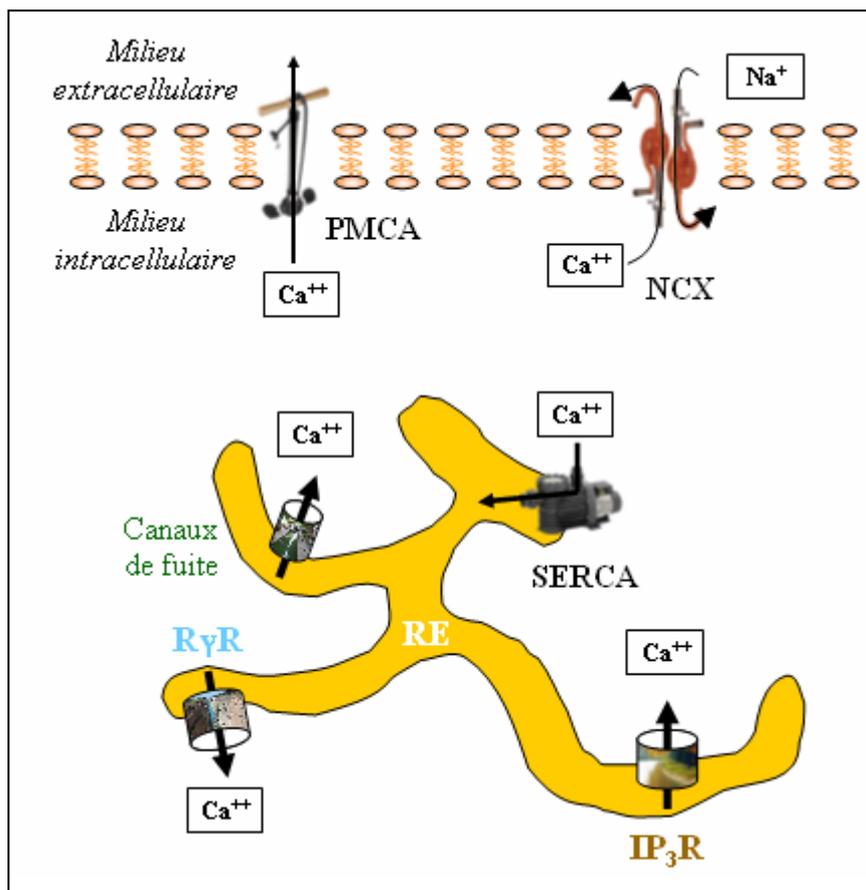


Fig. 13 : Principaux acteurs de l'homéostasie calcique intra-réticulaire : SERCA, IP_3R , RyR et canaux de fuite.

Principaux acteurs de l'homéostasie calcique de la membrane plasmique :

PMCA et NCX.

- Les canaux de fuite

Enfin, il existe au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique des canaux, dont l'identité moléculaire reste à élucider, impliqués dans le phénomène de fuite calcique passive du RE. Un des candidats majeurs, pouvant jouer un rôle dans cette fuite, est le complexe ribosome-translocon [Van Coppenolle *et al.*, 2004 ; Flourakis *et al.*, 2006]. Ce complexe intervient dans le cadre de la conformation et de la maturation protéique au sein du RE (pour revue : [Shimizu and Hendershot, 2007]). Il présente une grande perméabilité pour le calcium qui disparaît lors de la traduction (la chaîne polypeptidique bloquerait le canal) [Simon and Blobel, 1991]. Autre candidat, l'IP₃R1 qui possède un site de clivage par la caspase 3. Cette caspase va générer deux fragments dont un, présent au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique, permettra la fuite du calcium réticulaire et ainsi fonctionner comme canal de fuite [Verbert *et al.*, 2008]. Enfin, des protéines pouvant former des jonctions de type GAP telle que, la pannexine 1 (PanX1), peuvent également former des canaux permettant la fuite passive du calcium réticulaire [Vanden Abeele *et al.*, 2006].

β- Les acteurs de la membrane plasmique

Même si le réticulum endoplasmique est l'acteur majeur de l'homéostasie calcique, d'autres éléments présents sur la membrane plasmique interviennent également. En particulier les pompes Ca²⁺ ATP dépendantes appelées PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase) et l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ (NCX). Ces transporteurs pompent activement, contre leur gradient de concentration, les ions calciques depuis le cytosol vers le milieu extracellulaire (Fig. 13).

- Les PMCA

Les PMCA sont des pompes calciques dont la structure présente de fortes homologies avec les SERCA. Ces pompes, à la différence des SERCA réticulaires, sont insérées dans la membrane plasmique permettant ainsi l'expulsion du calcium cytosolique vers l'extérieur de la cellule [Carafoli, 1994]. Ces pompes sont ATP dépendantes. Elles sont codées par 4 gènes différents et la multitude d'ARNm, provenant des divers épissages alternatifs de ces gènes, montrent une distribution tissulaire très variée (pour revue : [Di Leva *et al.*, 2008]). Les protéines PMCA sont modulées par la calmoduline [Gopinath and Vincenzi, 1977] au niveau de

leur domaine C-terminal et les protéines kinases A et C peuvent être à l'origine de leur activation suite à des phénomènes de phosphorylation (pour revue : [Di Leva *et al.*, 2008]). Concernant les fonctions physiologiques des PMCA, peu est connu à l'heure actuelle, toutefois, on peut citer l'implication de l'isoforme 4 (PMCA4) dans la mobilité des spermatozoïdes [Schuh *et al.*, 2004].

- L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est ubiquitaire et présent abondamment dans le tissu cardiaque. Il est codé par 5 gènes et présente différentes isoformes selon l'épissage alternatif des ARNm (pour revue : [Blaustein and Lederer, 1999]). Cet échangeur est localisé au niveau de la membrane plasmique. Il participe, avec les PMCA, à l'évacuation des ions calciques du cytoplasme. Il utilise le gradient du sodium, entrant dans la cellule, comme source d'énergie. Suite à l'activation du transporteur, trois ou quatre ions Na^+ sont échangés contre un ion Ca^{2+} à chaque cycle. L'activité de cet échangeur dépend des concentrations calciques cytosoliques (une augmentation du calcium cytosolique active cet échangeur) et des concentrations sodiques cytosoliques (une augmentation du sodium cytosolique inhibe cet échangeur) [Guerini, 1998].

γ - Les acteurs cytoplasmiques

Enfin, une famille de protéines liant le calcium, les "calcium-binding protein", intervient également dans l'homéostasie calcique. Ces protéines jouent un effet tampon en absorbant le calcium cytosolique libre. Leur capacité à lier le calcium est variable ainsi que leur expression tissulaire. Certaines de ces protéines possèdent une activité enzymatique et d'autres des motifs du type EF-Hand (comme la calmoduline) [Means, 1988]. Elles peuvent être cytoplasmiques ou réparties dans divers organites au sein de la cellule, par exemple, dans le RE on retrouve les calséquestrine, calnexine et calréticuline [Arnaudeau *et al.*, 2002], dans le cytoplasme on retrouve la calmoduline et la calcineurine [Chard *et al.*, 1993 ; Edmonds *et al.*, 2000].

III.C) Les voies de transduction

Il existe, dans les cellules dépourvues de canaux dépendants du potentiel, deux voies majeures pour l'entrée du calcium dans la cellule. La première, appelée entrée capacitive, est dépendante de la vidange du Ca^{2+} réticulaire impliquant ainsi les canaux et les pompes calciques du réticulum endoplasmique et conduisant à l'activation de certains canaux de la membrane plasmique. La deuxième, appelée entrée non capacitive, est indépendante de la vidange des

stocks calciques réticulaires et son activation nécessite des seconds messagers pouvant se lier directement aux canaux membranaires.

α - L'entrée capacitive ou SOCE ou CCE

L'entrée capacitive ou SOCE (Store Operated Calcium Entry) ou CCE est un mécanisme d'influx calcique observé dans la quasi-totalité des cellules non excitables. L'existence de cette entrée fut proposée en 1986 par l'équipe de Putney [Putney *et al.*, 1986].

En effet, une large variété d'hormones, de facteurs de croissance, de neurotransmetteurs ou d'autres stimuli physiologiques et pathologiques, initie la réponse cellulaire en se liant à un récepteur membranaire spécifique. Celui-ci, couplé à une protéine G, active une phospholipase C (PLC) qui, à son tour, catalyse spécifiquement l'hydrolyse d'un phospholipide membranaire : le phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). La PLC de type β est activée par les membres α_q et par les sous unités $\beta\gamma$ des protéines G alors que, la PLC de type γ est activée par une protéine tyrosine kinase couplée elle-même à un récepteur [Zhu and Birnbaumer, 1998]. L'hydrolyse du PIP₂ génère une molécule soluble l'IP₃. La réponse cellulaire faisant suite à une augmentation du taux d'IP₃ cytosolique se développe en deux phases (Fig. 14 et 15 gauche).

La première phase (1), indépendante du Ca²⁺ externe, correspond à la mobilisation du contenu des stocks calciques intracellulaires. En effet, l'IP₃ est le ligand naturel du récepteur à l'IP₃. La liaison de l'IP₃ à son récepteur engendre la vidange des réserves calciques induisant l'activation d'une protéine appelée STIM1 « Stromal Interaction Molecule 1 ». Cette protéine est présente au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique et est sensible aux concentrations calciques réticulaires (voire plus bas) (Fig. 14 et 15 gauche 1). La seconde phase (2) consiste en une entrée soutenue de Ca²⁺ depuis le milieu extérieur (Fig. 14 et 15 gauche 2).

Toutefois, la génération d'IP₃ par la PLC s'accompagne de la synthèse du DAG alors, afin d'éviter la production du DAG et pour observer uniquement la CCE, il est possible d'obtenir cette dernière, expérimentalement, par l'utilisation de certaines drogues, comme la thapsigargine (TG), connues pour bloquer spécifiquement les pompes SERCA et induire une vidange passive des stocks calciques réticulaires, indépendamment de l'IP₃, par les canaux de fuites réticulaires (Fig. 15 droite).

Enfin, la vidange, par la TG ou l'IP₃, nécessite la stimulation de STIM1 conduisant à l'activation de canaux calciques membranaires. Ces canaux calciques sont appelés SOC pour « Store-Operated calcium Channels » et permettent l'entrée capacitive (CCE) (Fig. 14).

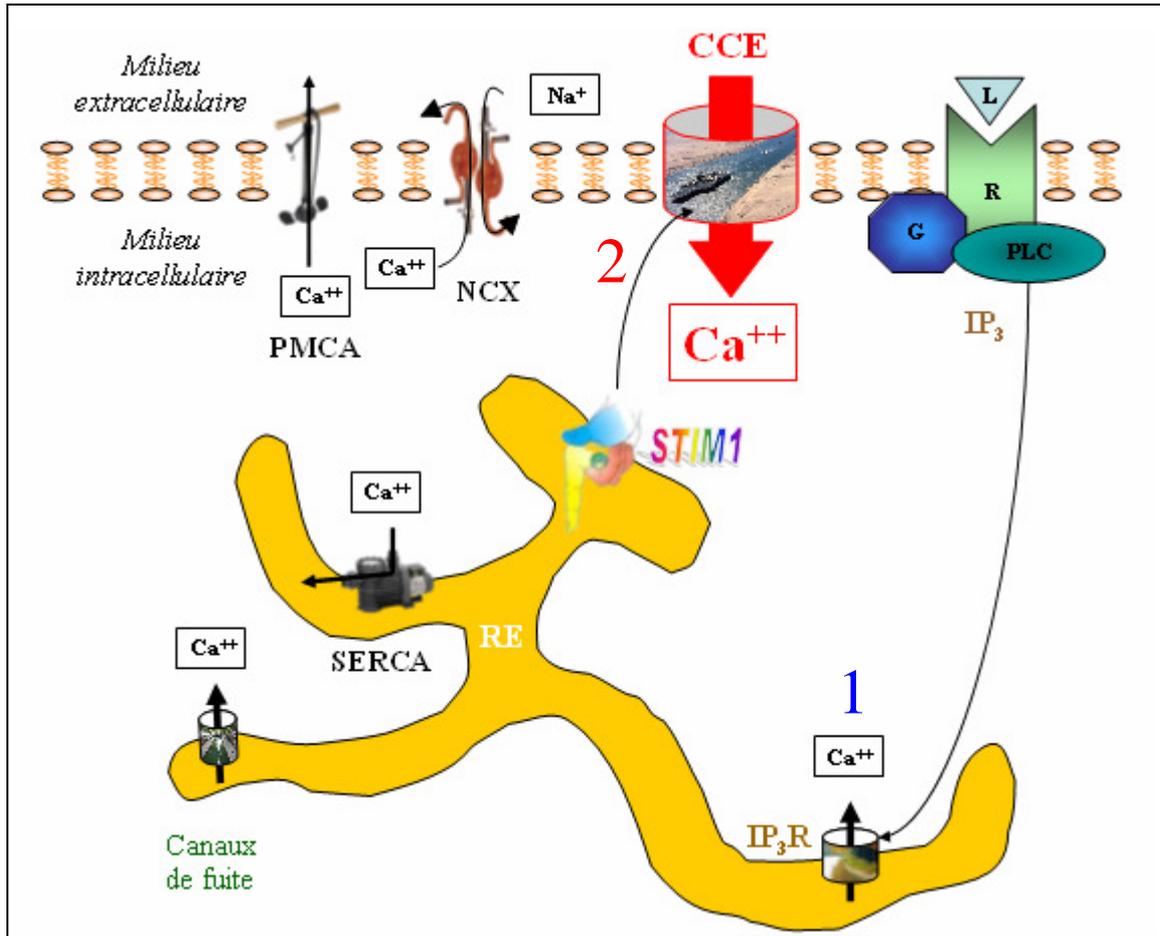


Fig. 14 : Entrée capacitive (CCE).

(L=Ligand, R=Récepteur et G=protéine G).

Première phase (1) : vidange des stocks calciques réticulaire par l' IP_3 et stimulation de l'entrée du calcium extracellulaire par STIM1.

Seconde phase (2) : l'entrée du calcium extracellulaire, CCE.

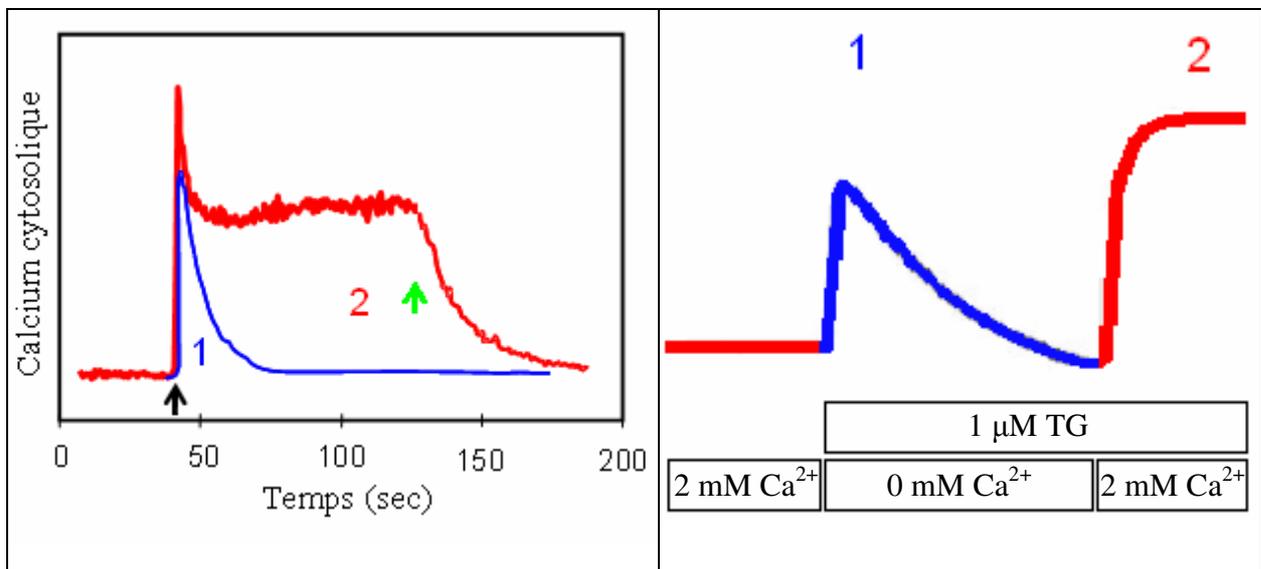


Fig. 15 : Les deux phases de la réponse cellulaire faisant suite à : une augmentation du taux d' IP_3 cytosolique à gauche et à une stimulation par la thapsigargine (TG) à droite.

A gauche :

Première phase (1) : Pic correspondant à la vidange des stocks intracellulaires engendrée par l'ajout d'un agoniste physiologique (flèche noire) : en absence de Ca^{2+} extracellulaire (bleu), en présence de Ca^{2+} extracellulaire (rouge).

Seconde phase (2) : plateau correspondant à l'entrée de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire.

Flèche verte : arrêt de la stimulation et retour à l'état basal.

A droite :

Première phase (1) : Pic correspondant à la vidange des stocks intracellulaires engendrée par l'ajout de la TG en absence de calcium (flèche 1).

Seconde phase (2) : Plateau correspondant à l'entrée de Ca^{2+} (CCE) depuis le milieu extracellulaire après rajout de 2 mM de calcium (flèche 2).

β - L'entrée non capacitive ou NCCE

La seconde voie d'entrée calcique implique d'autres seconds messagers comme le DAG (le DAG, comme l' IP_3 , est généré par l'hydrolyse du PIP_2 suite à l'activation de la voie impliquant la PLC) ou l'acide arachidonique (AA qui est produit par la voie de la phospholipase A_2 (PLA₂) ou par la DAG lipase à partir du DAG). L'activation des canaux calciques membranaires se fait indépendamment de la vidange des compartiments calciques intracellulaires et cette entrée est appelée non capacitive (NCCE) par opposition à la voie décrite précédemment (Fig. 16).

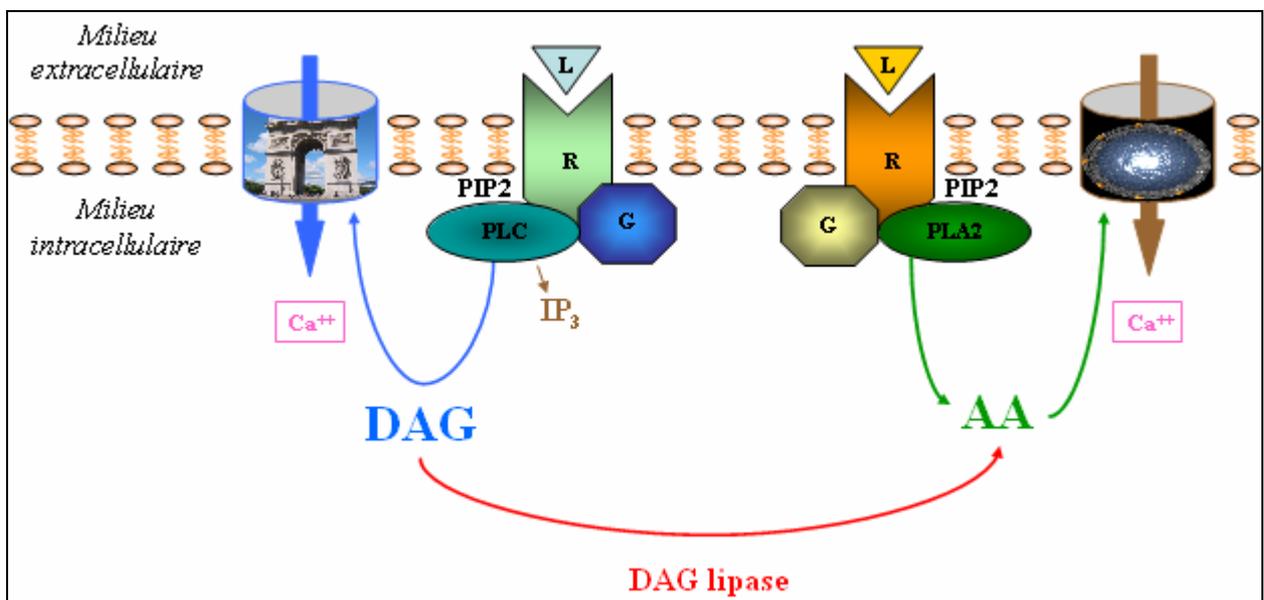


Fig. 16 : Entrée non capacitive (NCCE).

(L=Ligand, R=Récepteur et G=protéine G).

La nature moléculaire exacte des canaux impliqués dans la CCE et la NCCE reste encore matière à débats. Les gènes des canaux TRP « Transient Receptor Potential » [Minke *et al.*, 1975] encodent pour une vingtaine de canaux plus ou moins sélectifs au calcium pouvant être impliqués dans l'entrée de calcium après stimulation de récepteur et dans le remplissage des réserves intracellulaires après leur vidange [Hofmann *et al.*, 2000]. Récemment, 2 autres candidats, appelés STIM1 « Stromal Interaction Molecule 1 » [Parker *et al.*, 1996 ; Liou *et al.*, 2005 ; Roos *et al.*, 2005] et Orai1 alias CRACM1 « Calcium Release-Activated Calcium Modulator 1 » [Feske *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006], ont vu leur intérêt grandir et plus particulièrement dans le volet capacitif.

III.D) La superfamille des canaux calciques TRP

En 1969, Cosens et Manning ont isolé un mutant de la drosophile présentant un électrorétinogramme anormal et une réponse transitoire, à la place d'une réponse soutenue, lors d'un d'éclairage prolongé [Cosens and Manning, 1969]. En 1975, Minke *et al.* ont démontré que l'absence de la régénération pigmentaire, dans ces mutants, est due à un défaut au niveau de la cascade de transduction. A cause du phénotype particulier des ces mutants, l'équipe de Minke proposa de les désigner par les termes de « Transient Receptor Potential » (TRP) [Minke *et al.*, 1975]. Seize ans plus tard, Minke et Selinger ont proposé que ces TRP puissent correspondre à des canaux transportant des cations [Minke and Selinger, 1991]. Depuis, l'intérêt pour ces canaux TRP n'a cessé d'augmenter, d'autant plus après leur clonage et séquençage par Montell et Rubin [Montell and Rubin, 1989] et l'étude réalisée en patch clamp par Hardie et Minke [Hardie and Minke, 1992]. Ces travaux, en plus des travaux d'autres équipes, ont fourni des preuves solides sur la nature moléculaire des TRP décrivant ainsi une nouvelle famille de canaux perméables aux cations et en particulier au calcium.

α- La famille des TRP

Les gènes des canaux TRP encodent, chez les mammifères, une trentaine de membres (Fig. 17). Cette superfamille des TRP est divisée en 7 sous-familles. Les 3 sous-familles TRPC, TRPV et TRPM sont les plus classiques. La lettre « C » signifie « Canonical » car ces gènes sont étroitement apparentés avec le gène *trp* cloné chez la drosophile. La lettre « V » fait référence au premier membre de cette famille, TRPV1 ou récepteur aux « vanilloïdes », qui fut identifié

comme un canal activé par la capsaïcine [Caterina *et al.*, 1997]. Le « M » fait référence au premier membre de cette famille, « Mélastatine » ou TRPM1. Les 4 autres sous-familles ont été récemment découvertes : TRPML « Mucolipine », TRPP « Polycystine », TRPA « Ankyrine » et TRPN « NOmpC » (NO mechanotransducer potential C) absente chez les mammifères (Fig. 17) (pour revue : [Minke, 2006]). Les TRP sont ubiquitaires, pouvant être modulés par diverses protéines telles que la calmoduline [Cioffi *et al.*, 2005]. Certains TRP tels que, TRPM2, 4, 5 et 8 ou les TRPV1, 2, 3 et 4, peuvent jouer un rôle dans le système sensoriel en particulier dans la nociception ou la thermoception (pour revue : [Patapoutian *et al.*, 2009]). Les TRP sont impliqués dans l'entrée de calcium après stimulation de récepteur et dans le remplissage des réserves intracellulaires après leur vidange (pour revue : [Hofmann *et al.*, 2000]). En effet, la surexpression de certains TRP s'accompagne d'une augmentation de l'entrée capacitive alors que l'inhibition de l'expression de leur ARNm (par des ARN interférants) diminue la CCE endogène (pour revue : [Birnbauer *et al.*, 1996]). Par ailleurs, les TRP, en particuliers TRPC3 et TRPC6, sont impliqués dans la NCCE [Hofmann *et al.*, 1999].

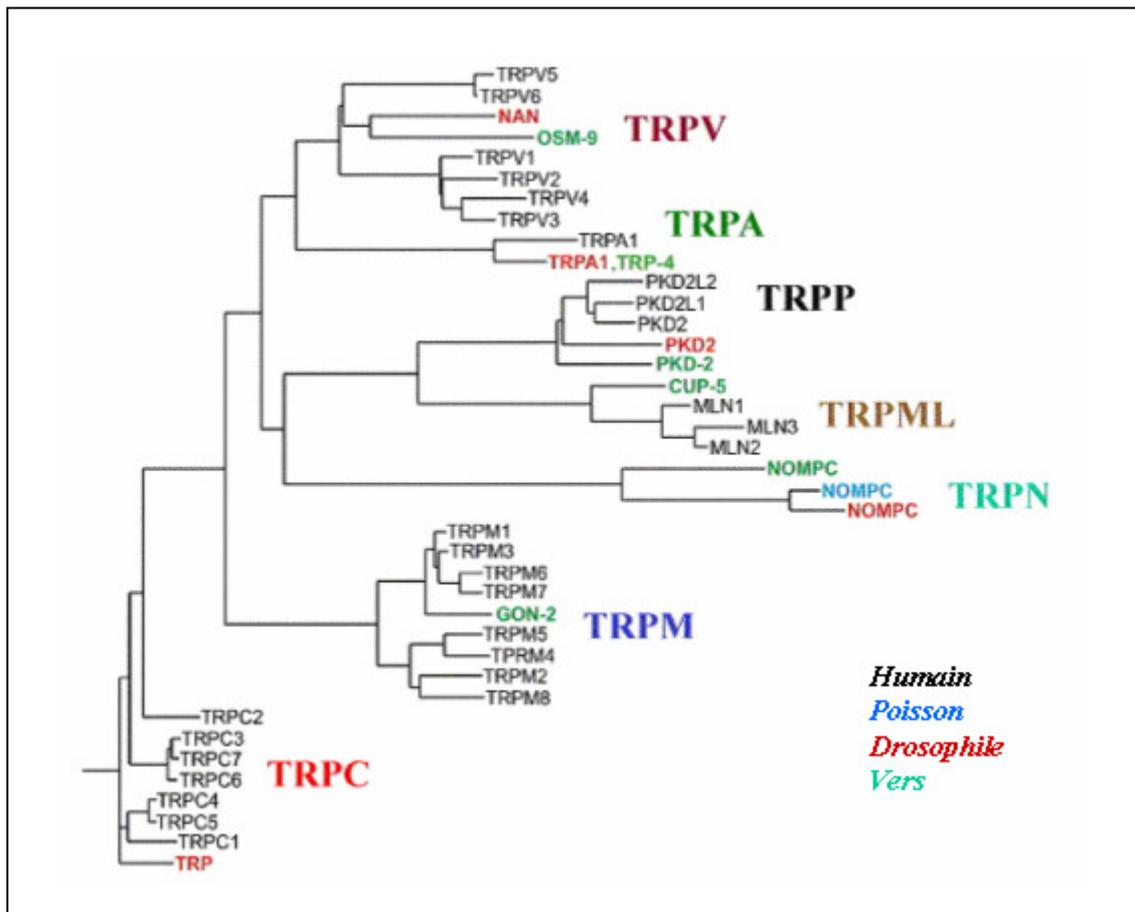


Fig. 17 : La famille des TRP.

(Modifiée à partir de : «TRP channels and Ca^{2+} signaling » [Minke, 2006]).

β - La structure des TRP

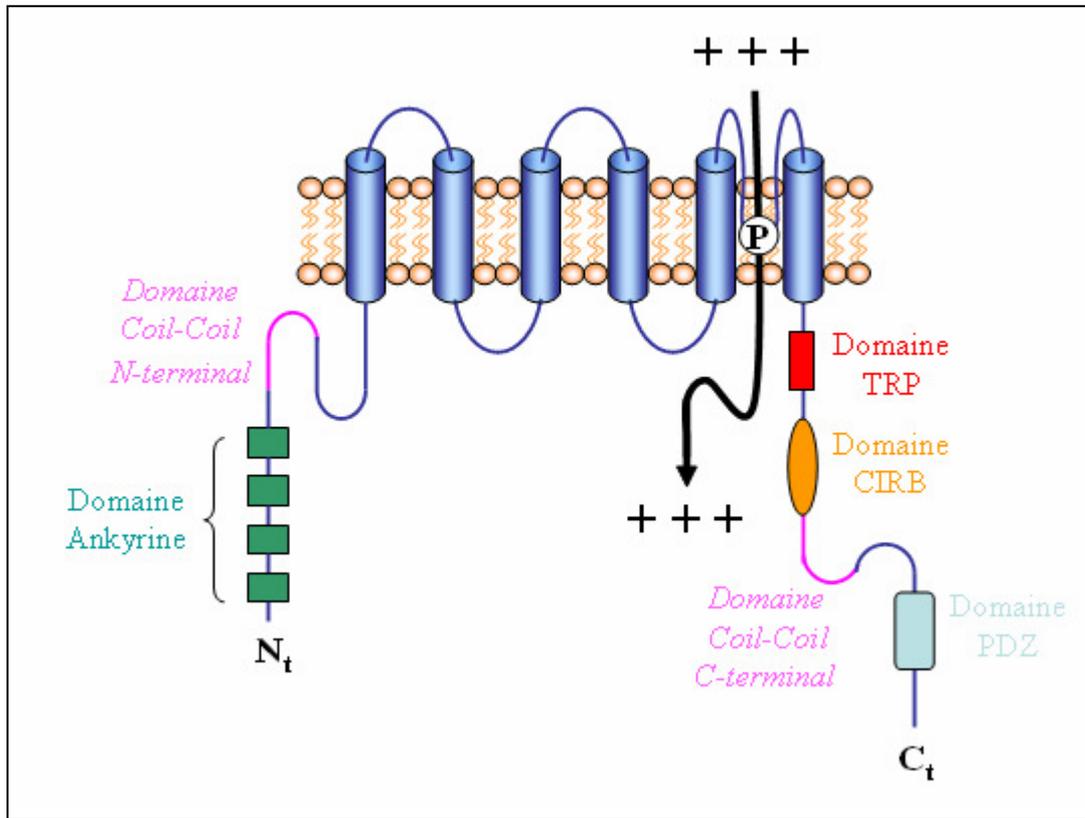


Fig. 18 : La structure d'un monomère de TRP.

Domaine ankyrine en N-terminal.

CC-N : domaine coil-coil N-terminal impliqué dans la dimérisation.

CC-C : domaine coil-coil C-terminal impliqué dans la liaison avec la calmoduline.

CIRB : motif de liaison à la calmoduline.

PDZ : motif de liaison à d'autres protéines.

Domaine TRP : contient le motif EWKFAR commun aux TRPC.

LFW : motif commun aux TRPC et situé dans la région présomptive du pore au niveau de la « P-loop ».

+++ : Cations.

Les TRP sont des monomères comprenant 6 segments transmembranaires hydrophobes chacun séparé par de petites boucles hydrophiles (Fig. 18). La séquence comprise entre les segments transmembranaires 5 et 6 comprend une boucle « P-loop » impliquée dans la sélectivité ionique du canal. Leurs parties N et C-terminales sont cytoplasmiques et contiennent différents domaines. Par exemple, il existe d'une part, un domaine ankyrine (dans certaines sous-familles de TRP) et un domaine CC-N (coil-coil N-terminal) en N-terminal et d'autre part, un

domaine CC-C (coil-coil C-terminal) en C-terminal. Il existe également différents motifs communs aux TRPC (EWKFAR et LFW), aux TRPC et V (les motifs ankyrine présents en N-terminal) et des motifs impliqués dans des interactions protéiques (CRIB et PDZ) (Fig. 18) (pour revue : [Vassort and Fauconnier, 2008]).

Enfin, chaque 4 monomères de TRP se multimérisent et forment une structure tétramérique (homo ou hétéro-tétramère) [Kedei *et al.*, 2001 ; Amiri *et al.*, 2003 ; Hoenderop *et al.*, 2003 ; Chubanov *et al.*, 2004].

γ- Les TRPC

Chez les invertébrés (Fig. 19), le premier membre de la famille des TRPC fut découvert chez la drosophile et fut appelé TRP [Montell and Rubin, 1989]. Chez cette mouche, ce TRP est impliqué dans la réponse transitoire enregistrée suite à un stimulus lumineux [Montell, 1999]. Par la suite, deux autres TRPC furent découverts chez cette espèce, TRPL « TRP-Like » et TRP γ [Phillips *et al.*, 1992 ; Xu *et al.*, 2000]. C'est deux TRP sont impliqués dans la réponse soutenue suite à un stimulus lumineux [Leung *et al.*, 2000]. Quant à cTRP-3, il fut découvert chez « *Caenorhabditis elegans* » et il est impliqué dans le phénomène de fertilisation chez cette espèce [Flemming *et al.*, 2003].

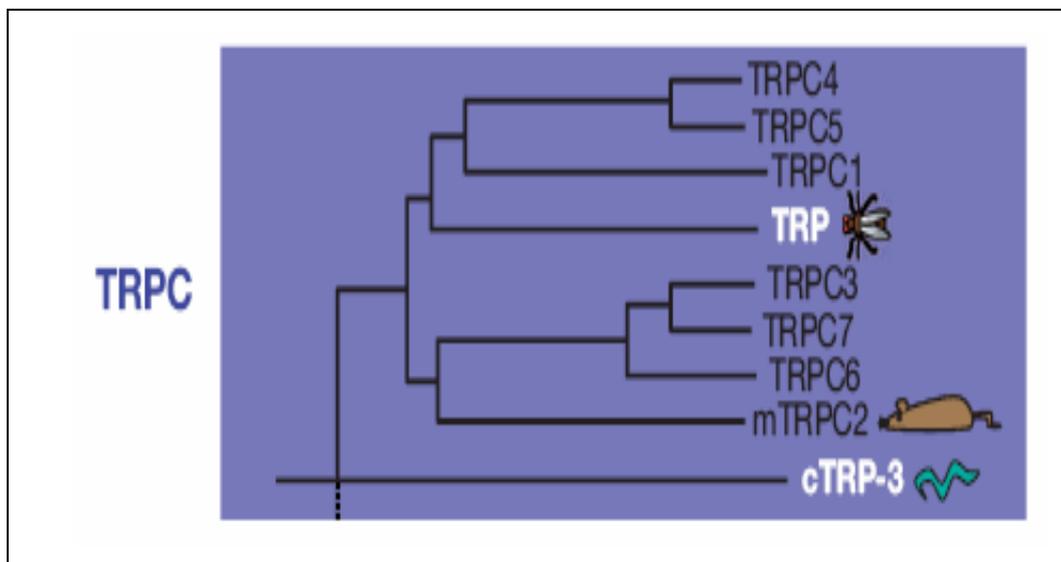


Fig. 19 : La famille des TRPC

Chez les invertébrés les membres de la famille des TRPC (TRP chez la drosophile et cTRP-3 chez « *Caenorhabditis elegans* ») sont représentés en blanc. Les TRPC représentés en noir sont présents chez les vertébrés et en particulier les mammifères.

(Modifiée à partir de : [Venkatachalam and Montell, 2007]).

Chez les mammifères (Fig. 19), les premiers TRP découverts (par homologie avec les TRP de la drosophile) furent appelés TRPC1, 2 et 3 [Wes *et al.*, 1995 ; Zhu *et al.*, 1995]. Depuis, cette famille n'a cessé d'augmenter et à l'heure actuelle on dénombre 7 membres différents (TRPC1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7) [Montell *et al.*, 2002]. En réalité, *trpc2* est considéré comme un pseudogène chez l'humain ; il n'en est pas ainsi chez les souris. En effet, chez celles-ci, *trpc2* (appelé *mtrpc2*) constitue un gène présent au niveau de l'organe voméronasal [Wes *et al.*, 1995]. Il peut être impliqué dans l'entrée capacitive des cellules COS-M6 [Vannier *et al.*, 1999]. La distribution tissulaire des TRP est très variable (pour revue : [Venkatachalam and Montell, 2007]).

Ces TRPC sont des canaux cationiques présentant une sélectivité plus ou moins importante pour le calcium, par exemple TRPC5 présente la plus grande sélectivité pour le calcium et à l'inverse TRPC1 est un canal cationique non sélectif (pour revues : [Venkatachalam and Montell, 2007] et [Nilius, 2007]). Ils peuvent exister sous forme d'homo-tétramères mais ils peuvent également former des hétéro-tétramères, par exemple TRPC1 avec TRPC3, 4, 5 et 7 ou TRPC6 avec TRPC3 et 7 (Pour revue : [Ambudkar and Ong, 2007]).

Le mécanisme d'action des TRPC passe par la voie PLC [Montell, 2005] conduisant ainsi à l'activation de l'une des deux voies calciques (CCE ou NCCE) suite à la génération d'IP₃ ou du DAG (comme décrit précédemment). De ce fait certains canaux TRPC, comme TRPC1 et C4 sont connus, depuis quelques années, comme étant impliqués dans le courant de type SOC (correspondant à la CCE et activés suite à la vidange des stocks calciques réticulaires par le biais de l'IP₃, la thapsigargine...) [Cioffi *et al.*, 2005]. TRPC3 et C7 sont capables de générer un courant de type SOC lorsqu'ils sont complexés à TRPC1 [Liu *et al.*, 2005 ; Zagranichnaya *et al.*, 2005]. Les TRPC contribuent aussi à l'entrée calcique indépendante de la vidange des stocks réticulaires ou NCCE, par exemple TRPC3, 6 et 7 peuvent être activés directement par le DAG qui est un second messenger provenant de l'hydrolyse des PIP₂ [Dietrich *et al.*, 2005 ; Putney, 2005].

Enfin, les canaux TRPC peuvent être à l'origine de diverses canalopathies, par exemple l'altération de l'expression de TRPC6, au niveau du rein, est responsable d'une maladie rénale appelée glomérulosténose segmentale focale [Reiser *et al.*, 2005 ; Winn *et al.*, 2005]. De plus, la variation de l'expression de TRPC1, 3 ou 6 peut-être à l'origine de dysfonctionnements et de

maladies cardio-vasculaires (pour revue : [Inoue *et al.*, 2006]) et respiratoires [Vassort and Fauconnier, 2008]. Ces dernières années ont vu l'émergence de nouvelles données liant cette sous-famille à une nouvelle catégorie de canalopathies : la tumorigenèse. A titre indicatif, TRPC1 et 4 sont impliqués dans la carcinogenèse des cellules basales de la peau [Beck *et al.*, 2008], TRPC3 est impliqué dans la prolifération de la lignée cellulaire OC (human ovarian cancer cell line) [Yang *et al.*, 2009] et TRPC6 est impliqué dans la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses [Thebault *et al.*, 2006] et dans la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses du sein [Guilbert *et al.*, 2008].

III.E) Le canal TRPC6

α-trpc6 et hTRPC6

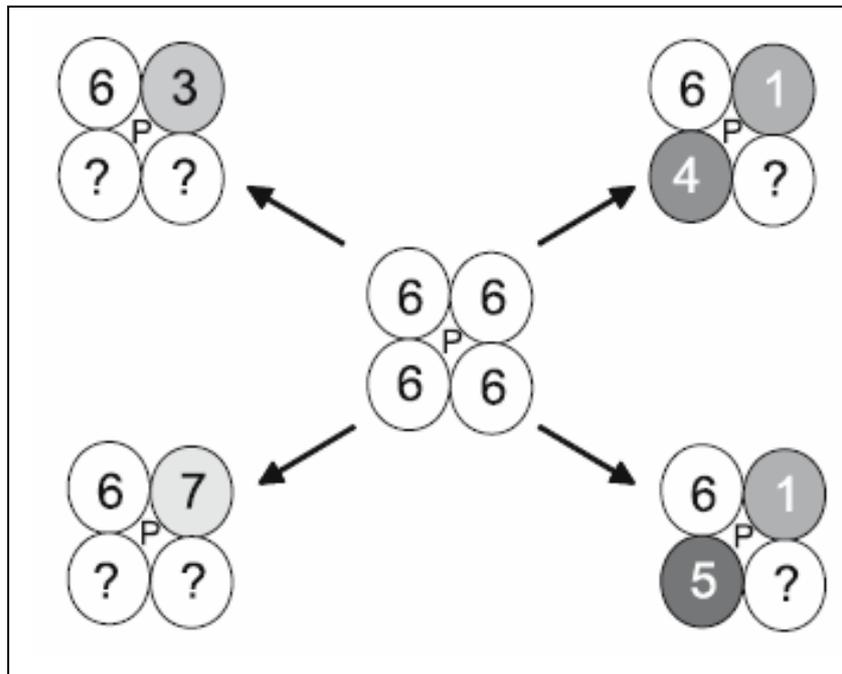


Fig. 20 : Différentes possibilités d'hétéro-tétramérisation entre TRPC6 et ses partenaires.

1 = TRPC1 ; 3 = TRPC3 ; 4 = TRPC4 ; 5 = TRPC5 ; 6 = TRPC6 ; 7 = TRPC7

p = « P-loop »

? = autres partenaires (PKC, FKBP12, calcineurine et calmoduline [Kim and Saffen, 2005])

(Modifiée à partir de : [Dietrich and Gudermann, 2007]).

Le cDNA de hTRPC6 (TRPC6 humain) fut cloné en 1999 par l'équipe de Hofmann à partir du placenta [Hofmann *et al.*, 1999]. Son gène est localisé sur le chromosome 11q21-q22 et

possède 13 exons [D'Esposito *et al.*, 1998]. En tant que protéine, hTRPC6 possède 931 acides aminés et une masse, théorique approximative, de 106 kDa. C'est une protéine transmembranaire possédant 2 sites potentiels de glycosylation [Dietrich *et al.*, 2003]. TRPC6 contient 3 domaines ankyrine (en N-terminal), la « TRP box », 2 régions « coiled-coil », 2 domaines de liaison (en C-terminal) au IP₃R et un site de liaison à la calmoduline (en C-terminal) [Boulay *et al.*, 1999 ; Zhang and Saffen, 2001 ; Birnbaumer *et al.*, 2003 ; Vazquez *et al.*, 2004]. Comme d'autres TRP, TRPC6 peut être sous forme homo ou hétéro-tétramérique [Hofmann *et al.*, 2002] (Fig. 20). Par exemple, TRPC6 peut former des hétéro-tétramères avec TRPC3 ou TRPC7 [Goel *et al.*, 2002] et il peut également former des hétéro-tétramères avec d'une part TRPC1-C4 et d'autre part TRPC1-TRPC5 [Strubing *et al.*, 2003].

La protéine hTRPC6 possède 3 isoformes. La première est l'isoforme 1 (~ 106 kDa) [Hofmann *et al.*, 1999], la seconde est l'isoforme 2 (~ 93 kDa) et la troisième est l'isoforme 3 (~ 100 kDa) [Philipp *et al.*, 2000]. L'isoforme 2 et 3 sont tronquées en N-terminal respectivement au niveau des acides aminés 316 à 431 et 377 à 431 (Fig. 21).

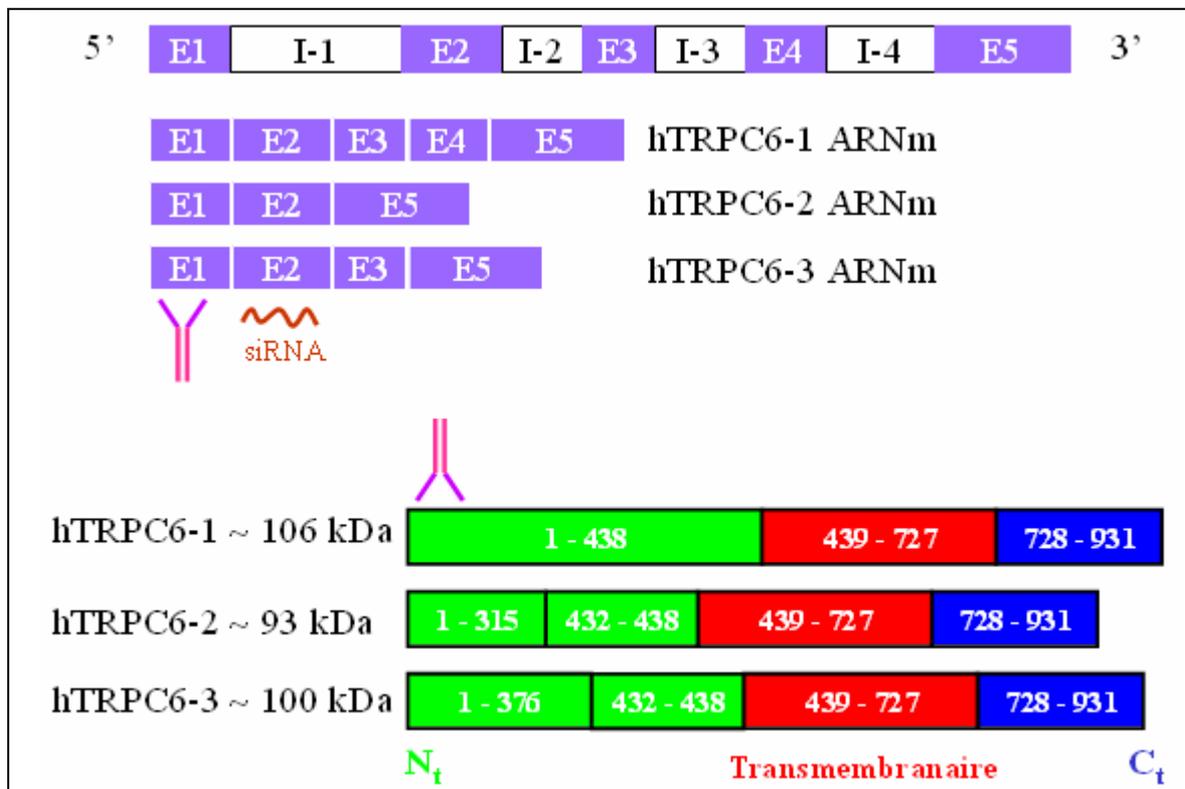


Fig. 21 : Différentes isoformes de TRPC6 en ARNm (en haut) et en protéines (en bas).

E = exon ; I = intron ; Y = anti-hTRPC6 ; wavy = siRNA hTRPC6.

β - TRPC6 dans les tissus sains

TRPC6 humain est majoritairement exprimé au niveau du placenta, des ovaires, la rate, des cellules musculaires lisses (des poumons, de l'estomac, de l'oesophage et du myomètre) (pour revue : [Boulay *et al.*, 1997], [Beech *et al.*, 2004] et [Abramowitz and Birnbaumer, 2009]).

γ - Propriétés du canal TRPC6

TRPC6 est un canal non-sélectif aux cations avec un ratio de perméabilité $P_{Ca}/P_{Na} \sim 6$ [Hofmann *et al.*, 1999 ; Bianchi *et al.*, 2004] et une conductance allant de 28 à 37 pS (pour revue : [Dietrich and Gudermann, 2007]). Ces caractéristiques le distinguent de TRPC3 qui possède une plus faible perméabilité au calcium et une plus forte conductance que TRPC6 [Owsianik *et al.*, 2006]. A la différence de TRPC3, TRPC6 présente une activité basale négligeable (dans un modèle de surexpression) due à la double glycosylation de ce canal qui est un élément critique pour son activité (Fig. 22). En effet, la double glycosylation de TRPC6 bloque l'activité basale de ce dernier [Dietrich *et al.*, 2003] de ce fait, l'activité de TRPC6 est finement régulée.

De plus, l'équipe de Dietrich a démontré que l'absence de TRPC6 des souris KO-TRPC6 est compensée par la surexpression de TRPC3 ce qui affecte d'une part l'amplitude du courant enregistré et d'autre part le potentiel membranaire (TRPC3 est impliqué dans l'entrée de calcium basale) [Dietrich *et al.*, 2005].

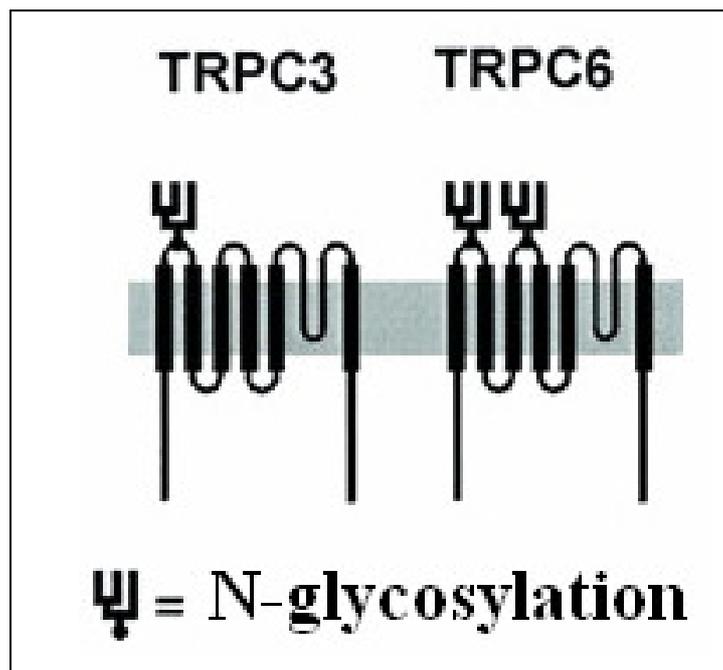


Fig. 22 : N-glycosylation de TRPC3 et 6

TRPC3 possède un site de glycosylation sur la première boucle extracellulaire.

TRPC6 possède deux sites potentiels de glycosylation sur la première et la deuxième boucle extracellulaire.

(Modifiée à partir de : [Dietrich et al., 2003]).

Enfin, la pharmacologie de TRPC6 est peu étudiée. Toutefois, ce canal est inhibé, comme beaucoup de canaux calcique, par le lanthane [Inoue *et al.*, 2001] où le gadolinium [Dietrich *et al.*, 2005]. Concernant les activateurs de ce canal on peut citer : l'OAG (analogue stable du DAG ; 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol) (non spécifique de TRPC6), le 20-HETE (« 20-hydroxy-5,8,11,14-eicosatetraenoic acid » peu efficace et peu spécifique) [Basora *et al.*, 2003] et le FFA (« Flufenamic acid », généralement inhibiteur des TRPC3 et 7, semble activer TRPC6 dans des modèles de surexpression. Mais ce composé peut également activer d'autres récepteurs tel que le récepteur α 1-adrénergique) [Inoue *et al.*, 2001]. Une molécule connue sous le nom « d'hyperforine », extraite d'une plante appelée millepertuis, fut récemment proposée comme activateur spécifique de TRPC6. Toutefois, des données supplémentaires sont nécessaires pour valider le rôle activateur et surtout spécifique de TRPC6 [Leuner *et al.*, 2007 ; Muller *et al.*, 2008].

δ - Régulation du canal TRPC6

Le canal TRPC6 est généralement classé dans la famille des ROC (Receptor-Operated Channel). Cette classification tient compte de l'activation de ce canal par des seconds messagers tel que le DAG et cela indépendamment de la vidange des stocks calciques réticulaires [Hofmann *et al.*, 1999 ; Okada *et al.*, 1999]. Toutefois, TRPC6 possède 2 domaines de liaison à l'IP₃R (comme décrit avant) et la translocation de TRPC6 à la membrane est sous le contrôle des deux mécanismes (SOC et ROC) [Cayouette *et al.*, 2004]. Godin et Rousseau ont démontré que l'inhibition de l'expression de TRPC6, par la technique des siRNA, au niveau des cellules musculaires lisses des voies respiratoires, ne diminue pas la réponse à l'OAG [Godin and Rousseau, 2007]. De plus, la surexpression d'une faible quantité de plasmide (100 ng) d'Orai1, dans les HEK-TRPC6 (HEK-293 où TRPC6 est surexprimé de façon stable), bloque d'une part la réponse à l'OAG et augmente d'autre part l'amplitude de l'entrée capacitive (SOC) dans cette lignée. De ce fait, TRPC6 peut passer d'une NCCE à une CCE en fonction de la quantité d'Orai1 exprimée au niveau de la cellule [Liao *et al.*, 2007]. Enfin, des études récentes ont montré l'implication de TRPC6 dans l'entrée de type SOC. Premièrement, dans les cellules musculaires

lisses qui entourent les vaisseaux sanguins au niveau du poumon, l'augmentation de l'expression de TRPC6 suite à une stimulation par le PDGF (platelet-derived growth factor) entraîne une augmentation de la CCE [Yu *et al.*, 2003]. Deuxièmement, l'inhibition de l'expression endogène de TRPC6, par les siRNA, entraîne une diminution de l'entrée calcique induite par la thapsigargine dans les cellules HL-60 [Brechard *et al.*, 2008]. Troisièmement, l'inhibition de TRPC6 endogène par un anticorps dirigé contre ce dernier inhibe le développement du SOC dans les myocytes issus de l'artère coronaire [Saleh *et al.*, 2008]. Par la suite, la fonctionnalité de TRPC6 ne peut pas être restreinte à la voie d'entrée non capacitive.

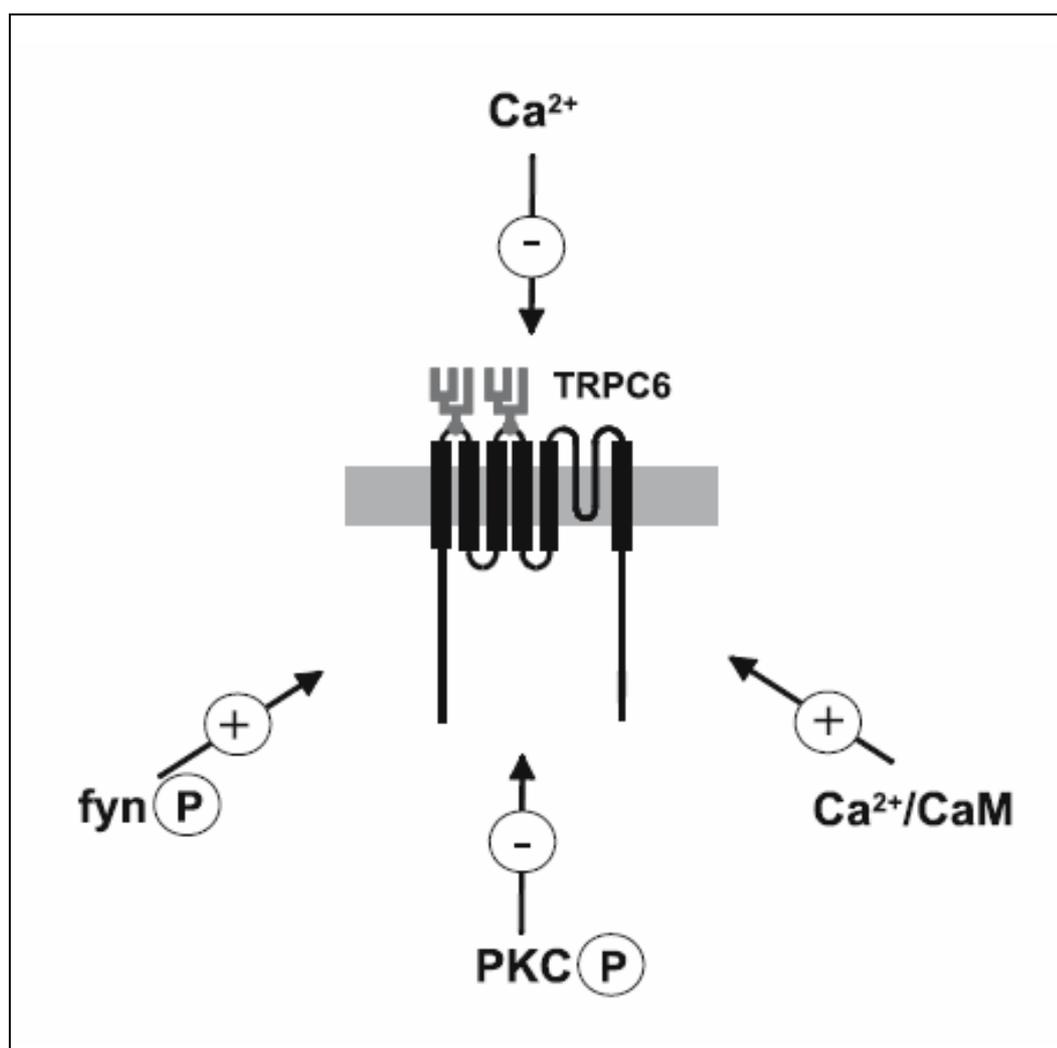


Fig. 23 : Régulation de TRPC6

L'augmentation du calcium extracellulaire ainsi que la phosphorylation par la PKC inhibe l'activité de TRPC6.

La phosphorylation par Fyn ainsi que la stimulation par le complexe Ca^{2+}/CaM augmentent l'activité de TRPC6.

(Modifiée à partir de : [Dietrich and Gudermann, 2007]).

L'activité de TRPC6 peut-être régulée par différents éléments. Premièrement, une diminution du calcium extracellulaire augmenterait le courant induit la vasopressine dans les cellules musculaires lisses de rat [Jung *et al.*, 2002]. Deuxièmement, à l'inverse de TRPC3 [Zhang *et al.*, 2001], TRPC6 est régulé positivement par le complexe Ca^{2+} /calmoduline [Boulay, 2002] et cet effet semble passer par la voie de phosphorylation impliquant la « calmodulin-dependent kinase II » [Shi *et al.*, 2004]. Troisièmement, TRPC6 peut être régulé par des sérines et des tyrosines kinases. Par exemple, la PKC (Protéine kinase C) inhibe la réponse induite par le carbachol (agoniste des récepteurs muscariniques) via la phosphorylation de TRPC6 [Trebak *et al.*, 2003 ; Shi *et al.*, 2004], cette phosphorylation empêcherait la liaison de certaines protéines comme la FKBP12, la calcineurine et la calmoduline [Kim and Saffen, 2005]. Finalement, un membre de la famille des Src (famille de protéines possédant une activité tyrosine kinase), Fyn, est capable non seulement de stimuler l'activité de TRPC6, par la voie impliquant le récepteur à l'EGF, mais aussi de se lier physiquement à ce dernier [Hisatsune *et al.*, 2004] (Fig. 23).

III.F) Les STIM et les Orai

L'existence des SOC fut proposée pour la première fois en 1986 par J.W. Putney Jr. [Putney, 1986] et le courant le mieux caractérisé dans cette famille des SOC, à partir des mastocytes et des lymphocytes-T Jurkat (Human T cell lymphoblast-like cell line), est le courant CRAC (calcium release-activated calcium current) [Hoth and Penner, 1992 ; Hoth and Penner, 1993 ; Zweifach and Lewis, 1993]. Depuis, la nature moléculaire des canaux impliqués dans cette entrée calcique est devenu matière à débats. Tout d'abord, cette fonction de vidange des stocks calciques réticulaires, fut attribuée aux TRP et en particulier aux TRPC vue que cette sous-famille de canaux peut-être activée suite à l'activation de la voie PLC (pour revue : [Parekh and Putney, 2005]). Toutefois, même si certains membres de la famille des TRPC sont capables d'engendrer un courant SOC, ce dernier ne possède pas les mêmes caractéristiques que le courant de type CRAC. Par la suite, un tournant important dans l'histoire du CRAC fut la découverte de deux protéines. La première, clonée en 1996 et attribuée au SOC en 2005, est STIM1 (stromal interacting molecule 1) ou GOK [Roos *et al.*, 2005 ; Soboloff *et al.*, 2006] et la deuxième, découverte en 2006, est Orai1 également appelé CRACM1 (calcium release-activated calcium modulator 1) [Feske *et al.*, 2006 ; Yeromin *et al.*, 2006]. L'apparition de ces 2 molécules, ainsi que certaines de leurs isoformes, a permis de mettre en évidence la présence d'un courant dont les propriétés sont identiques, dans certains types cellulaires, au CRAC [Feske *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006].

α- La structure des STIM

Le gène *stim1*, présent au niveau du chromosome 1 (région 11p15.5), fut cloné chez l'humain en 1996 [Parker *et al.*, 1996].

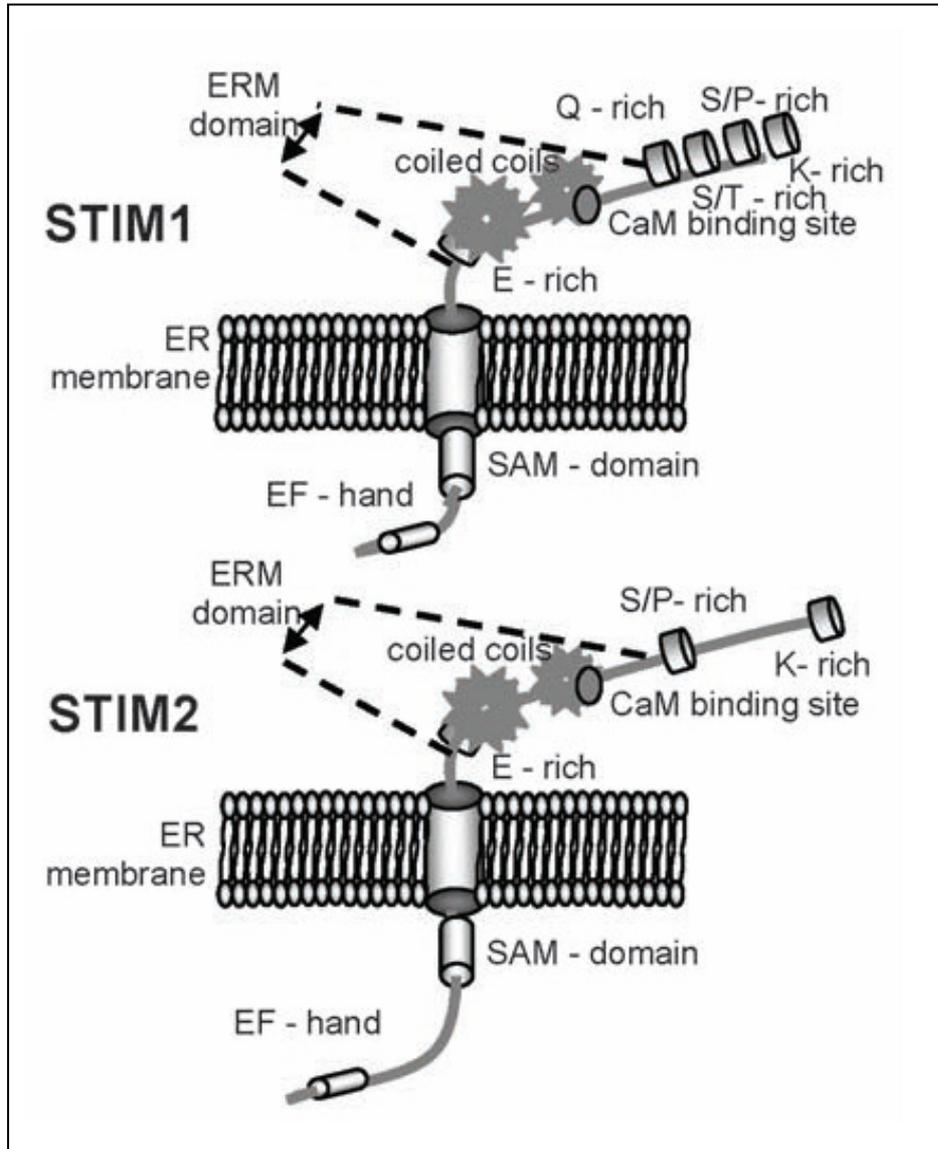


Fig. 24 : Structure moléculaire de STIM1 et STIM2.

- Domaine EF-hand en N-terminal : motif de liaison au calcium.
- Domaine SAM en N-terminal : « sterile-alpha motif ».
- Domaine transmembranaire.
- Domaine ERM-like « ezrin-radixin-moesin » en C-terminal : 2 motifs « coiled-coils » contenant un site de liaison à la calmoduline.
- Domaine C-terminal contenant des régions riches en acides aminés communs à STIM1 et STIM2 comme, la région riche en sérine-proline et la région riche en lysine mais il existe

également des régions présentes uniquement au niveau de STIM1 et riches en glutamate et sérine-thréonine.

(Modifiée à partir de : [Frischauf et al., 2008]).

En 2000, STIM1 fut caractérisée comme une phospho-protéine, avant même que sa localisation réticulaire fut connue. Elle est présente au niveau de la membrane plasmique de différents types cellulaires et les auteurs lui attribuèrent la fonction de suppresseur de tumeur [Manji *et al.*, 2000]. 5 ans plus tard, la localisation de STIM1 est devenue à la fois membranaire et réticulaire. Son rôle réticulaire fut mis à jour en proposant cette protéine comme un détecteur du calcium réticulaire [Liou *et al.*, 2005 ; Roos *et al.*, 2005]. En effet, la structure de STIM1 réticulaire présente différents domaines dont l'un, situé du côté luminal (N-terminal), contient un motif EF-hand. Ce motif est capable de chélater le calcium réticulaire et ainsi ressentir les variations de la concentration du calcium réticulaire. Outre ce motif, STIM1 possède un domaine SAM « sterile-alpha motif », en N-terminal, contenant 2 sites potentiels de glycosylation. Ce domaine est suivi par le domaine transmembranaire auquel succède, du côté C-terminal, un domaine ERM-like « ezrin-radixin-moesin » présentant 2 motifs « coiled-coils » et contenant un site de liaison à la calmoduline. Enfin, le côté C-terminal se termine par des régions riches en acides aminés tels que le glutamate, les sérine-proline, les sérine-thréonine et la lysine. Enfin, il existe dans la famille des STIM, une deuxième protéine appelée STIM2 et possédant 61 % d'homologie avec STIM1 [Williams *et al.*, 2001]. Cette différence est essentiellement au niveau C-terminal vu que STIM2, à la différence de STIM1, ne possède pas les régions riches en résidus glutamate et sérine-thréonine (pour revue : [Hewavitharana *et al.*, 2007]) (Fig. 24).

β- La structure des Orai

Les 3 membres de la famille Orai (Orai1, Orai2 et Orai3) possèdent quatre domaines transmembranaires. Ils forment des canaux présents au niveau de la membrane plasmique et sélectifs au calcium. Seul Orai1 présente, du côté cytosolique ou N-terminal, une région riche en deux acides aminés, la proline et l'arginine, le distinguant des 2 autres membres de cette famille [Vig *et al.*, 2006]. De plus, ce canal présente, au niveau de la boucle extracellulaire comprise entre les segments transmembranaires 3 et 4, un site de N-glycosylation [Feske *et al.*, 2006 ; Cahalan *et al.*, 2007]. Toutefois, cette glycosylation n'est pas essentielle pour sa fonction [Gwack *et al.*, 2007]. Enfin, ces trois canaux possèdent au niveau de leur N-terminal, un site de liaison à la calmoduline et au niveau de leur C-terminal un domaine de type « coiled-coils » (Fig. 25).

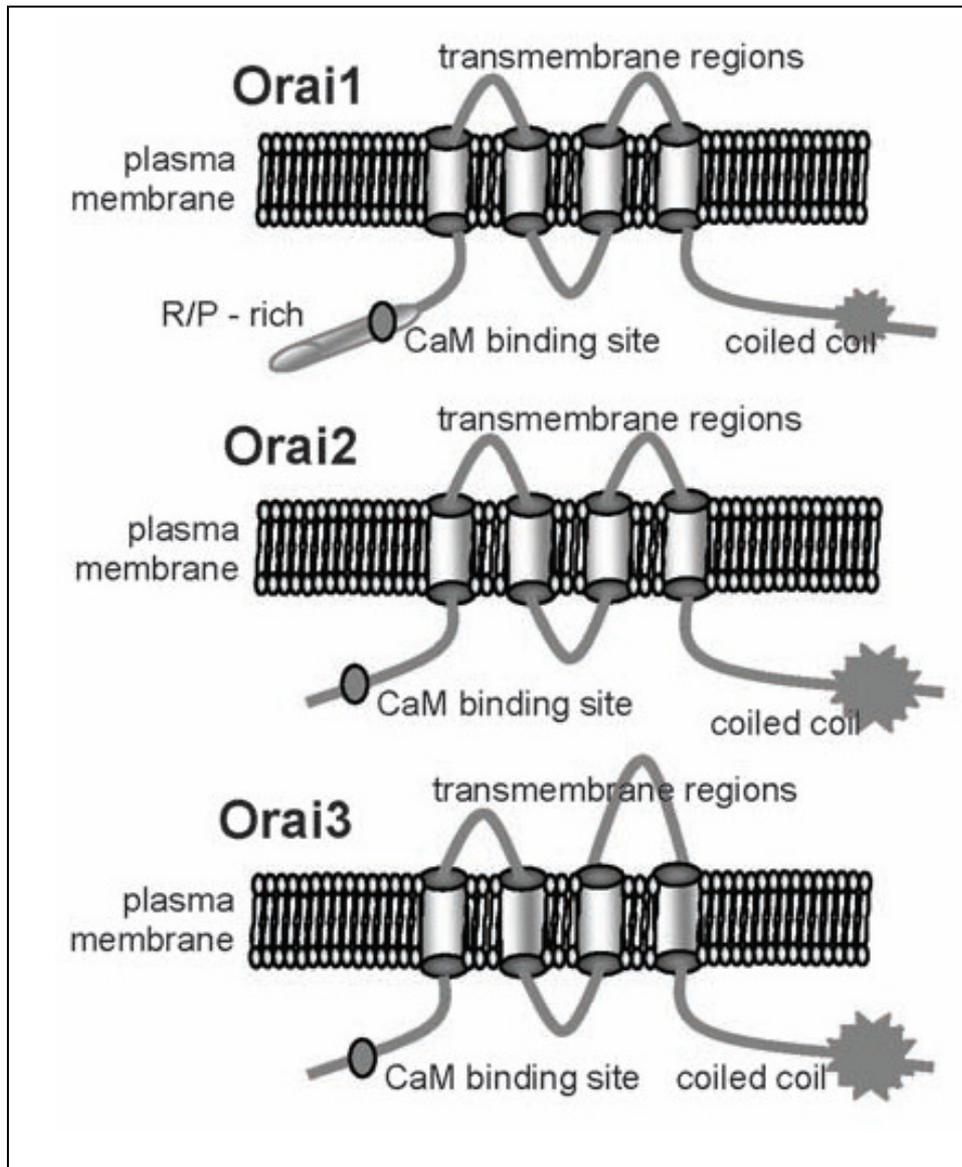


Fig. 25 : Structure moléculaire de Orai1, Orai2 et Orai3.

- Domaine de liaison à la calmoduline en N-terminal.
- Domaine transmembranaire.
- Domaine « coiled-coils » en C-terminal.
- Domaine contenant une région riche en sérine-proline présente uniquement chez Orai1.

(Modifiée à partir de : [Frischauf et al., 2008]).

γ - Les STIM et les Orai dans le SOC

Lorsque les protéines STIM1 détectent une diminution du calcium réticulaire, par le biais de leur EF-hand, elles se rassemblent pour former des « puncta » localisés à une distance de 15 à 20 nm de la membrane plasmique [Zhang et al., 2005 ; Baba et al., 2006 ; Luik et al., 2006]. Ces

« puncta » sont formés par des oligomères de STIM1 [Brandman *et al.*, 2007] et plus précisément par des tétramères de STIM1 [Luik *et al.*, 2008]. En effet, les tétramères de STIM1 colocalisent avec Orai1 [Luik *et al.*, 2006] formant ainsi un complexe, STIM1-Orai1, appelé CRAC et capable de faire entrer le calcium dans la cellule [Luik *et al.*, 2006]. Notons toutefois que ce processus est complètement réversible une fois les stocks remplis [Liou *et al.*, 2007 ; Muik *et al.*, 2008]. Cette interaction STIM1-Orai1 reste sujette à débat étant donné que certains laboratoires ont démontré que ces deux protéines co-immunoprécipitent [Peinelt *et al.*, 2006 ; Yeromin *et al.*, 2006] tandis que d'autres équipes n'ont pas détecté cette relation physique entre STIM1 et Orai1 [Gwack *et al.*, 2007]. Toutefois, Chiu *et al.* ont démontré, par la technique de FRET (Transfert Résonnant d'Énergie de Fluorescence), une relation physique entre STIM1 et Orai1 [Chiu *et al.*, 2008]. Cette liaison entre ces deux protéines semble se produire entre les côtés C-terminal de STIM1 et Orai1 (au niveau du domaine « coiled-coils ») [Muik *et al.*, 2008] et plus précisément au niveau d'un petit fragment (OASF, aa 233-450/474) présent au niveau C-terminal de STIM1 [Muik *et al.*, 2009]. Enfin, ce domaine C-terminal « coiled-coils » est présent également au niveau de Orai2 et Orai3 permettant ainsi à ces deux protéines une potentielle liaison avec STIM1.

Outre les homo-tétramères de STIM1, il peut exister des hétéro-tétramères avec STIM2 [Soboloff *et al.*, 2006 ; Dziadek and Johnstone, 2007]. De plus, STIM1 et STIM2 ne présentent pas la même affinité au calcium. En effet, le EF-hand de STIM2 lie le calcium avec 2 fois moins d'affinité que celui de STIM1 (EC_{50} pour STIM2 406 μ M et pour STIM1 210 μ M) [Brandman *et al.*, 2007]. Cette moindre sensibilité confère à STIM2 une activité basale partielle en absence de toute stimulation [Brandman *et al.*, 2007]. Cette propriété confère à STIM2 la capacité d'être à la fois activé par les deux modèles capacitif et non capacitif [Parvez *et al.*, 2008]. Récemment, Stathopoulos *et al.* ont mis en évidence une différence, entre STIM1 et STIM2, au niveau de la cinétique d'oligomérisation. En effet, STIM1 peut passer d'un état monomérique à un état tétramérique et réversiblement de STIM1 tétramérique à un état monomérique à une vitesse respectivement 70 fois et 3 fois supérieure à celle de STIM2 [Stathopoulos *et al.*, 2009]. Il est possible que cette différence puisse expliquer en partie la variabilité des réponses physiologiques suite à une même entrée calcique apparente.

Il est connu depuis 2006 [Peinelt *et al.*, 2006] que Orai1 peut former des dimères (voire des tétramères) avec différentes combinaisons possibles impliquant Orai1, Orai2 et Orai3 [Ambudkar and Ong, 2007 ; Gwack *et al.*, 2007 ; Penna *et al.*, 2008]. Récemment, une étude a démontré la formation d'un CRAC fonctionnel assemblé à partir de 4 sous-unités présentant ainsi un modèle tétramérique de Orai1 [Mignen *et al.*, 2008]. La majeure différence décrite entre ces 3 Orai est présente quant à elle au niveau du pore. En effet, Orai1 possède une sélectivité au

calcium supérieure à ces deux homologues et cette différence est due, entre autre, à la perte de 3 résidus aspartate pour Orai2 et Orai3 (remplacé par le glutamate pour Orai2 et la glutamine pour Orai3) et ces résidus sont impliqués dans la géométrie du filtre de sélectivité au calcium dans ces canaux [Peinelt *et al.*, 2006]. Toutefois, même si des différences structurales sont décrites pour ces 3 protéines, elles sont toutes les 3 capables de former, lorsqu'elles sont couplées à STIM1, un SOC fonctionnel avec une amplitude de courant 2 à 3 fois plus faible pour Orai2 et Orai3 par rapport à Orai1 [Mercer *et al.*, 2006 ; DeHaven *et al.*, 2007 ; Lis *et al.*, 2007].

δ- Les STIM et les Orai dans la physiopathologie

L'expression de STIM1 et STIM2 est ubiquitaire [Williams *et al.*, 2001 ; Gross *et al.*, 2007]. Globalement, cette répartition cellulaire et tissulaire est également valable pour Orai1 et Orai3 [Baba *et al.*, 2006 ; Gross *et al.*, 2007]. Par contre, Orai2 est présent majoritairement dans le cerveau [Gross *et al.*, 2007]. Dans ces différents types cellulaires, la diminution de l'expression (par des techniques telles que les siRNA) de l'une de ces 5 protéines affecte systématiquement le SOC [Liou *et al.*, 2005 ; Roos *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2005 ; Peinelt *et al.*, 2006 ; Soboloff *et al.*, 2006 ; Vig *et al.*, 2006 ; Oh-Hora *et al.*, 2008]. Une des conséquences pathologiques directe de l'absence du SOC est le syndrome SCID (Severe Combined Immunodeficiency : déficits immunitaires combinés sévères). Ce sont des maladies génétiques graves du système immunitaire. Elles sont caractérisées par un dysfonctionnement dans l'activation des lymphocytes T et B. Il a été démontré que dans ce syndrome, le courant CRAC est complètement absent des lymphocytes T [Feske *et al.*, 2005] et que le gène *orai1* est muté chez ces patients [Feske *et al.*, 2006]. Cette mutation entraîne le remplacement d'un résidu arginine par un résidu tryptophane entraînant un déficit du courant CRAC dans ces lymphocytes [Feske *et al.*, 2006]. Outre le SCID, il existe dans les mastocytes, provenant de souris déficientes en STIM1, une faible réponse à la stimulation par le FcεRI (récepteur aux IgG activé dans le cadre d'une réponse allergique ou suite à une agression parasitaire) et par suite une faible production de cytokines entraînant ainsi une altération de la réponse immunitaire globale [Baba *et al.*, 2008].

III.G) Interactions entre STIM1, Orai1 et certains TRPC

Comme déjà décrit, STIM1 et Orai1 en plus de certains TRPC (C1, C4, C5 et C6) sont impliqués dans le SOC. En effet, STIM1 interagirait avec TRPC1 et entraînerait l'activation de ce dernier [Huang *et al.*, 2006 ; Lopez *et al.*, 2006]. En plus, STIM1, Orai1 et TRPC1 sont capables de s'associer pour former un complexe fonctionnel [Ambudkar and Ong, 2007]. Zeng *et*

al. ont montré, en 2008, une liaison électrostatique directe entre des acides aminés (⁶³⁹DD⁶⁴⁰), chargés négativement, présents au niveau de TRPC1 et des acides aminés (⁶⁸⁴KK⁶⁸⁵), chargés positivement, présents au niveau de STIM1 [Zeng *et al.*, 2008]. Cette interaction électrostatique est retrouvée entre STIM1 et TRPC3 [Zeng *et al.*, 2008]. Cette même équipe a aussi démontré que ce mécanisme de liaison électrostatique n'est pas applicable à l'interaction STIM1-Orai1. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que TRPC1 peut co-immunoprécipiter, après stimulation par la thapsigargine, d'une part avec Orai1 et d'autre part avec STIM1 (via Orai1) [Huang *et al.*, 2006 ; Cheng *et al.*, 2008 ; Jardin *et al.*, 2008]. TRPC5, quant à lui, peut s'associer avec STIM1 et Orai1 pour former un canal fonctionnel perméable aux ions Sr²⁺ (un canal formé uniquement par STIM1 et Orai1 n'est pas perméable aux Sr²⁺) conduisant à la dégranulation des mastocytes murins dans le cadre d'une réponse allergique [Abdullaev *et al.*, 2008]. Enfin, il a également été démontré que TRPC3 et TRPC6 sont capables d'interagir physiquement et fonctionnellement avec Orai1 [Liao *et al.*, 2007].

III.H) *STIM, Orai et TRPC6 dans le cancer*

À l'origine, le gène *stim1* (11p15.5) fut découvert comme étant un suppresseur de tumeur [Berlin *et al.*, 1997] et il a été décrit, tout d'abord, comme étant impliqué dans la perte d'hétérozygotie (LOH : Loss Of Heterozygosity) dans les tumeurs de Wilms [Koufos *et al.*, 1989 ; Reeve *et al.*, 1989]. Ensuite, cette perte d'hétérozygotie fut décrite dans plusieurs autres tumeurs telles que : les rhabdomyosarcomes [Besnard-Guerin *et al.*, 1996], le cancer de la vessie [Shaw and Knowles, 1995], le cancer du sein [Winqvist *et al.*, 1995], le cancer des testicules [Lothe *et al.*, 1993], le cancer des ovaires [Weitzel *et al.*, 1994], le cancer des poumons [Bepler and Garcia-Blanco, 1994], le carcinome corticosurrénalien, et l'hépatoblastome [Byrne *et al.*, 1993]. En plus de la perte de l'hétérozygotie, ce suppresseur de tumeur fut associé à une diminution de la prolifération et à une augmentation de l'apoptose dans les rhabdomyosarcomes [Koi *et al.*, 1993 ; Sabbioni *et al.*, 1997 ; Sabbioni *et al.*, 1999 ; Manji *et al.*, 2000]. Outre son effet anti-prolifératif, une étude se basant sur des analyses génomiques par microarrays dans les glioblastomes multiformes montre la surexpression de différents gènes, dans le cadre de ce cancer, dont le gène *stim2* [Ruano *et al.*, 2006]. De façon contradictoire, Chiu *et al.* ont démontré en 2008, que la diminution de l'expression de STIM1 (dans le cadre du complexe STIM1-Orai1), par la technique des siRNA, aboli l'apoptose induite par les « Soft Substrates » dans les cellules épithéliales cervicales saines mais cette diminution d'expression ne présente aucun effet sur la viabilité des cellules épithéliales cervicales cancéreuses [Chiu *et al.*, 2008]. En 2009, yang *et al.* ont montré que la réduction de l'expression de Orai1 ou STIM1, par la technique des siARN,

réduit le développement de métastases suite à un développement du cancer du sein chez les souris [Yang *et al.*, 2009]. De plus, l'implication de STIM1, STIM2, Orai1 et TRPC6 fut démontrée, par la technique des siRNA, dans la prolifération des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) et des cellules endothéliales humaines de l'artère pulmonaire [Abdullaev *et al.*, 2008]. Enfin, TRPC6 est impliqué : dans la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses [Thebault *et al.*, 2006], et dans la prolifération des cellules épithéliales cancéreuses du sein [Guilbert *et al.*, 2008].

III.1) Les inhibiteurs du SOC et leur intérêt dans le cancer

Différents inhibiteurs du SOC sont proposés dans la littérature. Ces inhibiteurs peuvent être globalement divisés en deux catégories.

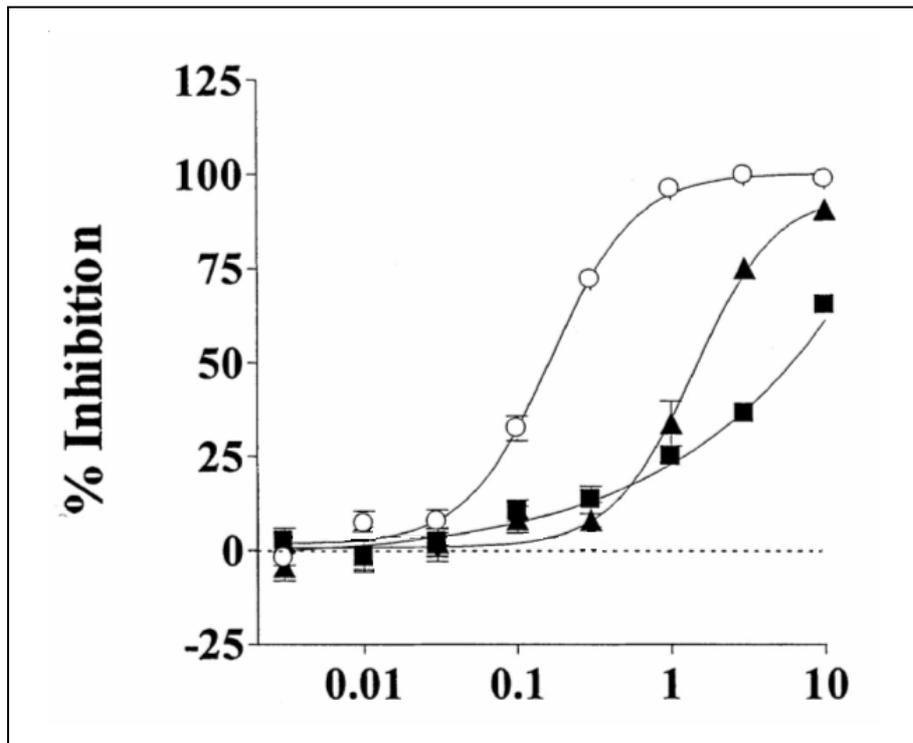


Fig. 26 : Effet de différentes drogues sur le SOC induit par 1 µM thapsigargine.

YM-58483 (○ 0.003–10 µM), econazole (▲ 0.003–10 µM) et SK&F-96365 (■ 0.003–10 µM).

(Modifiée à partir de : [Ishikawa *et al.*, 2003]).

La première inclut les cations divalents, comme le nickel Ni^{2+} (~ 0.5-3 mM) [Skryma *et al.*, 2000] ou trivalents comme le gadolinium Gd^{3+} (~ 0.1-1 µM) [Liu *et al.*, 2004], le lanthane La^{3+} (~ 1-10 µM) [Skryma *et al.*, 2000]. Toutefois, les cations di- ou tri-valents agissent, en

inhibant, indifféremment les canaux calciques par exemple le nickel inhibe les canaux calciques voltage dépendants [Gackiere *et al.*, 2006]. La seconde englobe une catégorie de molécules pouvant inhiber le SOC, de façon plus ou moins spécifique et selon le type cellulaire tels que : la wortmannine (~ 10 μM) [Flemming *et al.*, 2003], la capsaïcine (~ 100 μM) [Flemming *et al.*, 2003], le SK&F 96365 (1-(beta-[Merritt *et al.*]-4-methoxyphenethyl)-1H- imidazole hydrochloride) (IC_{50} ~ 10 μM : IC_{50} = concentration engendrant 50 % d'inhibition du courant) [Merritt *et al.*, 1990 ; Ishikawa *et al.*, 2003], l'econazole (antifongique de la famille des imidazolés) (IC_{50} ~ 1 μM) [Christian *et al.*, 1996 ; Ishikawa *et al.*, 2003], le YM-58483 (dérivé pyrazole) (IC_{50} ~ 0.2 μM) [Ishikawa *et al.*, 2003] (Fig. 26) et les dérivés 1,4-dihydropyridines (DHP) (~ 10 μM) [Harper *et al.*, 2003].

A part ces drogues, il existe 2 antagonistes : le 2-APB (2-aminoethoxydiphenylborate) (~ 10 - 100 μM) [Maruyama *et al.*, 1997 ; Bootman *et al.*, 2002] et le CAI (carboxyamido-triazole : anciennement appelé L651582) (~ 5 μM) [Alessandro *et al.*, 1996] capables non seulement d'inhiber le SOC mais également d'inhiber la prolifération de certaines lignées comme les hépatomes humains Huh-7 et HepG2 [Enfissi *et al.*, 2004] et les HEK-293 [Mignen *et al.*, 2005].

Le 2-APB a été montré à l'origine comme étant un inhibiteur des IP_3R (~ 1 - 100 μM) en plus de son action sur le SOC [Bootman *et al.*, 2002 ; Mackenzie *et al.*, 2002]. Récemment, Zhou *et al.* ont testé différents analogues du 2-APB et ils ont démontré que certains de ces analogues sont capables d'inhiber spécifiquement le SOC sans agir sur les IP_3R [Zhou *et al.*, 2007]. Toutefois, cet antagoniste du SOC présente des effets, positifs ou négatifs, sur des canaux calciques non impliqués dans le SOC. A titre indicatif, le 2-APB active une sous-famille des TRP (les TRPV), en particulier TRPV1, 2 et 3, avec une concentration minimale de 300 μM [Hu *et al.*, 2004] (pour revue : [Colton and Zhu, 2007]). A l'inverse, le 2-APB peut inhiber, à une concentration inférieure à 300 μM , TRPC6 et TRPM8 suite à une réponse induite respectivement par l'OAG et par le menthol [Hu *et al.*, 2004]. Enfin, une concentration de 2-APB inférieure ou égale à 50 μM peut activer, par l'intermédiaire de STIM2, une entrée de calcium transitoire indépendante de la vidange des stocks calciques réticulaires [Parvez *et al.*, 2008].

Le CAI quant à lui, possède également cette double action (inhibition du SOC et de la prolifération) sans l'effet sur les IP_3R . De ce fait, un intérêt thérapeutique anti-tumoral lui fut accordé. En effet, le CAI a été tout d'abord sujet à des essais cliniques (phase I) [Figg *et al.*, 1995 ; Berlin *et al.*, 1997 ; Kohn *et al.*, 1997 ; Kohn *et al.*, 2001 ; Berlin *et al.*, 2002 ; Desai *et al.*, 2004]. Ensuite, étant donné le potentiel que représentait cette drogue, des essais cliniques

(phase II) furent entamés [Hussain *et al.*, 2003 ; Dutcher *et al.*, 2005 ; Mikkelsen *et al.*, 2007]. Mais hélas, en 2008 un essai clinique (phase III) a démontré, chez des patients présentant un cancer du poumon (NSCLC) et qui ont déjà subi une chimiothérapie, que le traitement par le CAI (traitement oral journalier de CAI à 250mg) n'améliore ni les symptômes ni la qualité de vie de ces malades. De plus, ce traitement induit un nombre d'effets indésirables significativement supérieur au groupe placebo. Parmi ces effets on peut citer : les nausées, les vomissements, l'anorexie et l'ataxie [Johnson *et al.*, 2008]. Enfin, Mignen et Capiod ont montré que le CAI peut altérer le potentiel mitochondrial et donc inhiber la fonction mitochondriale. De ce fait, le rôle de tampon calcique, qu'exerçaient les mitochondries, sera aboli conduisant à une augmentation du calcium cytosolique et inhibant par suite le SOC [Mignen *et al.*, 2005].

De ce fait, l'utilisation de ces molécules comme antagonistes du SOC, pour bloquer la prolifération dans un cadre thérapeutique anti-tumoral, reste une voie restreinte à l'heure actuelle. Par la suite, de nouvelles molécules, stratégies et cibles thérapeutiques doivent être mises en évidence pour une meilleure prise en charge de cette pathologie : le cancer.

Problématique et objectifs

La tumeur maligne primitive du foie la plus fréquente est le carcinome hépatocellulaire (CHC). Le CHC survient dans 90 % des cas sur un foie cirrhotique et son étiologie est variée : il survient consécutivement à une maladie chronique dont l'origine peut être virale (virus des hépatites C ou B), toxique (alcool) ou génétique (hémochromatose). Lors d'une cirrhose due au virus de l'hépatite B, le CHC survient dans environ 30 % des cas et il se développe 20 à 40 ans après la contamination. Dans le cas d'une cirrhose due au virus C, le carcinome survient environ dans les mêmes proportions et il se développe généralement 5 à 10 ans après la mise en place de la cirrhose.

L'altération de l'homéostasie calcique est une des conséquences de la cancérogenèse hépatique. Par exemple, un recapture déficiente du calcium par le réticulum endoplasmique résultant d'un dysfonctionnement des pompes SERCA provoque la prolifération hépatocytaire et l'apparition d'hépatocarcinome à la suite d'une infection par l'hépatite B [Chami *et al.*, 2000 ; Chami *et al.*, 2001].

L'homéostasie calcique est sous le contrôle de plusieurs acteurs, pompes, tampons, échangeurs et canaux ioniques. Dans ce mémoire, nous nous sommes focalisés sur les canaux calciques et le but principal de notre projet a été de relier l'expression de certains canaux de la famille des TRP (transient receptor potential) à la prolifération cellulaire, en particulier dans le foie humain.

Chez les mammifères, un certain nombre de TRP sont impliqués dans les entrées calciques résultant de la stimulation des cellules par les hormones et les facteurs de croissance. La sous-famille TRPC forme probablement la base moléculaire de 2 voies d'entrée calcique : entrée capacitative (CCE) et non capacitative (NCCE). De plus, des travaux récents ont montré que les TRPC forment des complexes avec d'autres protéines comme STIM1 et Orai1 [Roos *et al.*, 2005 ; Feske *et al.*, 2006]. Les cellules humaines expriment 6 membres des TRPC et il est généralement admis que TRPC1, TRPC4 et TRPC5 sont associés à la SOCE tandis que TRPC3, TRPC6 et TRPC7 le sont à la NCCE [Ambudkar, 2006]. Cependant, selon les tissus et le niveau d'expression, TRPC6 semblent être impliqué dans une des 2 voies d'entrée calcique [Yu *et al.*, 2003 ; Dietrich *et al.*, 2005]. La CCE et la NCCE sont impliquées dans la réponse calcique soutenue jouant un rôle primordial dans d'importantes réponses physiologiques telles que la prolifération, l'apoptose et la différenciation (pour revue : [Berridge *et al.*, 2000]). Cependant, il est clair que la CCE est l'acteur principal rendant compte de l'activation de ces réponses

physiologiques et par exemple, TRPC1 et TRPC6 sont associées à la prolifération cellulaire dans de nombreux tissus [Golovina, 1999 ; Yu *et al.*, 2004].

De ce fait, le premier objectif de cette thèse a consisté à établir le profil d'expression des TRPC dans les hépatomes humains, le foie tumoral et les hépatocytes sains, afin de mettre en évidence des cibles potentiellement impliquées dans la prolifération hépatique.

Le second objectif était de vérifier l'expression de ces cibles au niveau des coupes de tissus hépatique sains ou cancéreux après validation des anticorps appropriés.

Le troisième objectif a été de déterminer l'implication du ou des TRPC d'intérêt dans la CCE et la prolifération des Huh-7 en relation avec leur modulation par des facteurs de croissance.

Dans le quatrième objectif je me suis intéressé à l'implication de protéines autres que les TRPC telles que STIM1, STIM2 et Orai1, dans la CCE des Huh-7 et des HEK293.

Une fois ces données établies, l'objectif suivant fut de déterminer l'impact qu'exercent ces différents candidats, impliqués dans une entrée calcique, sur les protéines du cycle cellulaire et à l'inverse l'impact qu'aurait un blocage du cycle cellulaire, au niveau de différentes phases, sur cette entrée calcique et ses acteurs.

Mon travail de thèse a donc consisté à étudier le rôle de ces canaux calciques présents au niveau de la membrane plasmique et, en particulier, leur implication dans l'homéostasie calcique via l'entrée calcique capacitive, conduisant à la prolifération des cellules et intervenant dans la physiopathologie hépatique.

La présentation des résultats obtenus au cours de mes 4 années de thèse se fera sous forme d'articles scientifiques (dont un publié et un soumis) en plus de certains résultats supplémentaires (article en préparation).

Matériels et méthodes

Pendant ces 4 années de formation, j'ai acquis différentes compétences dont : la culture cellulaire, l'imagerie calcique, la biologie cellulaire (biochimie) et l'électrophysiologie. Je me limiterai, dans ce chapitre, à la présentation des techniques que j'ai moi-même utilisées. Concernant les expérimentations impliquant des techniques nécessitant la biologie moléculaire (telles que : la synthèse des plasmides, les extractions d'ARNm sur cellules ou tissus, les PCR semi-quantitatives et les PCR en temps réel (qPCR)), elles furent effectuées en collaboration avec le Dr. Bidaux et Mr. Delcourt. Enfin, l'utilisation de la technique d'imagerie confocale fut en collaboration avec le Dr. Slommiany et le Dr. Bidaux.

I) La culture cellulaire

I.A) Lignée d'hépatomes humains : Huh-7

Pour mener à bien ce travail, j'ai eu recours à la lignée d'hépatomes humains Huh-7 [Nakabayashi *et al.*, 1982] fournie par le Dr. Doris Cassio de l'INSERM U442 à Orsay. C'est une lignée dérivée d'un carcinome hépatocellulaire d'un patient mâle japonais de 57 ans [Nakabayashi *et al.*, 1982] (Fig. 27).

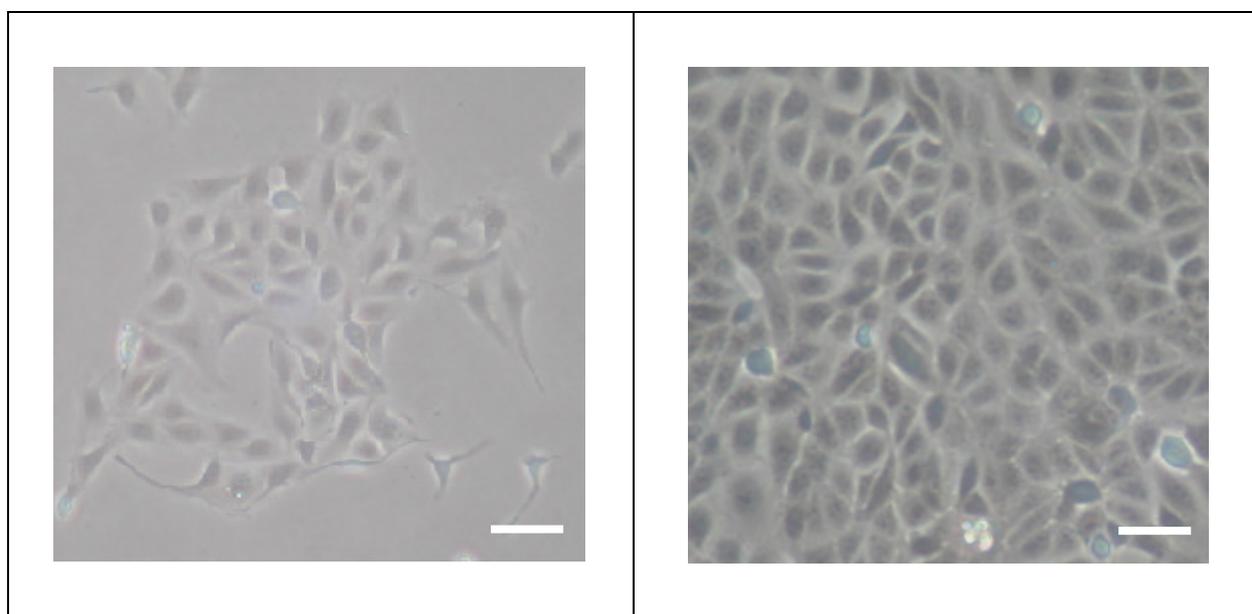


Fig. 27 : Morphologie des Huh-7 (objectif 20x). Barre, 10 μ M.

A gauche : Huh-7 à ~ 30 % de confluence.

A droite : Huh-7 à ~ 100 % de confluence.

I.B) Lignée HEK293

La lignée HEK293 (Human Embryonic Kidney) est une lignée de cellules humaines provenant de cellules embryonnaires de rein. C'est une lignée dont l'utilisation est très répandue dans le monde scientifique vu que les cellules présentent une croissance rapide et une facilité à être transfectées avec divers agents. Cette lignée n'est pas issue d'un cancer mais de cellules embryonnaires de rein d'un fœtus sain (suite à un avortement). Ces cellules furent transformées ensuite par un adénovirus, de type 5, inséré au niveau du chromosome 19 [Graham *et al.*, 1977 ; Louis *et al.*, 1997].

La lignée HEKm3, utilisée dans le cadre de cette étude, (Fig. 28) fut obtenue à partir de la lignée HEK293 par transfection stable du récepteur muscarinique m3 (fournie par le Dr. Craig Logsdon de l'université du Michigan aux Etats-Unis) [Yang *et al.*, 1995].

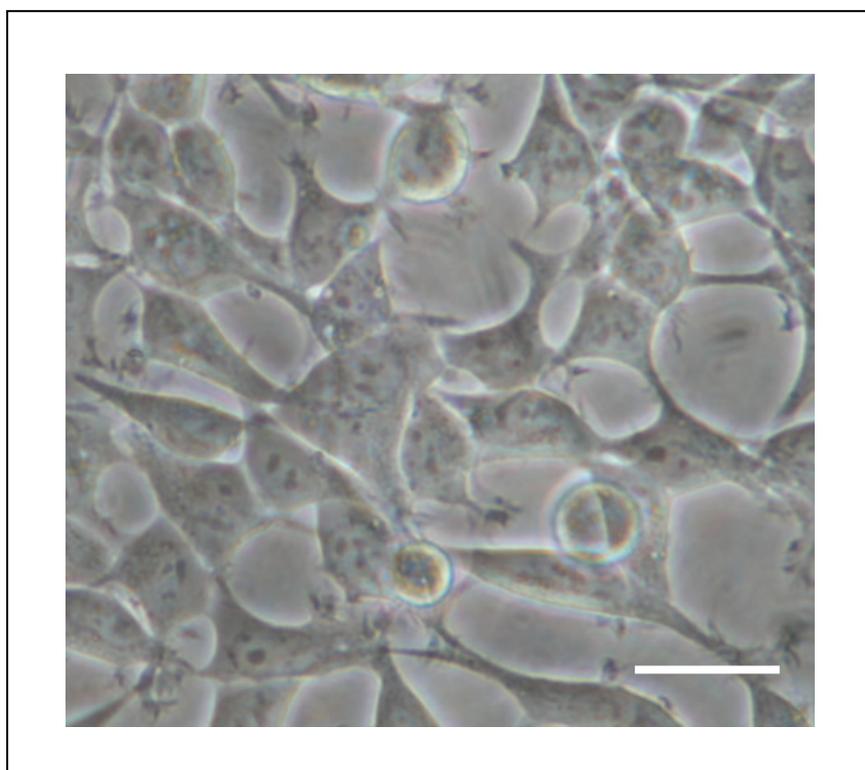


Fig. 28 : Morphologie des HEKm3 (objectif 40x). Barre, 5 μ M.

HEKm3 à ~ 70 % de confluence.

I.C) Conditions de culture des lignées cellulaires

Les lignées Huh-7 et HEKm3 sont entretenues dans du milieu D-MEM (Dulbecco) contenant du GlutaMAX I (L-alanyl-L-glutamine) (Invitrogen, France) complété avec les antibiotiques pénicilline et streptomycine, pour des concentrations finales respectives de 100

U/ml et 100 µg/ml (Invitrogen, France) et par du sérum de veau foetal (SVF) utilisé à 10 % (Invitrogen, France).

Les cellules sont placées dans un incubateur à 37 °C dont l'atmosphère est humidifiée et enrichie à 5 % de CO₂. Lorsque les cellules sont confluentes, à environ 80 %, elles sont décollées par une brève trypsinisation (trypsine-EDTA, Invitrogen, France). L'effet de la trypsine est ensuite inhibé par rajout du milieu de culture complet et les cellules sont alors centrifugées à 160 g pendant 1 minute puis remises en suspension. Les lignées sont réensemencées dans de nouveaux flacons de culture à raison d'environ 4000 cellules/cm². Le milieu est renouvelé le lendemain de l'ensemencement puis tous les 2 jours. Enfin, pour éviter une dérive génétique, nous effectuons au plus une vingtaine de passages successifs avant de décongeler une nouvelle ampoule de cellules « fraîches ».

Pour les expériences en imagerie calcique et en électrophysiologie, les boîtes de culture à fond de verre (Bioptechs, Butler, PA, USA) de 22 mm de diamètre ont été utilisées. Ces boîtes sont préalablement traitées par une solution de collagène de type I à 20 mg/L (Upsate, Charlottesville, USA) pendant 15 minutes. La solution de collagène est ensuite éliminée et les cellules sontensemencées à raison de 7000 cellules par boîte de culture. Les cellules sont placées dans un incubateur à 37 °C dont l'atmosphère est humidifiée et enrichie à 5 % de CO₂.

I.D) Cultures primaires d'hépatocytes humains sains

Les hépatocytes humains sains fraîchement dissociés, ainsi que les milieux conditionnés adaptés à l'ensemencement et la culture à court terme de ces cellules, nous ont été fournis par Biopredic International (RENNES - FRANCE).

A la réception, les hépatocytes, décantés dans une ampoule de 2 ml, ainsi que les milieux sont conservés à 4 °C (sur la glace). Ces cellules sont remises en suspension et homogénéisées par une légère agitation manuelle. Ensuite, 7 ml de milieu d'ensemencement sont ajoutés et le tout centrifugé, à 160 g pendant 1 minute dans des tubes de 10 ml à fond arrondi. Les cellules sont remises en suspension et un test de viabilité, le bleu de trypan (voir section VIII.A : test de viabilité) (Fig. 29), est effectué pour estimer la viabilité cellulaire. Dans la majeure partie des prélèvements, la viabilité était supérieure à 75 %. Les hépatocytes sont par suite comptés et ensemencés à confluence, faute de quoi une apoptose massive sera observée (à une densité de 100000 cellules par cm²). Les cellules sont gardées dans un incubateur à 37 °C dont l'atmosphère est humidifiée et enrichie à 5 % de CO₂. Enfin, après 24 heures d'ensemencement, le milieu d'ensemencement est remplacé par le milieu d'incubation à court terme qui sera changé chaque 24 heures. Ce milieu d'incubation est un « Williams' Medium E » contenant du GlutaMAX I (L-

alanyl-L-glutamine) (Invitrogen, France) complété avec les antibiotiques pénicilline et streptomycine, pour des concentrations finales respectives de 100 U/ml et 100 µg/ml (Invitrogen, France). Ce milieu contient également de l'insuline bovine à 4 µg/ml et de l'hydrocortisone hemisuccinate à 5×10^{-5} M. Ce milieu, à la différence du milieu d'ensemencement ne contient pas de sérum de veau foetal.

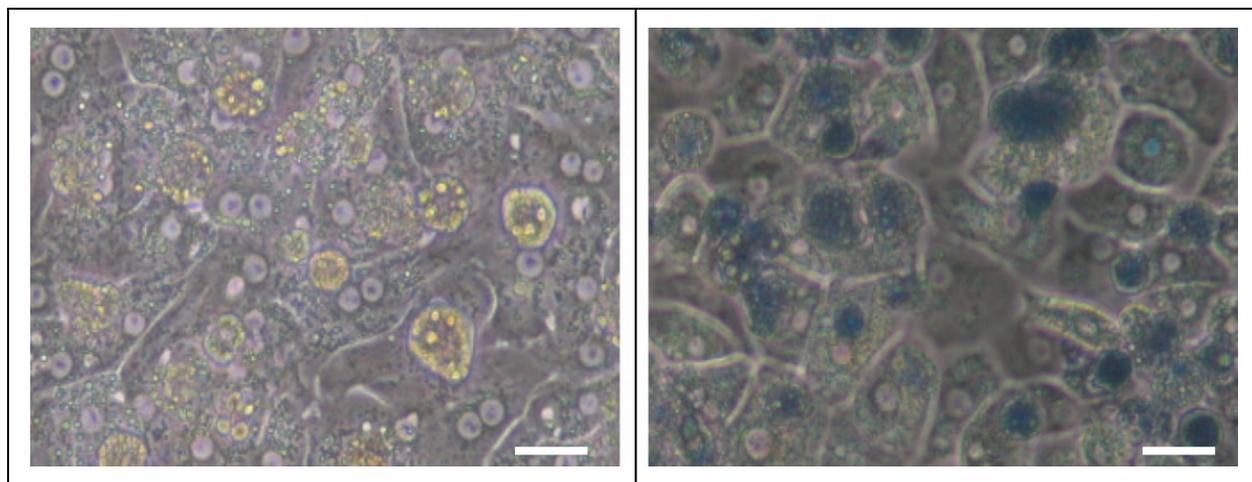


Fig. 29 : Morphologie des hépatocytes humains après 24 heures d'ensemencement (objectif 40x).

A gauche : hépatocytes humains sans coloration au bleu de trypan.

A droite : hépatocytes humains avec coloration au bleu de trypan.

Barre, 10 µm.

II) La transfection

La transfection est le processus de transfert d'ADN ou d'ARN exogène dans des cellules eucaryotes. Il existe différentes méthodes pour introduire ces éléments exogènes dans une cellule. La plus classique et la moins chère, mais aussi la moins fiable, est la transfection par des précipités de phosphate de calcium. Récemment, des techniques de transfection par des liposomes appelées lipofections (micelles lipidiques possédant des propriétés structurales analogues à celles des membranes cellulaires) se sont multipliées. En plus, il existe des transfection par électroporation (choc électrique) ou par choc thermique. Ces 2 dernières techniques ont pour finalité la création d'ouvertures transitoires, des « trous », dans les cellules pour permettre l'entrée de molécules extracellulaires, comme un plasmide d'ADN, un siRNA...

II.A) Transfection transitoire des siRNA par lipofection

48 heures après ensemencement, les Huh-7 sont transfectées à l'aide du kit « jetSI™-ENDO » (Polyplus-transfection SA, FRANCE) et les HEK293T à l'aide du kit « HiPerFect » (QIAGEN, France) selon les recommandations des fournisseurs. Pour optimiser le rendement de la transfection des Huh-7, celle-ci est réalisée dans du milieu sans sérum et 12 heures après la transfection du milieu complet, 20 % SVF est rajouté afin d'obtenir une concentration finale en SVF de 10 %. Quelle que soit la transfection, 24 heures après, le milieu est renouvelé et remplacé par du milieu complet 10 % SVF. Les mesures en imagerie calcique et en patch-clamp ainsi que les extractions protéiques sont réalisées 72 heures après la transfection des cellules par les siRNA (Fig. 30).

<i>nom</i>	<i>Séquence ciblée 5' – 3'</i>
<i>simTRPC6 (siCTRL)</i>	<i>UAUUGCCGAGACCGUUCAU (dTdT)</i>
<i>sihTRPC6</i>	<i>UUGAACGGCCUCAUGAUUA (dTdT)</i>
<i>siLuciférase (siCTRL)</i>	<i>CUUACGCUGAGUACUUCGA (dTdT)</i>
<i>siSTIM1</i>	<i>GGCUCUGGAUACAGUGCUC (dTdT)</i>
<i>siSTIM2</i>	<i>AACTGAGAAGCAGTTGGTCTG (dTdT)</i>
<i>siOrail</i>	<i>UGAGCAACGUGCACAAUCU (dTdT)</i>

Fig. 30 : Tableau récapitulatif des séquences de différents siRNA.

Ces siRNA sont synthétisés par la société Dharmacon (France).

II.B) Transfection transitoire de hTRPC6 par nucleofection

Les Huh-7 sont transfectées par le plasmique hTRPC6 (hTRPC6-pcDNA3) ou le plasmique contrôle (pcDNA3) à l'aide du « nucleofector » (électroporateur), selon les recommandations du fournisseur (Amaxa GmbH, Köln, Allemagne). Les mesures en imagerie calcique ainsi que les extractions protéiques sont réalisées 48 heures après transfection.

II.C) Création de lignées stables

Différents clones stables ont été obtenus par transfection des Huh-7 avec un vecteur encodant soit la protéine humaine TRPC6 soit la protéine de fusion hTRPC6-eGFP soit le «

short hairpin RNA » dirigé contre hTRPC6 (shTRPC6). Pour cela la technique de nucleofection a été utilisée selon la recommandation du fabricant (Amaza GmbH, Köln, Allemagne). Brièvement, après décollement par la trypsine, 3 µg de vecteur sont transfectés dans 2×10^6 cellules qui seront ensemencées dans des plaques 24 puits à très faible densité. Les clones surexprimant hTRPC6 ou hTRPC6-eGFP et les clones où l'expression de TRPC6 est diminuée (shTRPC6) sont sélectionnés selon leur résistance à l'antibiotique de sélection.

III) La microscopie à lumière transmise

Les images réalisées en lumière transmise ont été prises par un appareil photographique numérique monté sur microscope inversé (Nikon TS100) doté d'objectifs de 10, 20 et 40x.

IV) L'imagerie calcique

Pour observer spécifiquement l'entrée capacitive dans les Huh-7 et les HEK293, un protocole rigoureux a été mis au point.

IV.A) Mode opératoire

Les cellules, préalablement cultivées dans du milieu complet, sont chargées avec 4 µM de Fura2/AM (Molecular Probes, Leiden, Pays-Bas) pendant 45 minutes à 37 °C au noir. Elles sont ensuite rincées dans du milieu d'enregistrement contenant : 116 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 1.8 mM de CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 5 mM NaHCO₃, 1 mM NaH₂PO₄, 20 mM HEPES, pH 7.3. Les cellules sont maintenues à 37 °C dans les boîtes de culture grâce à une platine chauffante (Bioptechs, USA), au dessus d'un objectif de fluorescence 40x, à huile et doté d'une bague de chauffage (Bioptechs, USA). De plus, les solutions contrôles ou tests sont conservées à 37 °C dans un système de perfusion PTR 200 (ALA Scientific Instruments, Westbury, NY, USA).

Pendant 2 minutes, les cellules sont rincées par du milieu d'enregistrement complété avec 100 µM d'EGTA (Sigma Aldrich, France) et ne contenant pas de CaCl₂. Ensuite, les cellules sont à nouveau baignées dans la solution d'enregistrement contenant du CaCl₂ à 2 mM. Quelques dizaines de secondes en présence de Ca²⁺ dans le milieu extracellulaire, les cellules sont perfusées avec du milieu d'enregistrement sans CaCl₂ contenant de la TG (la thapsigargine) à 1 µM (Alomone Labs). Cette drogue provoque une vidange des réserves calciques intracellulaires en bloquant les pompes SERCA. Deux minutes après l'ajout de la TG, les cellules sont à nouveau perfusées avec du milieu contenant du CaCl₂ à 2 mM. Les variations de la

concentration calcique cytosolique suivies grâce à l'utilisation d'une sonde spécifique, le Fura2, sont représentées schématiquement (Fig. 31).

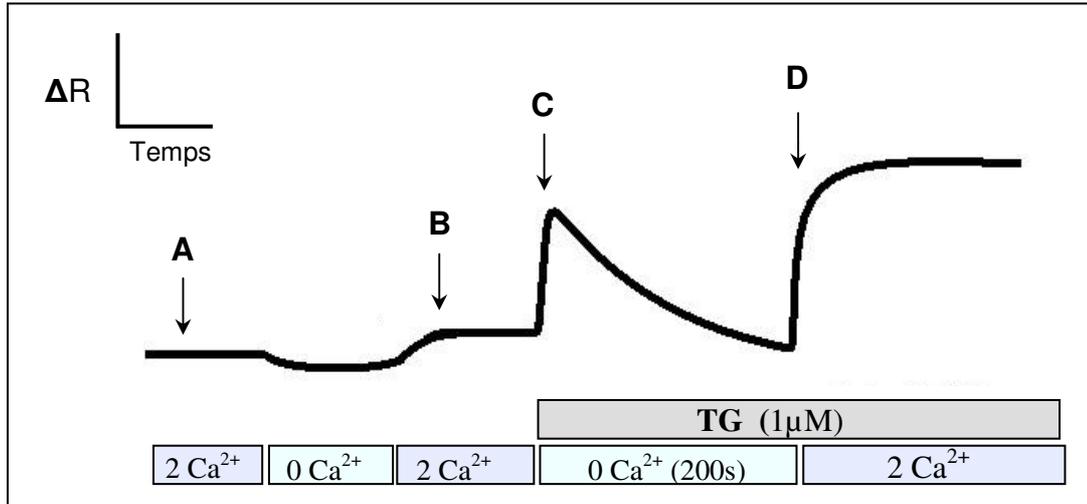


Fig. 31 : Variations du ΔR (reflet des variations de la concentration calcique cytosolique) en fonction du temps permettant l'observation de l'entrée capacitive.

IV.B) Sonde calcique Fura2

La sonde calcique Fura2 permet de suivre les variations de la concentration cytosolique en calcium libre, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, grâce à l'émission de lumière à 510 nm après excitation à 340 et 380 nm. Brièvement, lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ augmente, la lumière émise par la sonde fluorescence après excitation à 340 nm augmente tandis que celle émise après excitation à 380 nm diminue. Le rapport des intensités de lumières émises après excitation à 340 et 380 nm permet d'estimer les variations de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ dans la cellule.

IV.C) Acquisition et traitement d'images

La lumière d'excitation provient d'une lampe arc Xénon de 100W à haute pression et les longueurs d'ondes d'excitation de la sonde fluorescente pour le calcium à 340 et 380 nm sont sélectionnées par un monochromateur (Cairn Research Ltd, Faversham, Kent, UK). Un filtre passe-haut à 470 nm permet de collecter la lumière émise par la sonde excitée. Les images de fluorescence sont collectées toutes les 2 secondes par une caméra CCD Sensicam QE (PCO Computer Optics GmbH, Kelheim, Allemagne), digitalisées et intégrées en temps réel par un processeur d'images (Metafluor, Princeton, NJ, USA) (Fig. 32). Les images de bruit de fond à 340 et 380 nm sont collectées simultanément et soustraites respectivement des images de fluorescence.

Les résultats (ΔR) sont exprimés sous forme de rapport des signaux de fluorescence obtenus après excitation de la sonde à 340 nm et 380 nm pendant une réponse. Les variations du ΔR reflètent les variations de la concentration calcique cytosolique (Fig. 32).

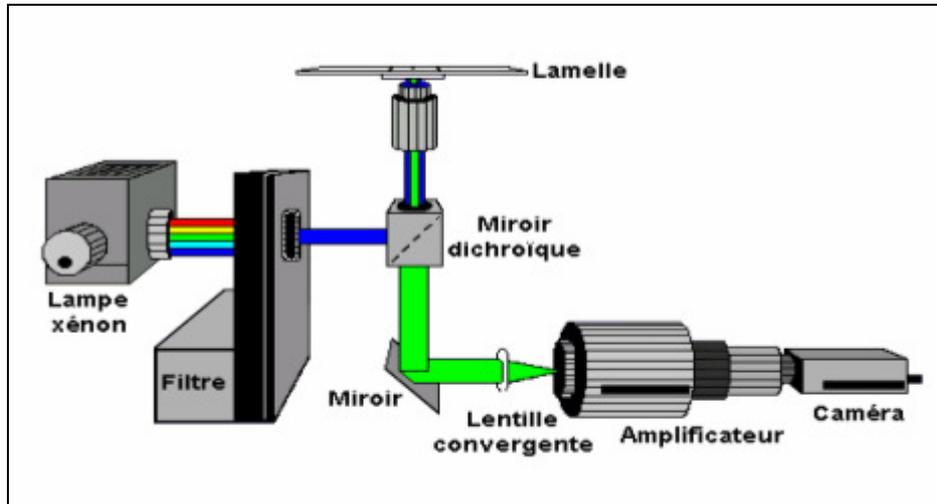


Fig. 32 : Schéma simplifié d'un poste d'imagerie.

Le $\Delta R/R$ permet de visualiser l'entrée capacitive. Il correspond à la différence des rapports de fluorescence 340/380, au point D (entrée de calcium extracellulaire) et au point B (entrée calcique non spécifique), divisée par le rapport de fluorescence obtenu au repos avant l'addition de la TG, au point A. Le point C correspond à l'élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ engendrée par l'addition de la TG à 1 μM .

$$\frac{(\Delta R)}{R} = \frac{(\text{fluo D } 340/380) - (\text{fluo A } 340/380)}{(\text{fluo A } 340/380)} - \frac{(\text{fluo B } 340/380) - (\text{fluo A } 340/380)}{(\text{fluo A } 340/380)}$$

V) La microscopie confocale.

Grâce au microscope confocal, il est possible de réaliser des séries images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». La reconstitution, par des logiciels d'imagerie, de ces images permet une visualisation tridimensionnelle de l'objet observé. Quand la source lumineuse est un laser, on parle de microscopie confocale à balayage laser (CLSM pour confocal laser scanning microscope). A la différence de la microscopie à fluorescence conventionnelle, la microscopie confocale présente une très haute résolution spatio-temporelle. Cette propriété est due à l'utilisation de filtres spatiaux appelés « pinholes » qui sont capables d'éliminer les rayons lumineux émis en dehors du plan focal.

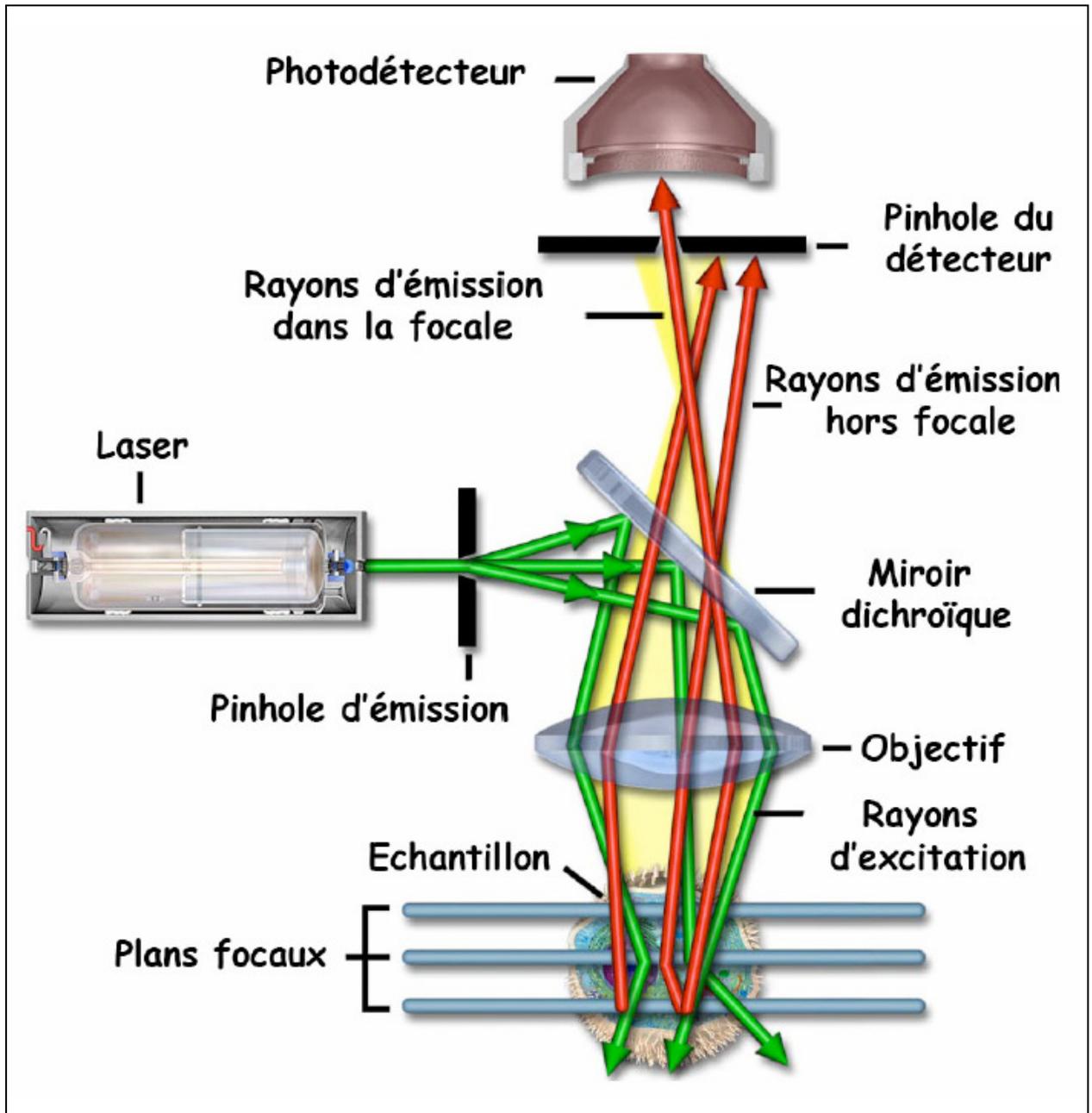


Fig. 33 : Principaux composants d'un microscope confocal et représentation schématique du trajet optique depuis l'excitation par le laser jusqu'à l'émission captée par le photodétecteur. (Modifiée à partir de : <http://www.microscopyu.com/articles/confocal/images/confocal1figure1.jpg>).

Pour cette étude, un microscope confocal inversé Zeiss LSM 510 a été utilisé. Ce dernier est doté d'un objectif à immersion 40x (ouverture numérique : 1.3 ; résolution max à 488 nm : 229 nm) et 60x (ouverture numérique : 1.4 ; résolution max à 488 nm : 212 nm) associé à une unité contrôlant les lasers. Les fluorochromes verts sont excités par un laser argon (488 nm) alors que les rouges le sont par un laser hélium-néon (546 nm) dont la lumière est transmise à l'échantillon *via* une fibre optique et un miroir dichroïque. La fluorescence émise est ensuite

reçue au niveau du photodétecteur et les signaux sont alors traités par un logiciel spécifique (AIM 3.2) (Fig. 33).

VI) Le patch-clamp

Les expériences d'électrophysiologie sont réalisées à l'aide de la technique de patch-clamp. Cette technique permet l'enregistrement des courants ioniques transitant à travers les membranes cellulaires. Elle consiste à mettre une micro-pipette en verre en contact avec la membrane d'une cellule vivante isolée (Fig. 34). Le diamètre de contact de la pipette avec la cellule est de l'ordre de $1\ \mu\text{m}$ et le flux du courant est rendu possible grâce à une solution ionique intra-pipette de composition définie.

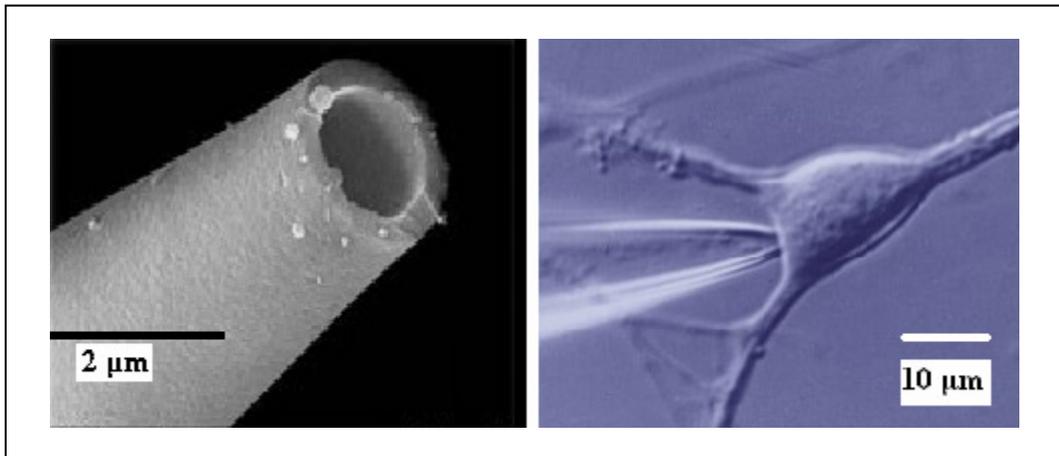


Fig. 34 : A gauche : photographie de la pointe d'une micro-pipette de patch en verre.

(Modifiée à partir de :

http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/8/89/Patch_pipette.jpg).

A droite : contact étanche (« giga-seal ») entre une micro-pipette et un neurone.

(Modifiée à partir de :

<http://www.digitimer.com/research/pipette/images/pull.jpg>).

La technique de patch-clamp offre plusieurs configurations grâce auxquelles il est possible d'enregistrer : l'activité d'un seul canal ionique (activité unitaire) « inside-out, outside-out et cellule attachée », ou l'activité globale de tous les canaux présents au niveau de la membrane plasmique cette configuration est appelée « cellule entière » (Fig. 35).

Pour cette étude, seule la configuration « cellule entière » fut utilisée et les pipettes (en borosilicate ; Hirschmann laborgerate), étirées avec un « Pipette puller P-97 » (Sutter instrument co.), avaient une résistance qui variait entre 3 et 5 Giga Ω .

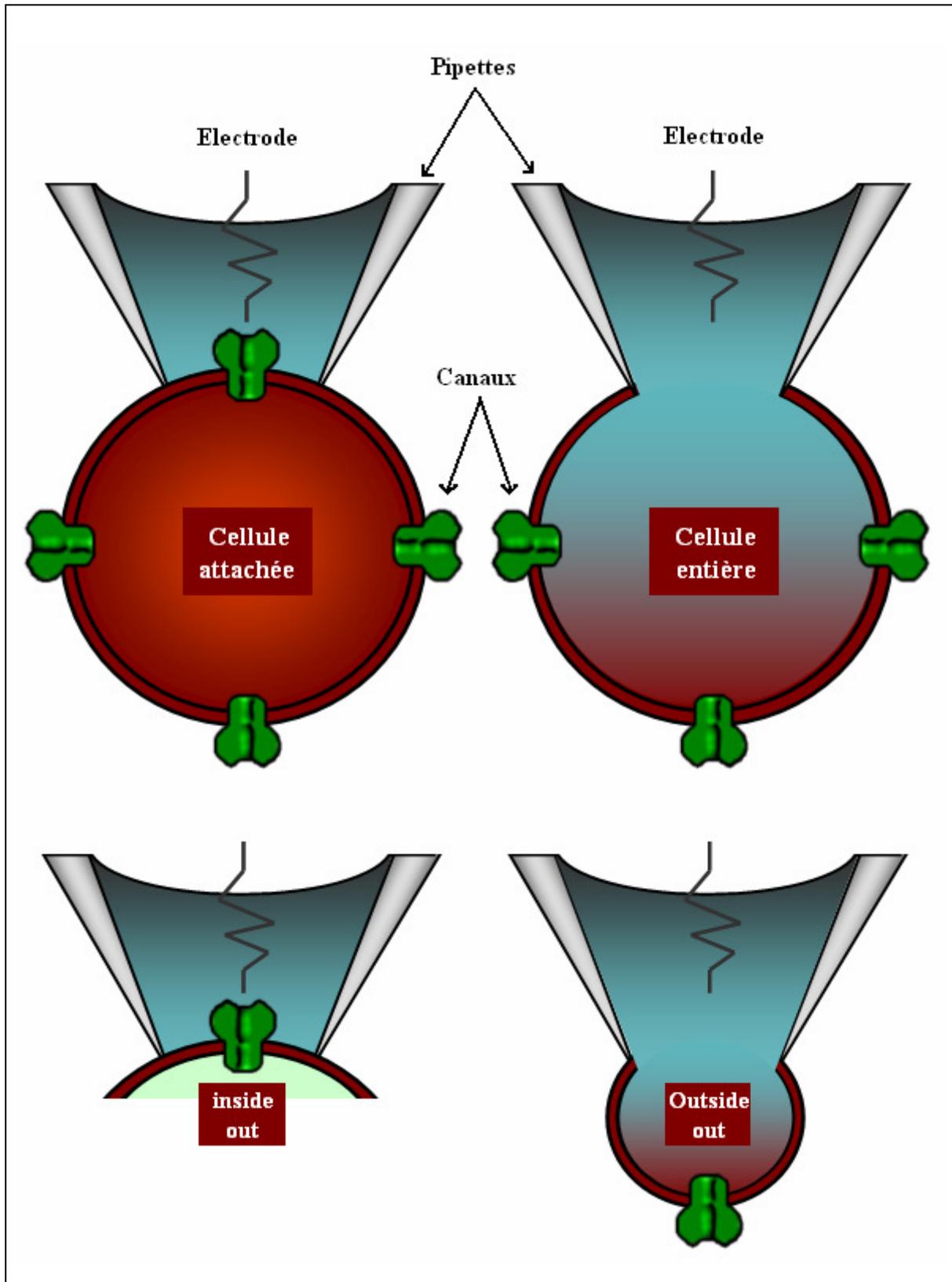


Fig. 35 : Schéma présentant les différentes configurations possibles, permettant la mesure unitaire ou globale du courant, obtenues par la technique de patch-clamp.

Le courant SOC fut enregistré, dans les HEK293, toutes les 2 secondes à une température de 37 °C et à un potentiel de -100 mV (à partir d'une rampe allant de -100 mV à +60 mV). Les courants sont amplifiés par un « Axopatch 200B amplifieur » ensuite, les données sont digitalisées par un « Digidata 1322A » et enregistrées par un logiciel appelé « PCLAMP-software » (Axon Instruments).

Pour ces enregistrements une solution extracellulaire et une solution intracellulaire furent utilisées :

- La solution extracellulaire est composée de : 116 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5.6 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂ et 10 mM CaCl₂ (le pH est ajusté à 7.3 par le TEA-OH et l'osmolarité, si nécessaire, est ramenée à 320 mOsm/l par le d-mannitol).

- La solution intracellulaire est composée de : 120 mM CsMet, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, and 10 mM BAPTA (1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane N,N,N',N'-tetraacetic acid) (le pH est ajusté à 7.3 par le CsOH et l'osmolarité, si nécessaire, est ramenée à 295 mOsm/l par le d-mannitol).

10 mM de BAPTA et/ou 1 µM d'Adénophostine A (analogue de l'IP₃) furent utilisés pour vidanger le réticulum endoplasmique et induire le courant SOC.

Enfin, la capacité membranaire fut automatiquement calculée par le logiciel « PCLAMP-software ».

VII) L'immunodétection

VII.A) Extractions des protéines totales

Le milieu de culture est enlevé et les flasques sont lavés avec du PBS (phosphate buffered saline). Les protéines cellulaires totales sont extraites par le RIPA (PO₄Na₂/K, pH 7.2 à 20 mM ; Triton X-100 1 % ; déoxycholate de sodium 1 % ; NaCl 150 mM ; EDTA 5 mM) en présence d'un cocktail d'anti-protéases (Sigma, P 8340) et de 5 mM d'orthovanadate de sodium pendant 1 heure sur glace. Les cellules sont ensuite grattées et centrifugées à 15 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Après centrifugation, le surnageant est récupéré et la quantité de protéines présentes est quantifiée par la méthode BCA (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, U.S.A.).

VII.B) Western-Blot

Après le dosage protéique, la même quantité de protéines (de chaque échantillon) est soumise à une électrophorèse monodimensionnelle réalisée dans un système Bio-Rad selon la technique SDS-PAGE (sodium dodécyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis). Pour ces

travaux, la densité du gel polyacrylamide était de 6 à 16 % (en fonction du poids moléculaire des protéines à séparer). A la fin de l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par un « semi-dry electro-blotter » (Bio-Rad).

Nom	Monoclonal (M) ou Polyclonal (P)	Espèce	Dilution	Fournisseur
<i>anti-hTRPC6</i>	P	Lapin	1/100 ^{ème} (WB)	Covalab
	P	Lapin	1/200 ^{ème} (IF)	Alomone Labs
<i>anti-calnexine</i>	M	Souris	1/1000 ^{ème} (WB)	Chemicon International
<i>anti-β-actine</i>	M	Souris	1/1000 ^{ème} (WB)	Sigma
<i>anti-GFP</i>	P	Lapin	1/1000 ^{ème} (WB)	Abcam
			1/200 ^{ème} (IF)	
<i>anti-Ki-67</i>	P	Lapin	1/100 ^{ème} (WB)	Abcam
			1/200 ^{ème} (IF)	
<i>anti-cycline D1</i>	M	Souris	1/100 ^{ème} (WB)	Santa Cruz Biotechnology
<i>anti-STIM1</i>	M	Souris	1/100 ^{ème} (WB)	BD Biosciences
<i>anti-STIM2</i>	P	Lapin	1/50 ^{ème} (WB)	ProSci Incorporated
<i>anti-Orai1</i>	P	Lapin	1/200 ^{ème} (WB)	ProSci Incorporated

Fig. 36 : liste des différents anticorps primaires utilisés. WB = western-blot, IF = immunofluorescence.

Après le transfert, la membrane est saturée par du TNT-lait 5 % (15 mM de tampon Tris pH 8 ; 140 mM NaCl ; 0.05 % de Tween et 5 % de lait écrémé en poudre) sous agitation pendant 30 minutes à température ambiante afin de réduire les fixations aspécifiques de l'anticorps primaire (Fig. 36). Celui-ci est dilué dans du TNT-lait 5 % et mis en présence de la membrane sur la nuit à 4 °C. Après 3 lavages au TNT, la membrane est incubée une heure à température ambiante dans du TNT-lait 5 % en présence de l'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin ou de souris) lié à la peroxydase dilué au 1/20 000^{ème} (Laboratoires Zymed Inc, San Francisco, CA). Après des lavages au TNT, les protéines sont révélées par chimioluminescence grâce à un substrat approprié, le « Supersignal West Dura Chemiluminescent » (Pierce, Rockford

Company, IL) selon les recommandations du fournisseur. La membrane est enfin exposée à des films BioMax Light (Kodak, Rochester, NY) et l'intensité des signaux obtenus est mesurée par densitométrie sur une station d'acquisition Chemidoc (Biorad, France) puis semi-quantifiée grâce au rapport protéine d'intérêt/protéine rapporteuse (actine ou calnexine).

VII.C) Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte est une technique de marquage permettant de mettre en évidence une ou plusieurs protéines (simple ou double marquage) par l'utilisation d'un fluorophore couplé à un anticorps secondaire. Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre (14 mm de diamètre et 0.13 - 0.16 mm d'épaisseur ; CML France). Après lavage au PBS, les cellules sont fixées, pendant 15 minutes, dans de l'acétone à -20 °C puis lavées 3 fois au PBS et saturées pendant 30 minutes (dans une chambre humide et à température ambiante) avec du PBS-gélatine. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 1 heure à 37 °C avec l'anticorps primaire (dilué dans du PBS-gélatine) puis lavées 3 fois au PBS-gélatine avant d'être incubées, pendant 1 heure à 37 °C, avec l'anticorps secondaire (dilué dans du PBS-gélatine) couplé à l'Alexa fluor 488 (dilués au 1/2000^{ème}) ou à l'Alexa fluor 546 (dilués au 1/4000^{ème}). Après 3 lavages au PBS-gélatine, les lamelles sont montées avec du Mowiol[®]. Enfin, les lamelles sont observées en microscopie confocale (Zeiss LSM 510).

VIII) Mesure de viabilité cellulaire

VIII.A) Test de viabilité : coloration au bleu de trypan

α- Le principe

Le bleu de trypan est un colorant présentant la propriété de pénétrer dans les cellules. Ces dernières sont capables, grâce à un mécanisme nécessitant une source énergétique (l'ATP), d'éjecter ce colorant vers le milieu extracellulaire. De ce fait, seules les cellules vivantes pourront expulser cette molécule et rester « blanches » au microscope, au contraire les cellules mortes n'auront pas les moyens de la rejeter (ne produisant plus d'ATP) et resteront bleues. Cependant, cette molécule étant toxique, elle finit par tuer les cellules qui deviennent alors toutes bleues.

β- Le protocole

Pour des cellules en suspension : il faut prendre un tube Eppendorf dans lequel il faut ajouter 200 μ l de bleu de trypan (solution à 4 mg/ml) et 200 μ l d'une suspension cellulaire (dans du PBS) puis homogénéiser. Après 5 minutes à température ambiante, 10 μ l de cette suspension sont mises entre lame et lamelle pour être visualisé sous microscope. Ensuite, il faut compter le nombre de cellules colorées en bleu et le nombre de cellules non colorées.

Pour un tapis cellulaire présent sur une lamelle de verre dans une boîte de pétri : il faut enlever le milieu de culture pour le remplacer par un mélange composé de : 500 μ l de bleu de trypan (solution à 4 mg/ml) et 500 μ l de PBS. Après 5 minutes à température ambiante, la lamelle est visualisée sous microscope et les cellules colorées en bleu ainsi que les cellules non colorées sont comptabilisées.

Ces comptages nous permettront d'estimer la viabilité cellulaire.

VIII.B) Test de viabilité : MTS

Le kit de mesure de viabilité utilisé (CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, France). Ce test est basé sur une méthode colorimétrique qui détermine le nombre de cellules viables en mesurant l'activité enzymatique mitochondriale. Ce kit est composé du MTS (sel de tétrazolium) et du PMS (phénazine méthosulfate). Le MTS est réduit par les cellules en formazan, soluble dans le milieu de culture. La conversion du MTS en formazan est réalisée par des déshydrogénases présentes dans les cellules métaboliquement actives. La quantité de formazan produite, mesurée par son absorbance à 490 nm, est directement proportionnelle au nombre de cellules viables en culture.

Lorsque l'apoptose est stable entre deux conditions, ce kit permet d'estimer la prolifération des cellules.

IX) La cytométrie de flux

IX.A) Le principe

La cytométrie de flux est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. En effet, chaque cellule reçoit un rayon laser et le cytomètre mesure alors la lumière réémise par chaque cellule (Fig. 37). Une des applications directe de cette technique est au niveau du cycle cellulaire. En effet, cette technique permet de déterminer le contenu cellulaire en ADN (après marquage à l'iodure de propidium : IP) et par la suite de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle (G_1 , S, G_2/M) en fonction de divers stimuli ou de l'ajout de certaines drogues.

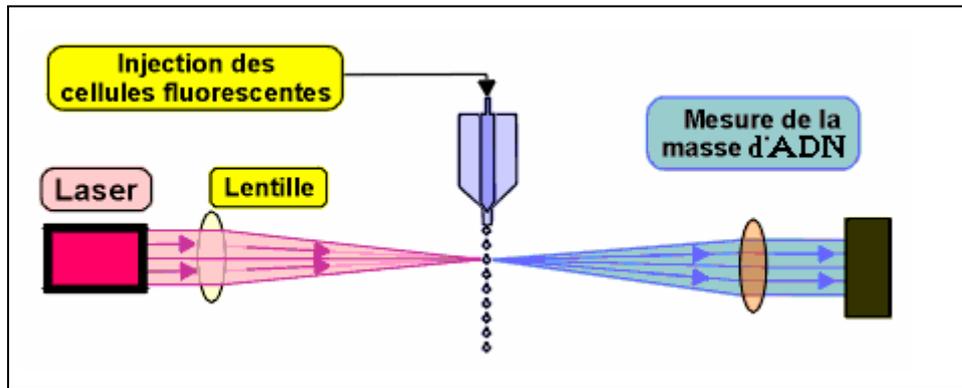


Fig. 37 : Description sommaire d'un appareillage de cytométrie de flux.

(Modifiée à partir de : <http://www.baclesse.fr/cours/fondamentale/5-cell-souches/Souche-4.htm>).

IX.B) Le protocole

Les cellules, ensemencées dans un flacon de 25 cm², sont d'abord trypsinisées et homogénéisées avec leur surnageant puis centrifugées 5 minutes à 1 000 g. Elles sont ensuite comptées, pour ne conserver qu'un million de cellules par échantillon, lavées 3 fois au PBS puis fixées à l'éthanol 70 % glacé pendant 10 minutes à 4 °C. Un lavage au PBS précède alors une incubation de 15 minutes en présence de 2 µg/ml de RNase dans du PBS. L'étape suivante consiste en un marquage par 25 µg/ml d'IP (fluorochrome qui s'intercale entre les bases de la double hélice d'ADN) dans du PBS-Triton X-100 0.1 % pendant un minimum de 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. La distribution des différentes phases du cycle cellulaire est mesurée à 520 nm après excitation à 488 nm par un cytomètre de flux (Beckman coulter Epics XL4-MCL) couplé à un logiciel d'acquisition « Expo32 ». La réinterprétation des données est réalisée sur « Multicycle for Windows » (Phoenix Flow system).

X) Analyse des données

Les tests statistiques ont été réalisés par le test t (Test de Student). Ce dernier permet de comparer des échantillons indépendants. Les différences sont considérées comme significatives avec des seuils de : $p < 0.05$: * ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.001$: ***. Les résultats sont exprimés par les moyennes représentées avec les écarts standards à la moyenne (sem).

Résultats

Article 1

« Capacitative Calcium Entry and Transient Receptor Potential Canonical 6 Expression Control Human Hepatoma Cell Proliferation »

Charbel El Boustany^{*}, Gabriel Bidaux^{*}, Antoine Enfissi^{*}, Philippe Delcourt, Natalia Prevarskaya, Thierry Capiod.

Hepatology. 2008 Jun;47(6):2068-77.

* : Les auteurs ont contribué à part égale dans ce travail.

Nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'implication de TRPC6 dans l'entrée capacitive et dans la prolifération des hépatomes humains Huh-7.

Il est connu, depuis plus de trente ans, que les cellules des vertébrés ont besoin de Ca^{2+} extracellulaire pour croître et proliférer en culture. Une stricte relation entre prolifération et concentration en Ca^{2+} extracellulaire a été établie pour la première fois en 1971 par Balk dans des fibroblastes aviaires [Balk, 1971]. En effet, les cellules deviennent quiescentes si elles sont maintenues dans un milieu déficient en calcium pendant trois jours et ce, malgré la présence continue de facteurs de croissance. Ce phénomène est réversible car l'ajout de Ca^{2+} après trois jours de privation engendre une reprise de la synthèse d'ADN suivie par une division cellulaire. Des observations similaires ont été faites sur des fibroblastes humains [Takuwa *et al.*, 1993], murins [Takuwa *et al.*, 1991] et sur d'autres types cellulaires [Takuwa *et al.*, 1995]. De plus, de nombreux antagonistes potentiels des canaux calciques, comme le CAI, inhibent la mitose induite par les facteurs de croissance [Hupe *et al.*, 1991]. Le CAI ainsi que le 2-APB ont également la propriété d'inhiber la prolifération cellulaire des lignées d'hépatomes humains, Huh-7 et HepG2 [Enfissi *et al.*, 2004]. Ces observations indiquent que l'entrée de Ca^{2+} joue un rôle prépondérant dans la prolifération cellulaire et en particulier celle des Huh-7.

Toutefois, le mécanisme grâce auquel l'entrée de Ca^{2+} intervient dans la prolifération de cette lignée reste matière à débats et la nature moléculaire des canaux calciques impliqués dans ce phénomène restent à déterminer.

Pour répondre à ces questions nous nous sommes intéressés d'une part, à la famille des TRPC et d'autre part, à STIM1 et Orai1. En effet, la famille des TRPC semble présenter un certain nombre de candidats, en particulier TRPC1, 3, 4 et 6, pouvant être potentiellement impliqué à la fois dans l'entrée de Ca^{2+} et dans la prolifération [Golovina *et al.*, 2001 ; Sweeney *et al.*, 2002 ; Yu *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 2005 ; Thebault *et al.*, 2006 ; Abdullaev *et al.*, 2008 ; Guilbert *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2009]. Quant aux deux autres candidats, STIM1 et Orai1, ils

ont été décrit comme étant impliqués dans une entrée calcique de type capacitive et dans la prolifération [Yeromin *et al.*, 2006 ; Abdullaev *et al.*, 2008]. Pour cela, nous avons établi le profil d'expression des ARNm de ces protéines dans le foie humain sain, dans le CHC (survenant suite à une HBV ou une HCV) et dans les lignées d'hépatomes humains (Huh-7 et HepG2). Dans ces conditions, on s'aperçoit que certaines formes de TRP (TRPC1, TRPC4 et TRPC6), absentes au niveau du foie sain, sont présentes dans le foie tumoral ainsi que dans les lignées d'hépatomes humains Huh-7 et HepG2. Quant à STIM1 et Orai1, leur expression est homogène quelque soit l'état physio-pathologique.

Nous nous sommes par la suite focalisés sur TRPC6 étant donné que ce dernier peut être impliqué, dans certains tissus (tissu prostatique et tissu mammaire), à la fois dans une entrée calcique et dans la prolifération [Thebault *et al.*, 2006 ; Guilbert *et al.*, 2008]. De plus, des travaux assez anciens avaient suggéré que TRPC6 était absent du foie adulte mais présent dans le foie foetal représentatif d'une autre étape pendant laquelle les hépatocytes prolifèrent [Garcia and Schilling, 1997].

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle TRPC6 est impliqué dans l'entrée calcique et la prolifération des hépatomes humains, nous avons développé, en plus d'un anticorps dirigé contre ce canal, des clones stables au niveau desquels TRPC6 est surexprimé ou à l'inverse sous-exprimé. Les premières comparaisons (en immunohistochimie) entre foie sain et tumoral chez l'homme indiquent la présence de foyer d'expression de TRPC6 dans les zones tumorales de cet organe. L'utilisation de la lignée d'hépatomes humains Huh-7 nous a permis de mettre en évidence le rôle de TRPC6 dans la relation prolifération-entrée de calcium. Une variation de l'expression de TRPC6 montre que ce dernier est plutôt impliqué dans la forme d'entrée capacitive et cette variation d'expression n'influe pas la réponse à l'OAG. En effet, L'entrée capacitive ainsi que la prolifération sont augmentées lorsque TRPC6 est surexprimé et diminuées lorsque TRPC6 est sous-exprimé. De plus, l'expression de TRPC6 ainsi que l'entrée capacitive sont stimulées suite à un traitement par des facteurs de croissance, connus pour stimuler la prolifération des cellules hépatiques, tels que l'EGF ou l'HGF. De plus, l'inhibition partielle de STIM1 ou Orai1 entraîne une diminution partielle de l'entrée capacitive, mais cette diminution ne peut pas être observée suite à une inhibition de l'expression de TRPC1. Enfin, nous avons démontré que l'inhibition de l'expression de TRPC6 ou de STIM1 ou de Orai1 entraîne une diminution de l'expression de la cycline D1 entraînant ainsi un ralentissement de la vitesse de prolifération des Huh-7.

En conclusion : TRPC6 n'est pas (ou très faiblement) exprimé au niveau des hépatocytes primaires fraîchement isolés de patients sains, par contre il est exprimé fortement dans les échantillons tumoraux de foie des patients atteints d'un CHC, présentant ainsi un rôle potentiel de ce canal dans la tumorigenèse hépatique.

Capacitative Calcium Entry and Transient Receptor Potential Canonical 6 Expression Control Human Hepatoma Cell Proliferation

Charbel El Boustany,^{1*} Gabriel Bidaux,^{1*} Antoine Enfissi,^{1*} Philippe Delcourt,¹ Natalia Prevarskaya,¹ and Thierry Capiod¹¹

Store-operated calcium entry (SOCE) is the main Ca^{2+} influx pathway involved in controlling proliferation of the human hepatoma cell lines Huh-7 and HepG2. However, the molecular nature of the calcium channels involved in this process remains unknown. Huh-7 and HepG2 cells express transient receptor potential canonical 1 (TRPC1) and TRPC6, as well as STIM1 and Orai1, and these 4 channels are the most likely candidates to account for the SOCE in these cells. We generated stable TRPC6-overexpressing or TRPC6-knockdown Huh-7 clones, in which we investigated correlations between the presence of the protein, the rate of cell proliferation, and SOCE amplitude. TRPC6-overexpressing Huh-7 cells proliferated 80% faster than did untransfected cells and their SOCE amplitude was 160% higher. By contrast, proliferation rate was 50% lower and SOCE amplitude 85% lower in TRPC6-knockdown clones than in untransfected cells. OAG (oleyl acetyl glycerol)-induced calcium entry was similar in all cells, and small interfering RNA (siRNA) against TRPC1 had no effect on SOCE amplitude, highlighting the relationship among SOCE, TRPC6 and cell proliferation in Huh-7 cells. SOCE amplitude was reduced by STIM1 and Orai1 knockdowns, suggesting possible cooperation between these proteins and TRPC6 in these cells. Endothelial growth factor and hepatocyte growth factor increased TRPC6 expression and SOCE amplitude in Huh-7 cells, and cyclin D1 expression was decreased by STIM1, Orai1, and TRPC6 knockdowns. **Conclusion:** TRPC6 was very weakly expressed in isolated hepatocytes from healthy patients and expressed more strongly in tumoral samples from the liver of a cancer patient, strongly supporting a role for these calcium channels in liver oncogenesis. (HEPATOLOGY 2008;47:2068-2077.)

The processes involved in the transformation of normal cells into tumorigenic cells and tumor progression are complex and only partially understood.^{1,2} Many proteins in cancer cells are produced in

larger or smaller amounts than in normal cells. Some of these proteins associated with cancer progression are involved in calcium homeostasis. Several types of cancer cells require an influx of calcium to proliferate, and it has been known for more than 30 years that the proliferation and growth of normal vertebrate cells depend on the physiological concentration of extracellular calcium.^{3,4} Calcium influx is required at various stages of the cell cycle,⁴ but little is known about the nature of the calcium channels involved in this process in nonexcitable cells such as liver cells. Two separate calcium entry pathways are simultaneously activated in liver cells. Phospholipase C stimulation results in InsP_3 and diacylglycerol (DAG) generation, leading to capacitative or store-operated calcium entry (SOCE) because of a decrease in the calcium concentration of the endoplasmic reticulum (ER) lumen. A second type of calcium channel, activated independently of store depletion by the membrane-permeant analogue of DAG, 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol (OAG),⁵ has also been described and is involved in non-capacitative

Abbreviations used: SOCE, store-operated calcium entry; STIM1, stromal interacting molecule 1; NCCE, noncapacitative calcium entry; TRPC6, transient receptor potential canonical 6; OAG, 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol.

¹From the Institut National de la Santé et la recherche Médicale (INSERM), U800, IFR143, Université Sciences et Technologies Lille 1, F-59655, Villeneuve d'Ascq, France.

Received October 2, 2007; accepted January 24, 2008

Supported by Association pour la Recherche contre le Cancer grant 4615 to T.C.

*These authors contributed equally to this work.

Present address of Antoine Enfissi: Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, 660 Route des Lucioles Sophia Antipolis, Valbonne, F-06560 France.

Address reprint requests to: Dr. Thierry Capiod, INSERM U800, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Bâtiment SN3, Université Sciences et Technologies Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. E-mail: thierry.capiod@univ-lille1.fr; fax: (33) 0-320434066.

Copyright © 2008 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.22263

Potential conflict of interest: Nothing to report.

calcium entry (NCCE).⁶ Several reports have shown that TRPC (transient receptor potential canonical) channels are probably involved in SOCE and NCCE.⁷ However, little is known about the role of these channels in hepatocytes, and 1 previous study has reported the involvement of TRPC1 in SOCE activation.⁸ Both transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) and TRPC1 have been associated with cell proliferation and SOCE,⁹ and we recently showed that SOCE is essential for human hepatoma cell line proliferation.¹⁰ We focused on TRPC6, as it has recently been suggested that this receptor is associated with cell proliferation in vascular smooth muscle cells^{9,11} and prostate cancer epithelial cells.¹² Two other proteins, stromal interacting molecule 1 (STIM1) and Orai1, have also been shown to be involved in controlling SOCE.^{13,14} We therefore first established expression profiles for TRPC, STIM1, and Orai1 in human hepatoma cells in order to identify the candidates most likely to account for SOCE activation in these cells. We modified the expression of the genes concerned and monitored the effects of these changes on the amplitude of SOCE and rates of cell proliferation in human hepatoma cells. We found that TRPC6 plays an essential role in proliferation and SOCE activity in human hepatoma cells.

Close associations between several TRP channels and cancer have been demonstrated,¹⁵ but the role of these calcium channels in liver cancer has yet to be determined. We assessed whether our observations in two model cell lines were relevant to human hepatocarcinoma development by monitoring the pattern of expression of these channels in normal quiescent adult human hepatocytes, in nontumoral and tumoral zones of human livers infected with hepatitis B (HBV+) or hepatitis C (HCV+), and in HBV-/HCV- tumoral livers. The changes in expression observed and the results obtained with human hepatoma cells suggest that TRPC6 plays an important role in the development of hepatocellular carcinomas.

Materials and Methods

Cell Culture and Human Liver Samples. Huh-7 and HepG2 human hepatoma cells were provided by Dr. Doris Cassio (INSERM U757, Orsay, France). Cells were cultured as previously described.¹⁰ Freshly dissociated human hepatocytes from healthy patients were obtained from Biopredic (Rennes, France), and human liver samples were obtained from Dr. Jean-Marc Pascussi (INSERM U632, Montpellier, France). Liver tumors from patients infected with hepatitis B or C were obtained from Dr. Mounia Chami-Maggiore (INSERM U807, Paris, France). Liver slices were a gift from Professor Valérie Paradis (CNRS UMR 8149, Paris, France).

Intracellular $[Ca^{2+}]$; Measurements. Huh-7 cells were plated on glass delta T culture dishes (Bioprotechs, Butler, PA) coated with collagen. Calcium imaging was performed as previously described.¹⁶ Images were collected at 2-second intervals. Background fluorescence signals were collected at the same rate for the same wavelengths (340 and 380 nm) and were subtracted from the corresponding fluorescence images. The results ($\Delta R/R$) are expressed as ratios of fluorescence signals measured at 340 nm to fluorescence signals measured at 380 nm during a response divided by the ratio obtained in resting conditions (that is, before the addition of an agent). $\Delta R/R$ was used to assess the amplitude of SOCE- and OAG-evoked Ca^{2+} responses in these cells.

RT-PCR. A classical reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) protocol was used, as described elsewhere.¹⁷ The various sets of primers used to identify human TRPC, TRPV, and TRPM channels are shown in Table 1.

Proliferation Assays. Cells were seeded at a density of 1000 cells/cm² in a final volume of 1 mL of culture medium. Proliferation rate was determined daily over 3 or 4 days, using an MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) reagent kit (Promega).

Cell Transfection. Ready-to-use siTRPC6, siTRPC1, siSTIM1, and siORAI1 cells were generated by transiently transfecting the Huh-7 cell line overnight with 100 nM siRNA, using the JetSI ENDO transfection reagent (Polyplus transfection). Control siRNA experiments were carried out in which Huh-7 cells were transfected with an siRNA against mTRPC6 (mouse transient receptor potential canonical 6).

Generation of a TRPC6-Knockdown Cell Line and TRPC6-Overexpressing Cells. Stable cell lines were obtained by transfecting Huh-7 cells with a vector encoding the human TRPC6 protein or short hairpin RNA (shRNA) against TRPC6, using Nucleofector, as recommended by the manufacturer (Amaxa GmbH, Köln, Germany). We transected 2×10^6 trypsin-treated Huh-7 cells with 3 μ g of vector and then used the transfected cells to seed a 24-well plate (Nunc) at very low density. Clones overexpressing or underexpressing TRPC6 were selected on the basis of their antibiotic resistance.

Immunofluorescence. Huh-7 cells and frozen sections of human liver were subjected to immunofluorescence analysis as previously described,¹⁷ using a rabbit polyclonal anti-TRPC6 antibody produced in our laboratory and diluted 1:500.

Western Blotting. Western blotting was carried out as previously described.¹⁷ The primary antibodies used were: rabbit anti-TRPC6, rabbit anti-TRPC1 (Alomone Labs, Israel), mouse anti-STIM1 (Chemicon Interna-

Table 1. List of Primers Used for RT-PCR Assays

	PCR			Accession Number
	5' Forward 3'	5' Reverse 3'	Expected Size (bp)	
TRPC1	GATTTTGGAAAATTTCTTGGGATGT	TTTGTCTTCATGATTTGCTATCA	369	NM_003304
TRPC3	GACATATTCAAGTTCATGGTCCTC	ACATCACTGTCATCCTCAATTC	323	NM_003305
TRPC4	CTGCAAATATCTCTGGGAAGA	GCTTTGTTCTGTCGCAAATTTCC	412	NM_016179
TRPC5	ACTACTAGCTTTTGCCAATGGAC	ATCAGCGTCATCCTCAATTC	301	NM_012471
TRPC6	GACATCTTCAAGTTCATGGTCATA	ATCAGCGTCATCCTCAATTC	321	NM_004621
TRPC7	CTTCAACTGTGTGGACTACATG	GCACTTGCAGAAGTAGTCGTG	391	NM_020389
TRPV1	GACAACGAGTTCAAAGACCCT	CAGTTCACCGAAGTAGAATCC	318	NM_080704
TRPV2	GACAACGAGTTCAAAGACCCT	CAGTTCACCGAAGTAGAATCC	352	NM_016113
TRPV3	CCTCTACGACCTCACCAACG	CAGCAGGAAGATGGCAATG	361	NM_145068
TRPV4	ATCCTCTTTGACATCGTGTCC	GGGCCACGAGAAGTTCACGT	322	NM_021625
TRPV5	GGCCTATGAGACACGTGAAGATATC	ATAGAATTGCCCCAGACTGGTTG	448	NM_019841
TRPV6	TGGTGCAACGTCATGTAATTC	CATGGGGTAGTCGTAGAAGT	201	AF365927
TRPM1	AGCAGGACATCGAGATGGCAAT	GTGTTGCATGTTCACTCCGTTT	413	NM_002420
TRPM2	TCTCAGAATGGAGCCCTCAGC	AAGACGATGTCGCCAAAGGCAT	402	NM_002420
TRPM3	CGCAGCTGGAGACCTTATC	AAGCTGCTCTGACGGACAAT	142	NM_020952
TRPM4	AGCATGGTGGTGC CGGAGAA	GGTGTCTCTATTCCGGACCACA	244 (a), 600 (b, c)	a, AY297044; b, AY297046; c, AY297046
TRPM5	CAGAACATCACCTCACACCAG	GGTTCTCGCTCTTCTGGTTC	640	NM_014555
TRPM6	AGATGAAGGGATGCTGCGAC	GCAAGAGTGTATTAGTAGGTCC	470	NM_017662
TRPM7	TGGACAGCAGTGGCTGGTTG	TATTTCCGCCAGACCTCCGA	362	NM_017672
TRPM8	TGCTGCAGAGGATGCTGATCG	GGTGCCACCGTGTAGCCAA	419	NM_024080
hOrai1	CTTCAGTGCCTGCACCACAG	CCTGGAACGTGCGGTACGTC	450	(NM_032790)
hSTIM1	GCGGGAGGGTACTGAG	TCCATGTCATCCACGTCGTCA	533	(NM_003156)
Real-time PCR				
TRPM8	CGGTCATCTACGAGCCCTAC	CACACACAGTGGCTTGGACT		AY328400
TRPC6	TGTTTACGTTCTTTATGGAGTC	CACATCAGCGTCATCCTCA	112	NM_004621
18S mRNA	CAGCTTCCGGGAAACCAAAGTC	AATTAAGCCGAGGCTCCACTC	113	NR_003286.1

tional), mouse anti- β -actin (Sigma, St. Louis, MO), and mouse anticalnexin (Chemicon International).

The intensity of the signals obtained was evaluated by densitometry and semiquantified using the ratio between the intensity of the protein of interest divided by the intensity of calnexin or actin in each experiment. Each experiment presented was repeated at least three times.

Quantitative Real-Time PCR Analysis. PCR product level was quantified by real-time quantitative PCR on an ABI-Prism 5700 Sequence Detection System. For each reaction, 10 ng of complementary DNA was added to 20 μ L of reaction mixture containing 12.5 μ L of 2 \times QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 300 nM primers (Table 1). The primers used for the quantification of TRPC6 messenger RNA (mRNA) are shown in Table 1. We used 18S mRNA as an endogenous control to normalize variations in RNA extraction, the degree of RNA degradation, and variability in RT efficiency. We quantified the results with the comparative Ct method.¹⁸

Materials. All culture media were obtained from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Thapsigargin was obtained from Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel), and fura-2/AM was obtained from Molecular Probes Eu-

rope (Leiden, the Netherlands). All other reagents were from Sigma.

Statistics. Data were analyzed and curves fitted with Microcal Origin software (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Video imaging experiments were repeated at least three times in triplicate, and between 140 and 250 cells were examined in all conditions. An unpaired t test was used to compare $[Ca^{2+}]_i$ values. Results are expressed as means \pm SEMs, with statistically significant at * $P < 0.5$, ** $P < 0.1$, and *** $P < 0.01$.

Results

TRPC, STIM1 and Orai1 Expression in Normal and Tumoral Human Liver and in Primary Cultures of Human Hepatocytes. We used a TRPC6-enhanced green fluorescent protein (TRPC6-eGFP) chimera to validate our TRPC6 antibody. We detected a 106-kDa protein and a glycosylated form eliminated by peptide *N*-glycosidase F-mediated deglycosylation on western blots (Fig. 1A,B). Immunocytochemical staining with the same construct showed TRPC6 to be localized at the plasma membrane of human hepatoma cells (Fig. 1C). We then monitored TRPC expression in livers collected

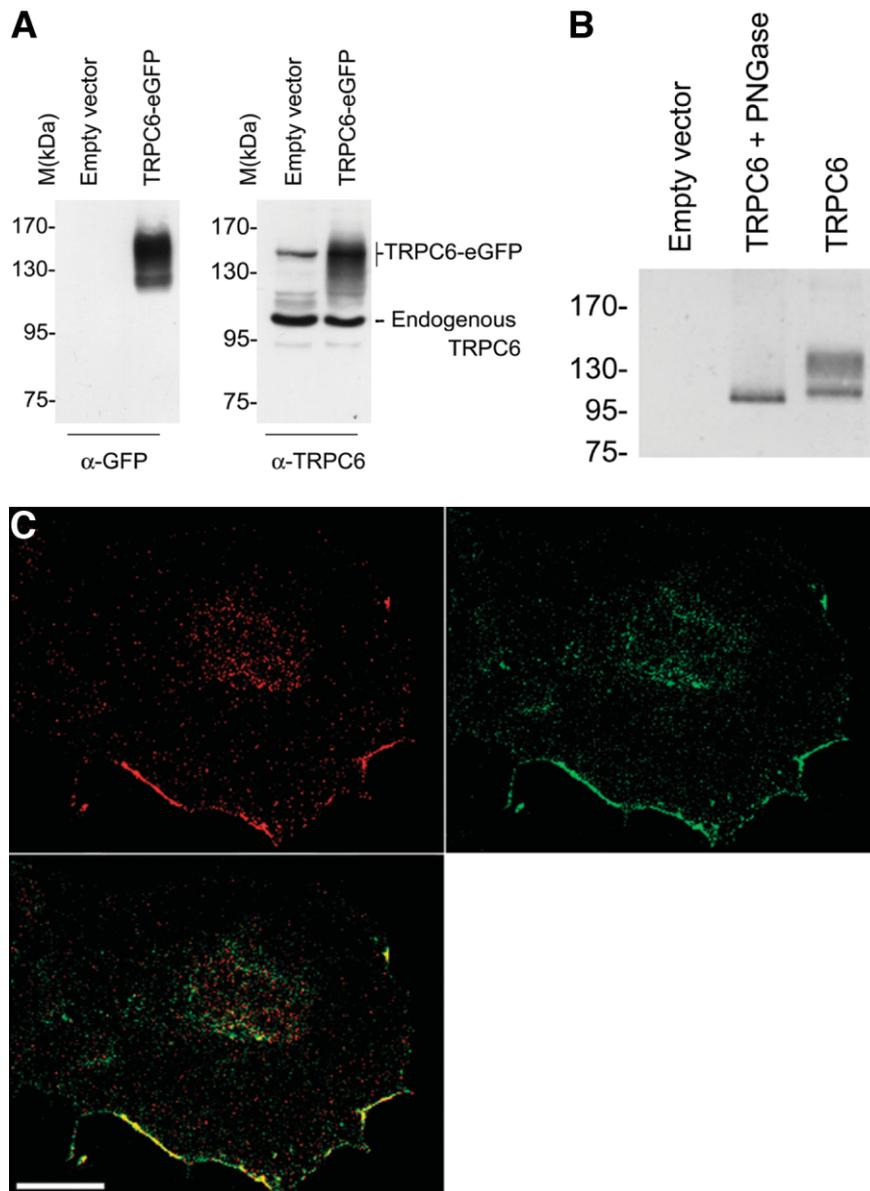


Fig. 1. TRPC6 expression and localization. (A) Immunoblotting showing detection of a TRPC6-eGFP chimera produced in Huh-7 cells and detected with either anti-GFP antibody (left) or anti-TRPC6 antibody (right). The expected chimera was detected at about 125 kDa, together with another band at around 150 kDa. (B) Reduction of the glycosylated form of the wild-type TRPC6 protein overexpressed in HEK-293 cells by PNGase treatment. (C) Validation of the anti-TRPC6 antibody in an immunofluorescence experiment showing the codetection of a TRPC6-eGFP chimera overexpressed (green) in Huh-7 cells with anti-TRPC6 antibody (red).

from healthy patients, tumoral and nontumoral tissue from HBV+, HCV+, and HBV-/HCV- patients, and dissociated human hepatocytes from the livers of healthy donors. RNA analyses showed that TRPC1 and TRPC4 were absent in liver tissues (six of six samples) and freshly dissociated human hepatocytes (nine of ten samples) from healthy donors, but were present in all tested tumors from HBV+ (seven of seven samples), HCV+ (seven of seven samples), and HBV-/HCV- (six of six samples) patients. TRPC5, STIM1, and Orai1 were expressed in all conditions. Quantitative PCR was used to compare

TRPC6 mRNA expression in isolated human hepatocytes from healthy patients and nontumoral and tumoral samples taken from the same liver of HBV+, HCV+, and HBV-/HCV- patients. TRPC6 was very weakly expressed in isolated hepatocytes from healthy patients. It was expressed 100 times and 1,000 times more strongly in nontumoral and tumoral samples, respectively, from the liver of a cancer patient (Fig. 2A). Immunocytochemical staining indicated that TRPC6 was expressed on hepatocytes solely in the tumoral zones (Fig. 2B) of slices of HBV-/HCV- livers, indicating that the increase in

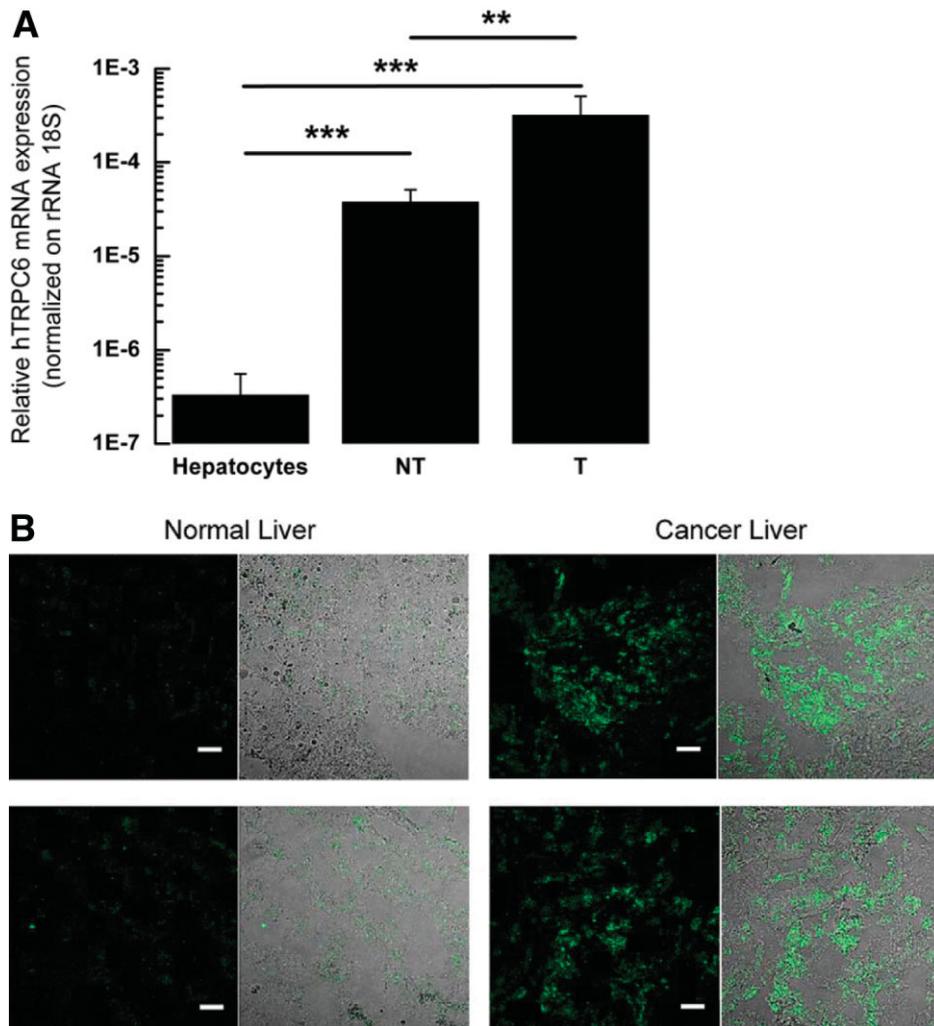


Fig. 2. Pattern of TRPC expression in normal and tumoral human liver and in primary cultures of human hepatocytes. (A) Histogram summarizing mRNA expression for human TRPC6 in isolated human hepatocytes ($n = 9$), and nontumoral (NT) and tumoral (T) specimens from the same liver ($n = 6$ for each condition). Values are presented as means \pm SDs. (B) TRPC6 was overexpressed in cancerous hepatocytes in liver tumors (right) with respect to normal liver (left).

TRPC6 expression in tumors was independent of hepatitis viruses. The expression observed in nontumoral zones may have been a result of other cell types such as endothelial cells or Kupffer cells (not shown).

Transient Overexpression and Underexpression of TRPC6. We investigated the involvement of TRPC6 in cell proliferation and cancer development in the liver using two human hepatoma cell lines, Huh-7 and Hep G2. We first demonstrated (Table 2) that these two cell lines produced mRNA for STIM1 and Orai1 and the same set

of TRPs, with only TRPC1 and TRPC6 associated with SOCE.^{7,9} We investigated the role of TRPC6 in SOCE, using Huh-7 cells transiently transfected with a plasmid encoding the channel (increasing expression by 150% 72 hours after transfection) or with an siRNA against TRPC6 (decreasing expression by 95% 72 hours after transfection; Fig. 3A). Cells were then challenged by incubation with 1 μ M thapsigargin for 3 to 4 minutes in the absence of external calcium for ER depletion and full activation of SOCE. Once fluorescence traces had re-

Table 2. Pattern of TRP mRNA Expression in Human Hepatoma Cell Lines Huh-7 and Hep G2

	hTRPC						hTRPV						hTRPM							
	1	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8
Huh-7	✓	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓	✓	-	-	-	-	-	✓	✓	✓	✓	✓
Hep G2	✓	-	-	-	✓	-	✓	✓	-	✓	-	-	-	-	-	✓	-	✓	✓	✓

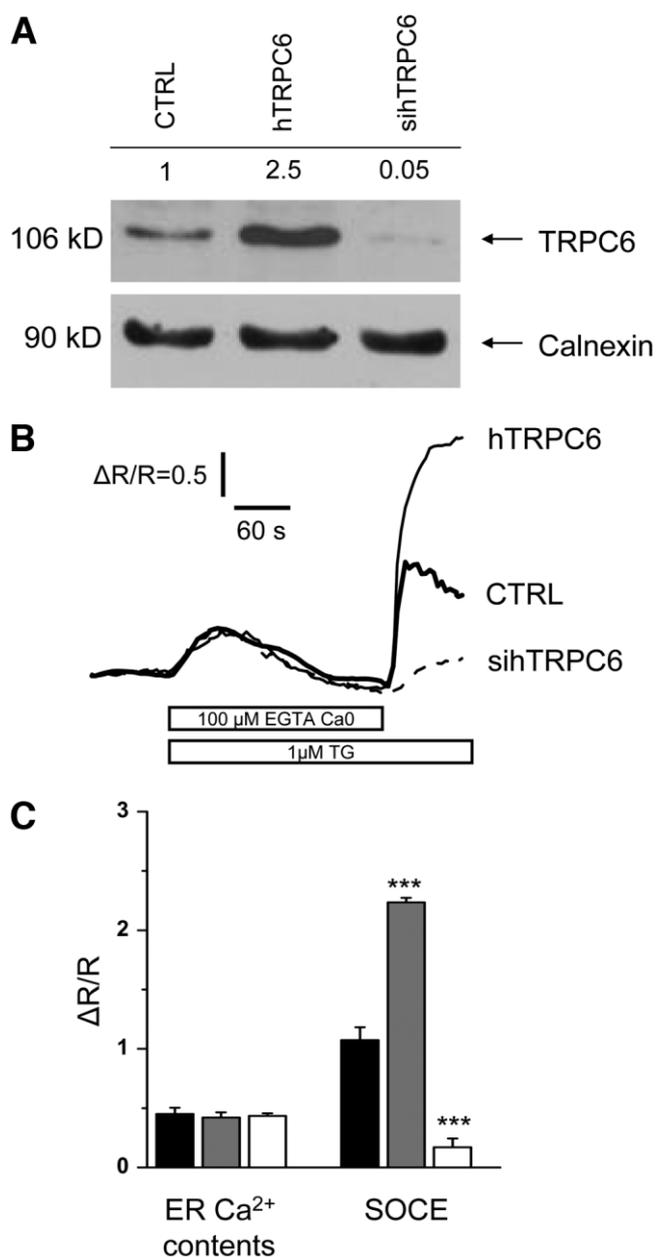


Fig. 3. Transient overexpression and underexpression of TRPC6 and SOCE amplitude (A) Fura-2 loaded Huh-7 cells were challenged by incubation with thapsigargin (TG, 1 μ M) in a saline medium containing no calcium and 100 μ M EGTA. SOCE was monitored in simTRPC6 cells (ctrl; Huh-7 cells transiently transfected with the plasmid encoding hTRPC6) or Huh-7 cells transiently transfected with the siRNA against hTRPC6 (sihTRPC6 cells). The addition of 1.8 mM Ca²⁺ to the external solution triggered SOCE in ctrl (thick line) hTRPC6 (thin line), and sihTRPC6 (dashed line) Huh-7 cells. CCE was estimated as the difference between [Ca²⁺]_i increase in the presence and the absence of TG (basal). Increases in [Ca²⁺]_i are expressed as ratios of 340:380 nm fluorescence signals (Δ R/R). (B) Means \pm SEMs from a series of experiments similar to A for control (black), hTRPC6 (gray), and sihTRPC6 (white) Huh-7 cells.

turned to baseline, we added 1.8 mM Ca²⁺ for the assessment of SOCE amplitude (Fig. 3B). ER content was assessed by determining peak TG-evoked responses and SOCE amplitudes as the peak ratio after the addition of

Ca²⁺. Huh-7 cells overexpressing TRPC6 displayed a 110% increase in SOCE amplitude, and Huh-7 cells underexpressing this receptor displayed an 85% decrease in SOCE amplitude (Fig. 3C), whereas ER content was similar in all conditions.

Stable TRPC6 Overexpression. We developed two stable clones giving similar results for the evaluation of TRPC6 involvement in cell proliferation. TRPC6 overexpression was stable for at least 20 passages, as shown by western blots (see Materials and Methods section). A 106-kDa band corresponding to the protein was significantly more intense (+ 70%) for transfected Huh-7 cells than for controls (Fig. 4A). This increase in TRPC6 level resulted in a 145% increase in SOCE amplitude in transfected Huh-7 cells, with no significant difference in TG-sensitive Ca²⁺ pool contents between control and transfected Huh-7 cells (Fig. 4B). We monitored the rate of cell proliferation at 24-hour intervals in control cells and cells overexpressing TRPC6 plated at the same density. The time required for doubling of the cell population was determined from absorbance measurements. This doubling time was shorter for TRPC6-overexpressing cells (19 hours) than for control cells (about 21 hours; Fig. 4C), confirming the intimate relationship between TRPC6 expression, SOCE amplitude, and cell proliferation rate.

Stable TRPC6 Silencing. The relationship between SOCE and TRPC6 was also investigated in Huh-7 cells transfected with a shRNA against TRPC6, resulting in a stable decrease in TRPC6 protein level. Western blots showed that the intensity of the 106-kDa band corresponding to TRPC6 was 60% lower in transfected cells than in controls (Fig. 4A). The 50% smaller SOCE amplitude and greater cell population doubling time (32 hours, 30 minutes versus 19 hours, 45 minutes for control cells) observed for transfected cells may therefore be directly related to the lower level of expression of TRPC6 in the transfected Huh-7 cells (Fig. 4B,C). The low level of TRPC6 expression had no significant effect on TG-sensitive Ca²⁺ pool content (Fig. 4B). TRPC6 expression was not totally abolished in the two clones, so SOCE was not entirely prevented. Cells continued to grow and divide, but with a doubling time about 40% higher than that of control cells. This close relationship confirms our previous data showing that the abolition of SOCE results in the total inhibition of proliferation.^{10,19}

OAG-Activated Calcium Entry. Noncapacitative calcium entry is an alternative pathway to SOCE,²⁰ and has often been associated with TRPC6 expression.^{21,22} Control human hepatoma cells and stable clones over- or underexpressing TRPC6 were challenged by incubation for 3 minutes with 100 μ M OAG in the absence of ex-

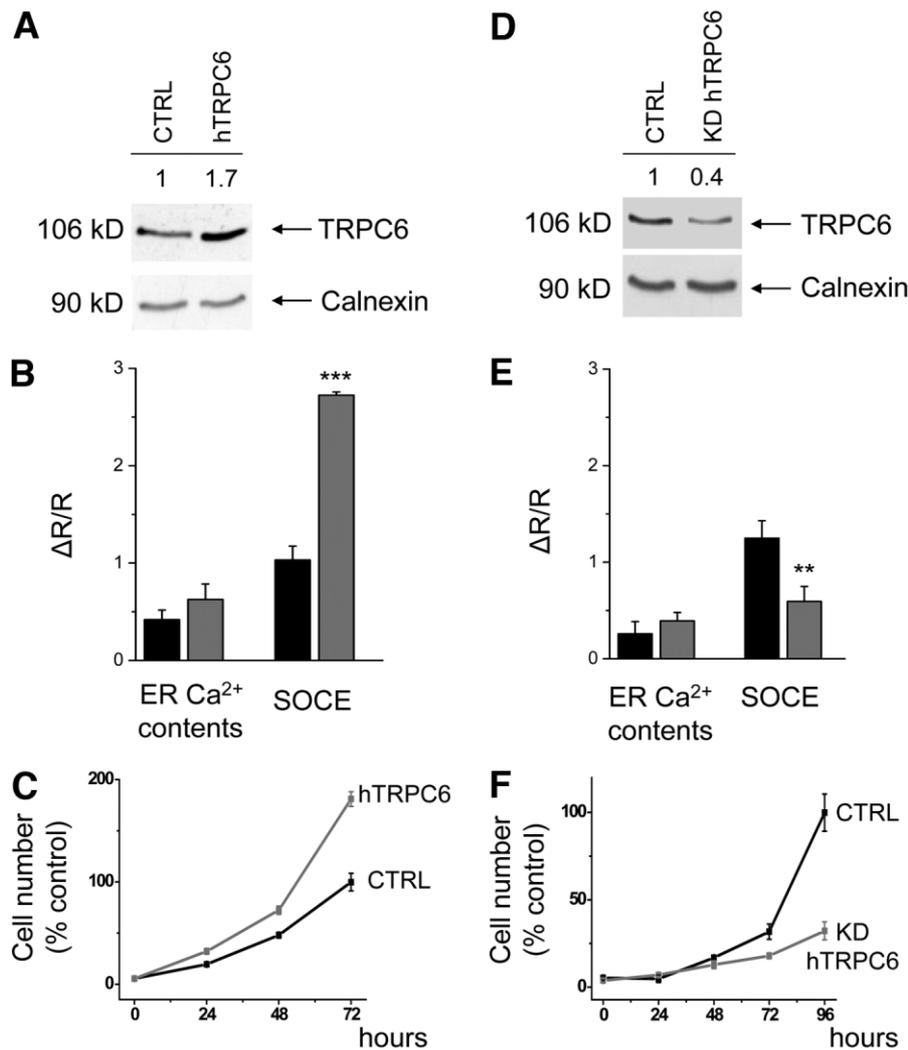


Fig. 4. SOCE amplitude, cell proliferation, and TRPC6 level in stably transfected Huh-7 clones. (A) Western blots showed the overproduction (left) or underproduction (right) of a 106-kDa protein corresponding to hTRPC6 in transfected Huh-7 cells. The numbers above the gel indicate expression with respect to control conditions. (B) Mean results from a series of experiments similar to those shown in Fig. 2A. Values are means \pm SEMs for ER Ca^{2+} content and SOCE amplitude in control (black) and TRPC6-overexpressing (hTRPC6, gray) Huh-7 cells (left) and control (black) and TRPC6 knockdown (KD hTRPC6, white) Huh-7 cells (the right). (C) Cell number determinations from DO absorbance in hTRPC6 (left) and KD hTRPC6 (right) Huh-7 cells plated at a cell density of 1000 cells/cm² in 24-well plates. Absorbance was measured every day for 3 days, and doubling time was estimated from the slopes of the curves.

ternal calcium. NCCE was then measured after adding external calcium. The histogram obtained showed that OAG-evoked calcium influx did not differ significantly in control cells and in cells over- and underexpressing TRPC6. Thus, OAG-activated calcium influx was clearly independent of TRPC6 level (Fig. 5). No increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was observed after the addition of 100 μM OAG in the absence of external calcium.

TRPC6 Expression and Growth Factors. The transition from a normal to a tumoral liver is associated with an increase in the expression of growth factor receptors.²³ We therefore investigated the possible regulation of TRPC6 expression by endothelial growth factor (EGF) or hepatocyte growth factor (HGF). Huh-7 cells were

seeded in 2% fetal bovine serum and treated for 24 hours with 20 ng/mL EGF or 10 ng/mL HGF. These growth factors increased TRPC6 levels by a factor of 3 (Fig. 6A) and induced a large increase in SOCE amplitude (Fig. 6B).

TRPC1, STIM1, and Orai1 Expression, SOCE Amplitude, and Cyclin Activity. TRPC1—which is expressed in Huh-7 cells, together with STIM1 and Orai1—is known to be associated with SOCE in several cell types.^{21,22} We therefore investigated the effects of siRNA against these proteins on SOCE amplitude and protein level (Fig. 5). Western blots showed that TRPC1 and STIM1 levels decreased in the presence of the corresponding siRNA (Fig. 7A,B). Control experiments

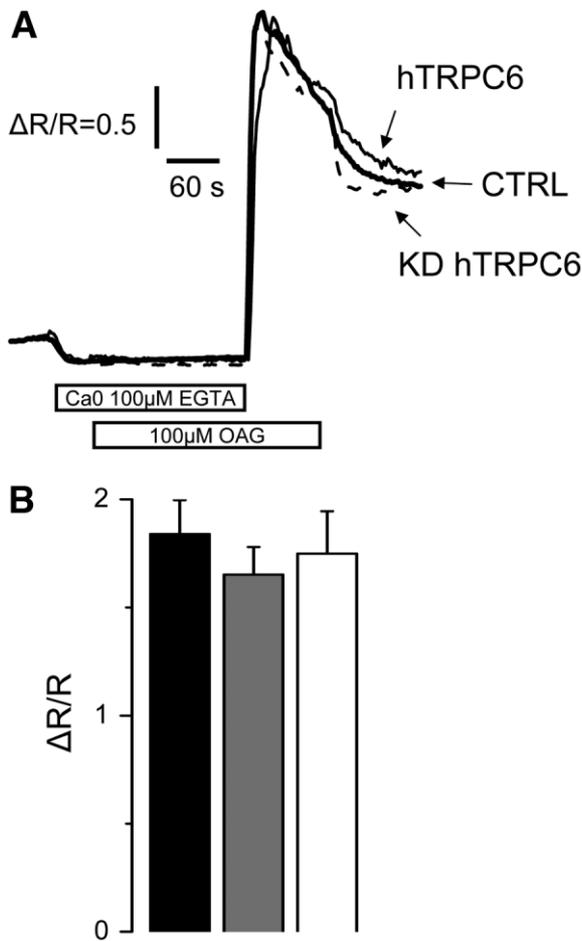


Fig. 5. OAG-activated calcium entry. (A) Fura-2 loaded Huh-7 cells were challenged by 100 μM OAG in a saline medium containing no calcium and 100 μM EGTA. NCCE was monitored after the addition of 1.8 mM Ca^{2+} in the external solution in simTRPC6 (ctrl), stable Huh-7 clones overexpressing hTRPC6 or expressing shRNA hTRPC6 (KD hTRPC6). (B) Means \pm SEMs from a series of three experiments for control (black), hTRPC6 (gray), and KD hTRPC6 (white).

showed that siRNA against TRPC6 had no effect on TRPC1 or STIM1 levels (data not shown). Huh-7 cells were transiently transfected with siRNA against TRPC1, STIM1, or Orai1, and TG-induced Ca^{2+} content or SOCE amplitude was assessed, as previously described. Control experiments showed that the transfection of cells with an siRNA against mouse TRPC6 had no effect on SOCE amplitude. Transfection with an siRNA against TRPC1 had no effect on SOCE amplitude, whereas transfection with an siRNA against STIM1 or Orai1 resulted in a decrease in SOCE amplitude (about 40% for STIM1 and 30% for Orai1; Fig. 7C). The decrease in SOCE amplitude was smaller than that observed for TRPC6 knockdown, probably because of the lower transient transfection efficiency, as TRPC6 expression was inhibited by 95%, whereas STIM1 expression was inhibited by only 50%. ER Ca^{2+} content was similar in all these

conditions, clearly indicating that the observed decrease in Ca^{2+} influx was not a result of a decrease in ER calcium content.

Calcium channels form signaling complexes in the plasma membrane for the activation of specific transduction cascades.²⁴ STIM1, Orai1, and TRPC6 are therefore probably directly linked to the pathway controlling the cell cycle in cancerous Huh-7 cells, making it possible to activate cell proliferation specifically in these cells. SOCE is involved in the activation and expression of cyclins involved in G1 phase progression such as cyclin D1.²⁵ We therefore investigated whether STIM1, Orai1, and TRPC6 interacted with these proteins to control the rate of cell proliferation. Knocking down the expression of these SOCE components in Huh-7 cells greatly decreased cyclin D1 levels (Fig. 7D), strongly suggesting that as part as a molecular complex with STIM1 and Orai1, TRPC6 directly controls cell proliferation in these cells. As TRPC6 is expressed only in tumoral livers, it seems likely

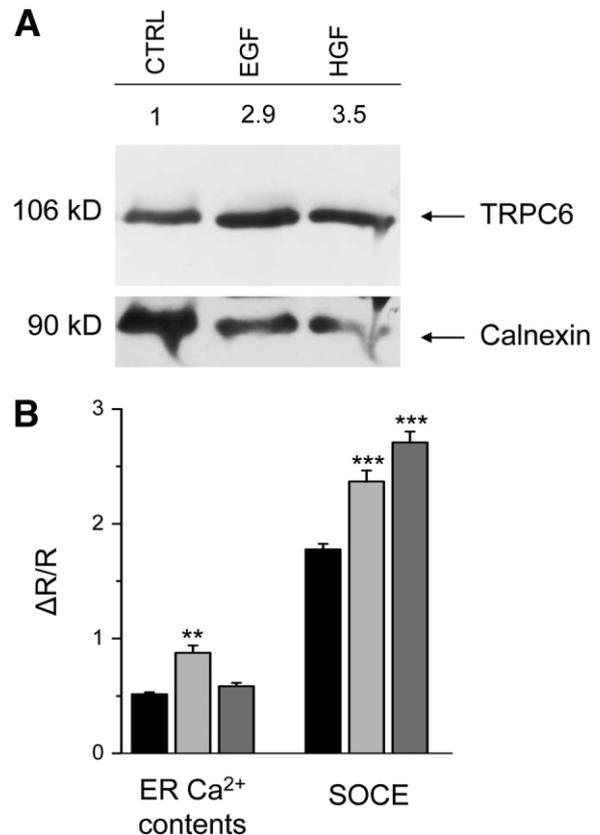


Fig. 6. TRPC6 expression and growth factors. (A) Western blots showing an increase in TRPC6 levels in Huh-7 cells incubated in the presence of EGF or HGF for 24 hours. The numbers above the gels indicate expression with respect to control conditions. (B) Mean results from a series of experiments similar to those shown in Fig. 2A. Values are means \pm SEMs for ER Ca^{2+} content and SOCE amplitude for control (black), EGF (light gray), and HGF (gray).

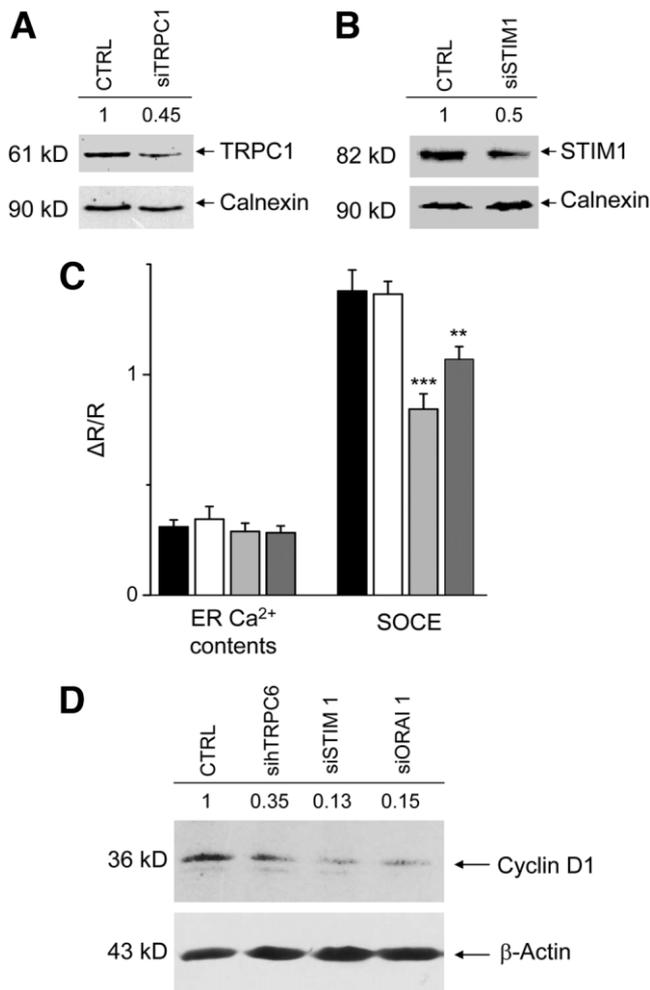


Fig. 7. TRPC1, STIM1, and Orai1 levels and SOCE amplitude. (A, B) Western blots showing the decrease in TRPC1 and STIM1 levels in siTRPC1- and siSTIM1-transfected Huh-7 cells, respectively. (C) Mean results from a series of experiments similar to those shown in Fig. 1. Values are means \pm SEMs for ER Ca²⁺ content and SOCE amplitude in control (black), siTRPC1 (white), siSTIM1 (light gray), and siOrai1 (gray) Huh-7 cells. (D) Blots showing the decrease in cyclin D1 levels in sihTRPC6-transfected, siSTIM1-transfected, and siOrai1-transfected Huh-7 cells. The numbers above the gels indicate relative expression with respect to control conditions.

that this protein plays a major role in the development of human hepatocarcinomas.

Discussion

The nature of the proteins involved in SOCE may differ between cell types. TRPC6 is often described as a channel involved in NCCE,^{21,22} but there is evidence to suggest it is also involved in SOCE in some tissues.^{9,11} Human hepatoma cells express only TRPC6 and TRPC1, and TRPC1 silencing had no effect on SOCE amplitude; therefore, our results clearly demonstrate that SOCE activity is closely related to TRPC6 expression in these cells. STIM1 and Orai1 are alternative calcium channels dis-

playing functional interactions that have recently been implicated in SOCE.^{13,14} The silencing of STIM1 or Orai1 in Huh-7 cells reduced SOCE amplitude. As SOCE amplitude is closely correlated with STIM1 and TRPC6 levels, these two proteins seem to be equally important in this process. Poor efficiency of the siRNA against Orai1 was probably also involved in the 40% reduction of SOCE amplitude in Huh-7 cells. It has been shown that STIM1 binds to TRPC1, TRPC4, or TRPC5 but not to TRPC3, TRPC6, or TRPC7^{26,27} and that Orai1 interacts with TRPC6 as a regulatory subunit.²⁸ However, as TRPC1 silencing has no effect on SOCE amplitude and TRPC4 and TRPC5 are absent from Huh-7 cells, TRPC6, STIM1, and Orai1 may interact to form SOCE channels in these cells, as shown for TRPC1/Orai1.²⁹ STIM1 indirectly regulates TRPC6 by mediating the heteromultimerization of TRPC4 with TRPC6,²⁷ but we found that TRPC4 was absent from Huh-7 cells. TRPC6 levels may also account for the role of this protein in SOCE in Huh-7 cells. It was recently suggested that increased TRPC3 levels lead to a switch from store-dependent to store-independent activation mechanisms.³⁰ However, the amplitude of OAG-induced Ca²⁺ influx was unaffected by the over- or underexpression of TRPC6 in Huh-7 cells.

Cell proliferation depends on calcium influx and ER Ca²⁺ content.³¹ Stable growth is characterized by optimal filling, due to balanced expression of the sarcoendoplasmic calcium ATPase (SERCA)2b Ca²⁺ pump and ER leak channels. Increases in proliferation are characterized by overfilling, due to the overexpression of SERCA2b, and the inhibition of proliferation is characterized by underfilling because of the underexpression of SERCA2b.³² Our work shows that ER content is independent of TRPC6 expression, supporting a role for calcium influx in cell proliferation. We have recently shown that TRPC1/C4 is linked to apoptosis in prostate cancer epithelial cells, whereas TRPC6 activation induces cell proliferation.¹² Thus, the cell proliferation rate depends solely on the amount of calcium entering Huh-7 cells through TRPC6, providing further evidence that localized calcium entry plays a key role in determining cell fate.²¹

TRPC expression has not been studied in detail in the liver. Hepatocytes from adult liver are quiescent, blocked in the G₀ phase of the cell cycle.^{33,34} Low levels of cell proliferation occur in the adult liver to replace the small percentage of the hepatocyte population undergoing apoptosis. We found that adult hepatocytes expressed only STIM1, Orai1, and TRPC5. TRPC5 binds STIM1³⁵ and is associated with SOCE in several cell types. It may therefore be responsible for the calcium entry observed in

freshly dissociated hepatocytes.^{36,37} However, as in Huh-7 cells, the expression of EGF and HGF receptors in hepatocarcinomas probably induces TRPC6 expression, increasing the rate of cell proliferation. It would now be of interest to determine whether the reduction of SOCE activity through this specific channel slows tumor development in human livers.

References

- Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006;127:679-695.
- Gupta PB, Mani S, Yang J, Hartwell K, Weinberg RA. The evolving portrait of cancer metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2005; 70:291-297.
- Balk SD. Calcium as a regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:271-275.
- Takuwa N, Zhou W, Takuwa Y. Calcium, calmodulin and cell cycle progression. *Cell Signal* 1995;7:93-104.
- Thebault S, Zholos A, Enfissi A, Slomianny C, Dewailly E, Roudbaraki M, et al. Receptor-operated Ca²⁺ entry mediated by TRPC3/TRPC6 proteins in rat prostate smooth muscle (PS1) cell line. *J Cell Physiol* 2005; 204:320-328.
- Bird GS, Aziz O, Lievreumont JP, Wedel BJ, Trebak M, Vazquez G, et al. Mechanisms of phospholipase C-regulated calcium entry. *Curr Mol Med* 2004;4:291-301.
- Parekh AB, Putney JW Jr. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 2005;85:757-810.
- Chen J, Barritt GJ. Evidence that TRPC1 (transient receptor potential canonical 1) forms a Ca(2+)-permeable channel linked to the regulation of cell volume in liver cells obtained using small interfering RNA targeted against TRPC1. *Biochem J* 2003;373:327-336.
- Yu Y, Sweeney M, Zhang S, Platoshyn O, Landsberg J, Rothman A, et al. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284: C316-330.
- Enfissi A, Prigent S, Colosetti P, Capiod T. The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells. *Cell Calcium* 2004;36:459-467.
- Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, et al. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13861-13866.
- Thebault S, Flourakis M, Vanoverberghe K, Vandermoere F, Roudbaraki M, Lehen'kyi V, et al. Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells. *Cancer Res* 2006;66:2038-2047.
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J Cell Biol* 2005;169:435-445.
- Soboloff J, Spassova MA, Tang XD, Hewavitharana T, Xu W, Gill DL. Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function. *J Biol Chem* 2006;281:20661-20665.
- Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:937-946.
- Lipskaia L, Pourci ML, Delomenie C, Combettes L, Goudouneche D, Paul JL, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-activated transcription pathways are required for VLDL-induced smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2003;92:1115-1122.
- Bidaux G, Flourakis M, Thebault S, Zholos A, Beck B, Gkika D, et al. Prostate cell differentiation status determines transient receptor potential melastatin member 8 channel subcellular localization and function. *J Clin Invest* 2007;117:1647-1657.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25:402-408.
- Mignen O, Brink C, Enfissi A, Nadkarni A, Shuttleworth TJ, Giovannucci DR, et al. Carboxyamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells. *J Cell Sci* 2005;118:5615-5623.
- Shuttleworth TJ, Mignen O. Calcium entry and the control of calcium oscillations. *Biochem Soc Trans* 2003;31:916-919.
- Ambudkar IS. Ca²⁺ signaling microdomains: platforms for the assembly and regulation of TRPC channels. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:25-32.
- Minke B. TRP channels and Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium* 2006;40:261-275.
- Breuhahn K, Longerich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006;25:3787-3800.
- Ambudkar IS, Ong HL. Organization and function of TRPC channelosomes. *Pflugers Arch* 2007;455:187-200.
- Glassford J, Soeiro I, Skarell SM, Banerji L, Holman M, Klaus GG, et al. BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85alpha subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse B cells. *Oncogene* 2003; 22:2248-2259.
- Huang GN, Zeng W, Kim JY, Yuan JP, Han L, Muallem S, et al. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels. *Nat Cell Biol* 2006;8:1003-1010.
- Yuan JP, Zeng W, Huang GN, Worley PF, Muallem S. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels. *Nat Cell Biol* 2007;9:636-645.
- Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, Birnbaumer L. Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:4682-4687.
- Ong HL, Cheng KT, Liu X, Bandyopadhyay BC, Paria BC, Soboloff J, et al. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components. *J Biol Chem* 2007;282:9105-9116.
- Vazquez G, Wedel BJ, Trebak M, St John Bird G, Putney JW, Jr. Expression level of the canonical transient receptor potential 3 (TRPC3) channel determines its mechanism of activation. *J Biol Chem* 2003;278:21649-21654.
- Humez S, Legrand G, Vanden-Abeele F, Monet M, Marchetti P, Lepage G, et al. Role of endoplasmic reticulum calcium content in prostate cancer cell growth regulation by IGF and TNFalpha. *J Cell Physiol* 2004;201: 201-213.
- Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ca²⁺ homeostasis in apoptotic resistance of prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322: 1326-1335.
- Loyer P, Ilyin G, Cariou S, Glaise D, Corlu A, Guguen-Guillouzo C. Progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes. *Prog Cell Cycle Res* 1996;2:37-47.
- Zimmermann A. Liver regeneration: the emergence of new pathways. *Med Sci Monit* 2002;8:RA53-63.
- Worley PF, Zeng W, Huang GN, Yuan JP, Kim JY, Lee MG, et al. TRPC channels as STIM1-regulated store-operated channels. *Cell Calcium* 2007; 42:205-211.
- Barritt GJ. Receptor-activated Ca²⁺ inflow in animal cells: a variety of pathways tailored to meet different intracellular Ca²⁺ signalling requirements. *Biochem J* 1999;337:153-169.
- Guihard G, Noel J, Capiod T. Ca²⁺ depletion and inositol 1,4,5-trisphosphate-evoked activation of Ca²⁺ entry in single guinea pig hepatocytes. *J Biol Chem* 2000;275:13411-13414.

Résultats supplémentaires 1

Outre le travail sur la lignée d'hépatomes humains Huh-7, nous nous sommes intéressés aux cultures primaires d'hépatocytes humains sains fraîchement isolés. Ce complément d'étude nous a permis d'aborder, sous un autre angle et de manière plus proche d'un état physiopathologique, la relation entre l'apparition de l'expression de TRPC6 et la prolifération de ces hépatocytes sains stimulés par des facteurs de croissance tels que : l'EGF et l'HGF. En réalité, les hépatocytes sains sont quiescents (les cellules sont bloquées en phase G_0) [Loyer *et al.*, 1996 ; Zimmermann, 2002]. Toutefois, il est possible de relancer leur cycle cellulaire par une stimulation par les facteurs de croissance précités. Pour cela, les hépatocytes humains sains fraîchement isolés sontensemencés (jour 0 = J0) dans un milieu contenant du sérum (milieu d'ensemencement : voir matériels et méthodes section I.D). 24 heures après (J1), le milieu d'ensemencement est remplacé par un milieu : dépourvu de sérum et de facteurs de croissance (milieu d'incubation : voir matériels et méthodes section I.D) renouvelé chaque 24 heures pour les hépatocytes humains contrôles ; contenant en fonction des conditions, de l'EGF (20 ng/ml) et/ou de l'HGF (10 ng/ml) renouvelés tous les jours pendant 4 jours (de J1 jusqu'à J5). Pour toutes les expériences suivantes, les différentes conditions seront notées ainsi : CTRL J0 = pour les hépatocytes humains extraits avant d'être mis en culture (à la réception) ; CTRL J5 = pour les hépatocytes humains mis 5 jours en culture sans aucun traitement par les facteurs de croissance ; EGF J5 = pour les hépatocytes humains mis 5 jours en culture avec un traitement par l'EGF pendant 4 jours ; HGF J5 = pour les hépatocytes humains mis 5 jours en culture avec un traitement par l'HGF pendant 4 jours ; EGF & HGF J5 = pour les hépatocytes humains mis 5 jours en culture avec des traitements par l'EGF et l'HGF pendant 4 jours.

A la différence des cellules contrôles (CTRL J5), les hépatocytes traités vont reprendre leur prolifération (Figure A). Cette prolifération est accompagnée par l'apparition de certains marqueurs de prolifération tels que : le Ki-67 (c'est un antigène exprimé dans les phases G_1 , S, G_2 et M du cycle cellulaire mais absent de la phase G_0) (Figure B et E) ou la cycline D1 (détectable essentiellement lors de la phase G_1) (Figure C).

Suite à ces traitements, nous avons regardé l'expression de TRPC6 par comparaison aux conditions contrôles (CTRL J5). L'expression de TRPC6 augmente suite à un traitement de 4 jours par l'EGF (EGF J5) ou par l'HGF (HGF J5) ou par l'EGF et l'HGF (EGF & HGF J5). Ainsi nous pouvons observer l'apparition de TRPC6 en western-blot (Figure D) et en

immunocytochimie (Figure F). Notons toutefois qu'en fonction des différents lots d'hépatocytes humains, l'expression de TRPC6 à J0 (CTRL J0) était très faible voir absente de certains lots.

En conclusion : TRPC6 n'est pas (ou très faiblement) exprimé au niveau des hépatocytes primaires sains fraîchement isolés mais apparaît suite à une stimulation (par des facteurs de croissance) qui provoque la reprise du cycle cellulaire. De ce fait, il existerait une relation étroite entre TRPC6 et l'état prolifératif (prolifération stimulée ou due à une tumeur) du foie.

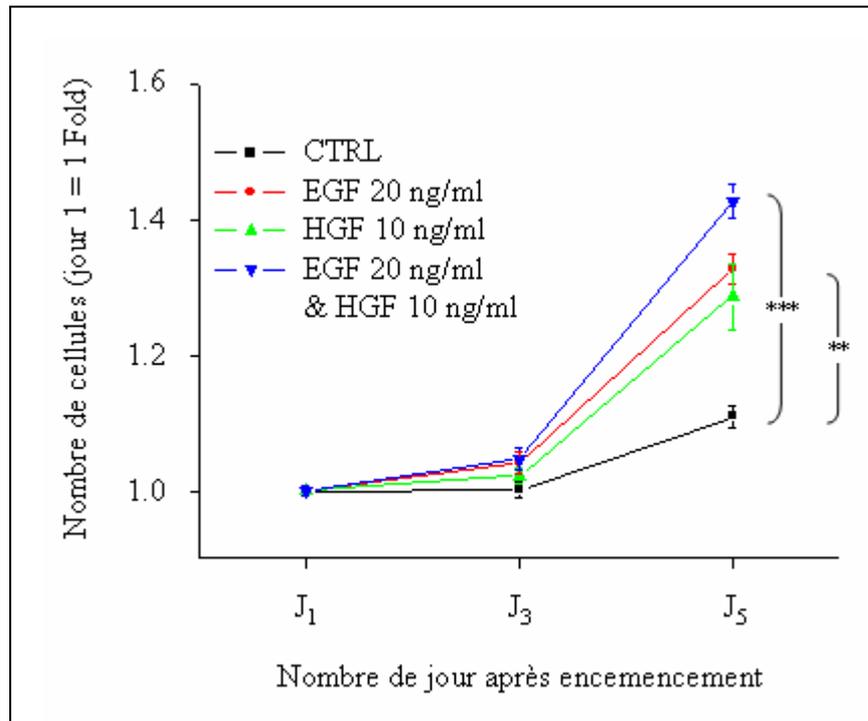


Figure A : Détermination du nombre d'hépatocytes humains sains fraîchement isolés, par densité optique (Kit MTS/PMS), suite à différents traitements de 4 jours.

En noir : conditions contrôles non traitées.

En rouge : les cellules sont traitées par 20 ng/ml d'EGF.

En vert : les cellules sont traitées par 10 ng/ml d'HGF.

En bleu : les cellules sont traitées à la fois par 20 ng/ml d'EGF et par 10 ng/ml d'HGF.

Traces moyennées sur 3 expériences différentes : $p < 0.01$: ** ; $p < 0.001$: ***.

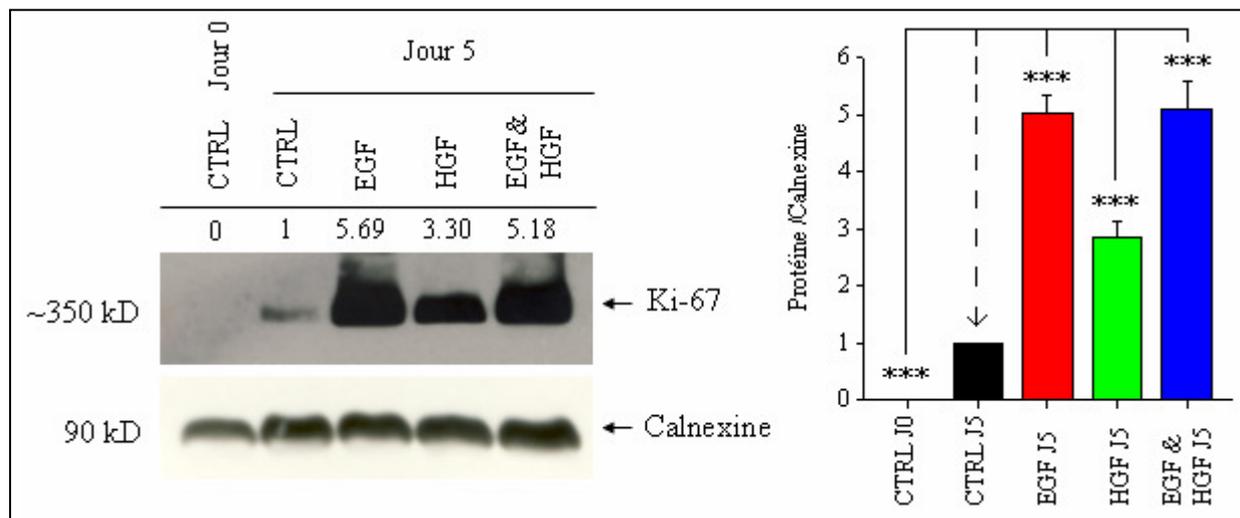


Figure B : Expression de l'antigène de prolifération Ki-67 en fonction des traitements.

A gauche : western-blot montrant l'apparition du Ki-67, par rapport au CTRL J5, dans les hépatocytes humains sains fraîchement isolés, suite à différents traitements de 4 jours.

A droite : Moyennes des résultats de 3 expériences sur 3 lots différents d'hépatocytes humains sains fraîchement isolés. $p < 0.001$: ***.

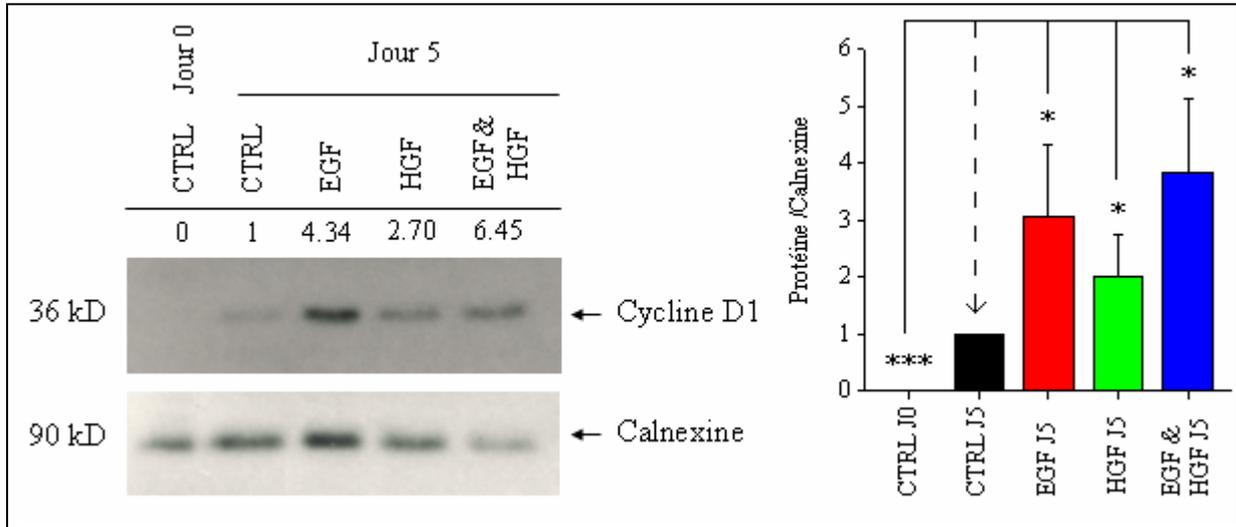


Figure C : Expression de la cycline D1 en fonction des traitements par rapport au CTRL J5.

A gauche : western-blot montrant l'apparition de l'expression de la cycline D1, dans les hépatocytes humains sains fraîchement isolés, suite à différents traitements de 4 jours.

A droite : Moyennes des résultats de 3 expériences sur 3 lots différents d'hépatocytes humains sains fraîchement isolés. $p < 0.05$: * ; $p < 0.001$: ***.

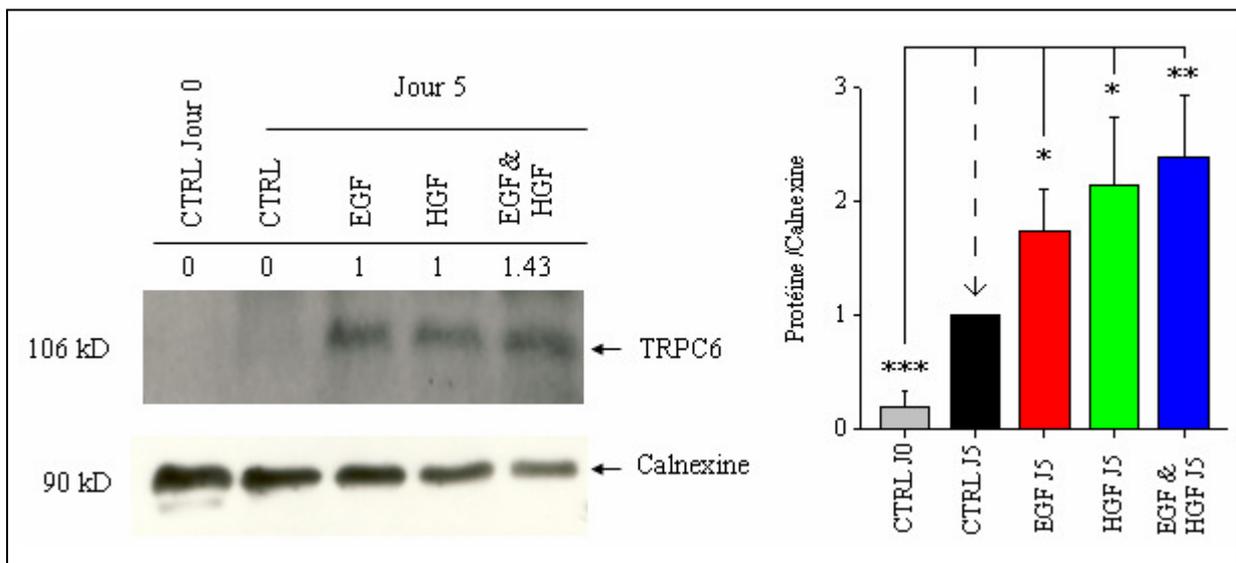


Figure D : Expression du canal TRPC6 en fonction des traitements par rapport au CTRL J5.

A gauche : western-blot montrant l'apparition de TRPC6, dans les hépatocytes humains sains fraîchement isolés, suite à différents traitements de 4 jours.

A droite : Moyennes des résultats de 3 expériences sur 3 lots différents d'hépatocytes humains sains fraîchement isolés. $p < 0.05$: * ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.001$: ***.

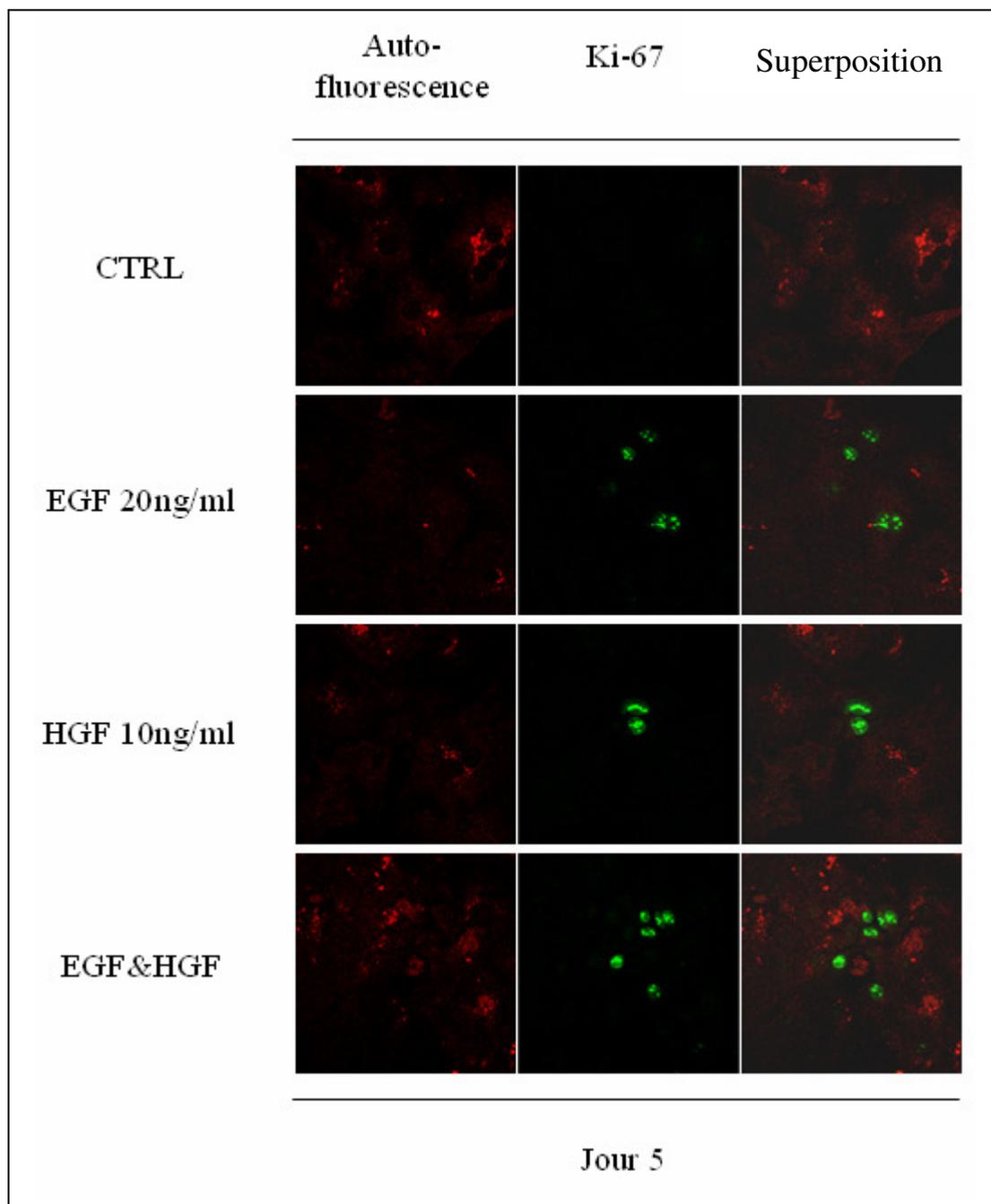


Figure E : Immuno-détection du Ki-67 en fonction des traitements.

Colonne de gauche : auto-fluorescence des hépatocytes humains sains fraîchement isolés.

Colonne du milieu : marquage nucléaire typique, par l'anti-Ki-67 (en vert), des hépatocytes humains sains fraîchement isolés suite à différents traitements de 4 jours. A noter que ce marquage est absent des cellules non traitées.

Colonne de droite : Fusion de l'auto-fluorescence et du marquage par l'anti-Ki-67.

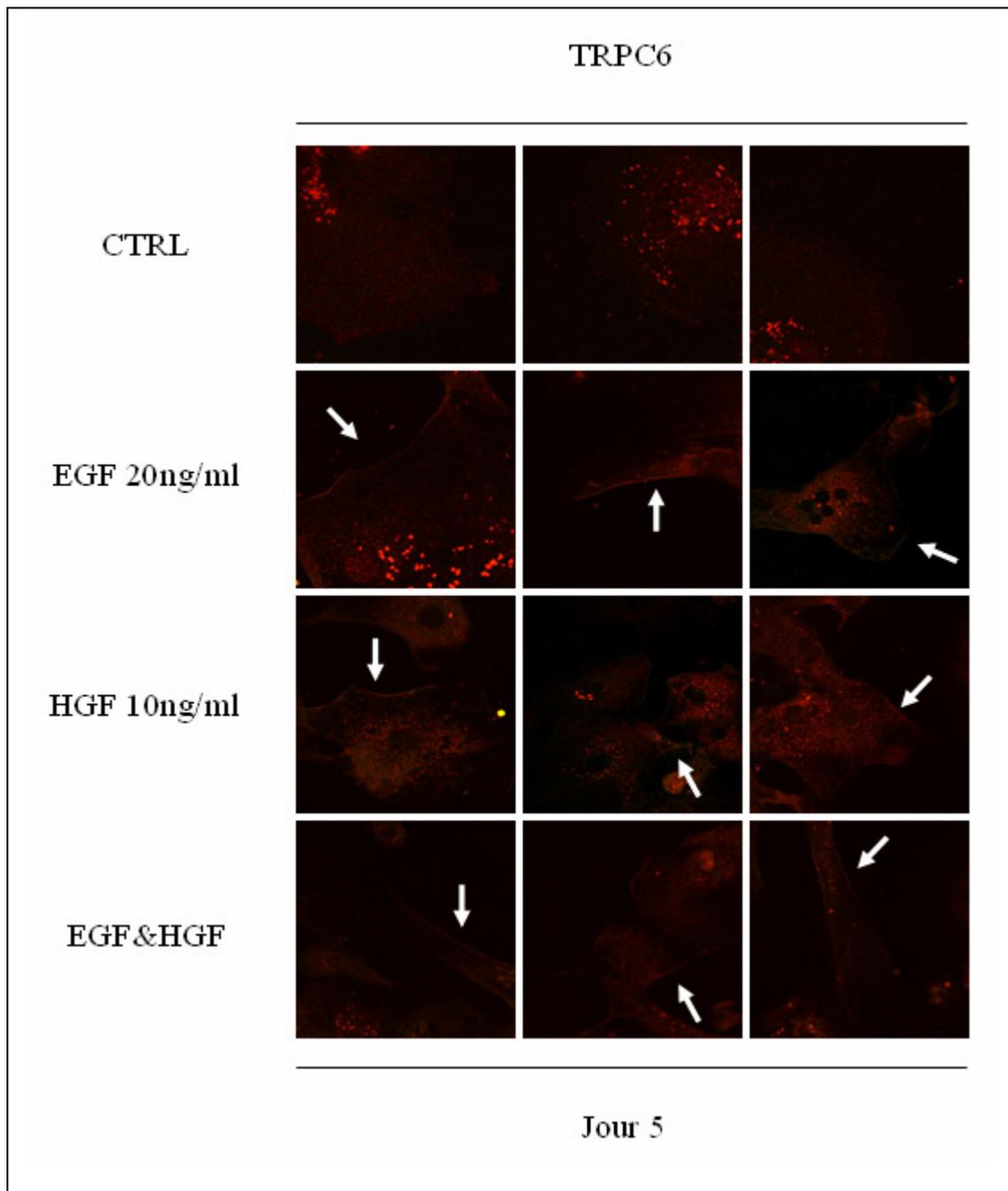


Figure F : Immuno-détection de TRPC6 en fonction des traitements.

L'anticorps TRPC6 montre un marquage membranaire fin (en rouge). En plus du marquage par l'anti-TRPC6, il existe un marquage rouge cytosolique dû à l'auto-fluorescence des hépatocytes humains sains fraîchement isolés.

3 champs, d'une même condition, sont représentés en fonction des différents traitements de 4 jours et les flèches blanches indiquent la présence membranaire de TRPC6.

Article 2

« Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells »

Charbel El Boustany, Maria Katsogiannou, Philippe Delcourt, Etienne Dewailly, Natalia Prevarskaya, Thierry Capiod.

Soumis à JBC.

Nous nous sommes intéressés dans cet article au rôle de STIM1, STIM2 et Orai1 dans le contrôle de la prolifération et de l'amplitude de l'entrée capacitive dans les cellules HEK293.

Pour mieux disséquer la relation entre l'entrée de calcium et la prolifération cellulaire nous avons eu recours à la lignée HEK293. Cette lignée, par rapport aux lignées d'hépatomes humains, possède la propriété d'être facilement maniable au niveau expérimental. En effet, le taux de transfection transitoire par des siRNA dans les Huh-7 dépasse rarement les 20 %. Alors, pour pouvoir mener à bien ce travail, il était pratiquement difficile de le poursuivre dans les Huh-7, puisqu'il nécessite une quantité considérable de transfection par divers siRNA seuls ou combinés. De plus, même si l'imagerie calcique nous permet de suivre les variations de la concentration calcique cytosolique et d'évaluer la vitesse d'entrée du calcium (reflet du flux calcique à travers un canal à un instant donné), il est préférable de pouvoir mesurer le courant SOC, par la technique de patch-clamp, en fonction des conditions. Toutefois, dans les hépatomes humains, il est particulièrement difficile d'obtenir un « Giga seal » et un courant dépourvu de toute fuite, nécessaire pour observer un courant de faible amplitude tel que le SOC. Pour cela, nous sommes tournés vers la lignée HEK293 possédant un taux de transfection supérieur à 80 % et une grande facilité d'obtention d'un « Giga seal » et d'un courant dépourvu de toute fuite nécessaire pour mesurer un courant SOC.

La prolifération des cellules est dépendante du cycle cellulaire ainsi, une cellule en croissance (sortie de la phase quiescente G_0) passe, entre sa formation par division à partir d'une cellule mère et le moment où cette cellule a fini de se diviser en deux cellules filles, par 4 étapes majeures. Tout d'abord une phase de croissance de la cellule (G_1) suivit d'une phase de réplication de l'ADN (S) et d'une phase de croissance et de préparation à la mitose (G_2). A ces 3 phases succède une 4^{ème}, la mitose (M), qui est la division cellulaire proprement dite.

L'entrée dans ces différentes phases nécessite globalement 2 grandes familles de protéines : les cyclines et les CDK (Cyclin-Dependent Kinases). Les différentes cyclines D, E, A

et B forment des complexes avec les CDK4 et 6 (cyclines D), les CDK2 (cyclines E et A) et les CDK1 appelées également *cdc2* (cyclines B). Ces complexes sont nécessaires pour le passage d'une phase à une autre, par exemple le complexe cyclineB-*cdc2* est nécessaire à l'entrée en phase M (Figure I). Enfin, ces complexes peuvent être régulés par des protéines dont l'activité est dépendante du calcium telles que la calmoduline (pour revue : [Kahl and Means, 2003]) ou la calcineurine [Mignen *et al.*, 2003].

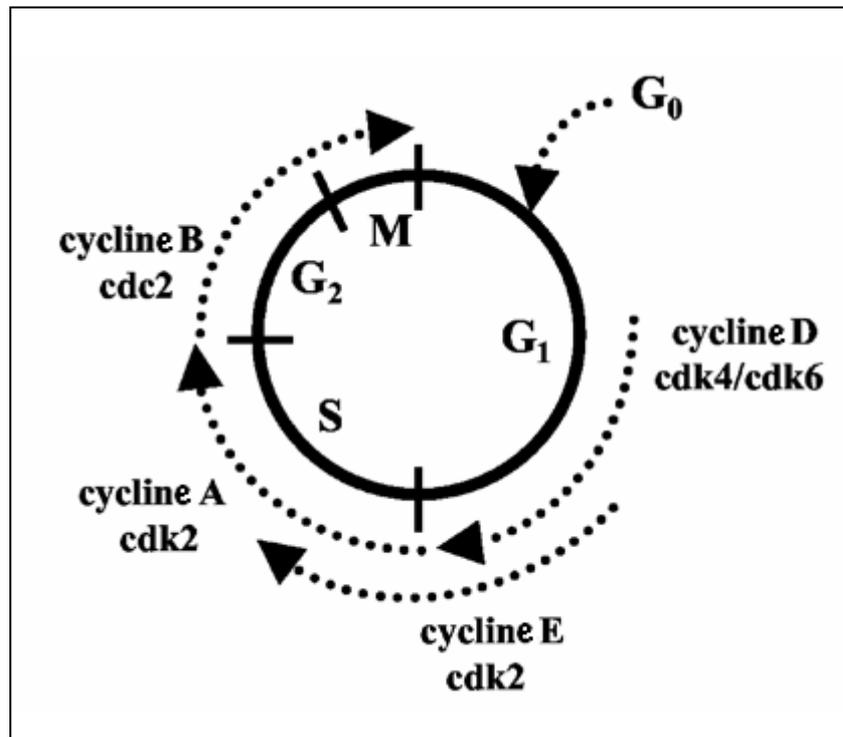


Figure I : Contrôle des transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire par les complexes CYCLINE/CDK (s) chez les mammifères.

(Modifiée à partir de : [Kahl and Means, 2003]).

Les variations calciques cytosoliques transitoires de même que l'augmentation de la concentration calcique cytosolique basale peuvent jouer un rôle majeur dans la prolifération et la division cellulaire. Ces variations transitoires sont observées dans différentes phases du cycle cellulaire [Galione *et al.*, 1991 ; Miyazaki *et al.*, 1992]. L'origine des variations calciques cytosoliques transitoires est la libération puis la recapture du calcium réticulaire ainsi, dans les ovocytes, ce « cycle calcique » peut durer jusqu'à 4 heures [Ozil *et al.*, 2005]. Les augmentations transitoires du calcium, induisant des effets à long terme tel que la prolifération des hépatomes humains, peuvent être maintenues grâce à une entrée calcique soutenue [Enfissi *et al.*, 2004]. 2 mécanismes majeurs, la CCE et la NCCE, sont connus pour être impliqués dans ce processus

[Munaron *et al.*, 2004 ; Thebault *et al.*, 2006]. Des études ont démontré que l'activité et l'expression des cyclines A, E et D sont dépendantes de l'activation d'une entrée calcique de type SOCE [Tomono *et al.*, 1998] et cette activation est sous le contrôle de la calcineurine [Mignen *et al.*, 2003]. De plus, les inhibiteurs de la CCE bloquent l'induction et l'activation de ces cyclines [Tomono *et al.*, 1998 ; Glassford *et al.*, 2003]. Enfin, le temps d'activation des cyclines D, suite à une privation de sérum, correspond au temps de la mise en place de la CCE [Tomono *et al.*, 1998]. Dans le même esprit, j'ai démontré au cours de ma thèse que l'inhibition de TRPC6 ainsi que de STIM1 et de Orai1 engendre une diminution de l'expression de la cycline D1 donnant lieu à une réduction de la prolifération des Huh-7 [El Boustany *et al.*, 2008].

En plus de l'implication de STIM1 et Orai1 dans le SOC et la prolifération de certains types cellulaires [Berra-Romani *et al.*, 2008 ; El Boustany *et al.*, 2008], STIM2 peut également jouer un rôle dans la CCE [Parvez *et al.*, 2008] et la prolifération des cellules endothéliales [Abdullaev *et al.*, 2008]. Pour cela, nous nous sommes intéressés à l'expression de ces 3 protéines dans la progression du cycle cellulaire.

Nos résultats montrent que le blocage dans différentes phases du cycle cellulaire, par une privation de sérum pendant 48 heures (arrêt en G₁) [Tani *et al.*, 2007] ou par des drogues telles que l'hydroxyurée à 1 mM (arrêt en S) [Nakamura *et al.*, 2001] et le RO-3306 à 10 μM (arrêt en G₂) [Vassilev *et al.*, 2006], induit systématiquement une diminution du courant SOC (enregistrée en potentiel imposé) et de la CCE (enregistrée en imagerie calcique). Cette diminution est réversible 4 heures après l'arrêt du traitement suite à la remise en SVF. De plus, l'expression de Orai1, mais non celle de STIM1 ou STIM2, est diminuée en fonction des traitements et elle réapparaît 4 heures après l'arrêt du traitement.

Nous avons également démontré que seule l'inhibition de l'expression de Orai1 ainsi que de STIM2 par des siRNA, mais non celle de STIM1, diminuait la prolifération des HEK293 même si la destruction des 3 protéines entraîne une diminution du courant SOC.

En conclusion, 2 hypothèses principales découlent de ces résultats. La première suggère que Orai1 et STIM2 formeraient un complexe pouvant être impliqué indépendamment de STIM1 dans la prolifération des HEK293. La seconde suggère que le SOC n'a pas de rôle direct dans la prolifération. Shuttleworth a récemment suggéré que Orai1 et STIM1 forment aussi la base moléculaire de I_{arc}, l'archétype de la NCCE [Shuttleworth, 2009]. Il existe cependant peu de données sur STIM2 et la NCCE [Parvez *et al.*, 2008]. Le rôle du SOCE semble néanmoins primordial puisque la prolifération des cellules HEK293 est bloquée par les inhibiteurs de SOCE comme le CAI ou le 2-APB [Mignen *et al.*, 2005]. La nouvelle question qui se pose maintenant est de savoir s'il existe plusieurs types de SOCE pour rendre compte de la diversité des réponses physiologiques où ce canal joue un rôle important. Les SOCE pourraient être différentes par leur

localisation membranaire dans des radeaux lipidiques bien précis, leur association à des voies de transductions différentes, leur composition moléculaire. Ces différentes hypothèses doivent être testées pour mieux connaître cette relation particulière entre l'entrée de calcium et la prolifération cellulaire.

DIFFERENTIAL ROLES OF STIM1, STIM2 AND ORAI1 IN THE CONTROL OF CELL PROLIFERATION AND SOCE AMPLITUDE IN HEK293 CELLS.

Charbel El Boustany, Maria Katsogiannou, Philippe Delcourt, Etienne Dewailly, Natalia Prevarskaya, and Thierry Capiod

INSERM, U800, IFR143, Villeneuve d'Ascq, F-59655 France; Univ Sciences et Technologies Lille 1, Villeneuve d'Ascq, F-59655 France

Running Head: SOCE and cell proliferation

Address correspondence to: Capiod Thierry, INSERM U800, Laboratoire de Physiologie Cellulaire, Bât. SN3, Université Sciences et Technologies Lille 1, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France. Fax: +33 (0) 320434066; e-mail: thierry.capiod@univ-lille1.fr

STIM1, STIM2 and Orai1 constitute the molecular basis for store-operated calcium entry (SOCE) and we have investigated their role in cell proliferation and cell cycle progression in HEK293 cells. 48-hour serum deprivation, and a 24-hour treatment with 1mM hydroxyurea or with 10 μ M RO-3306—a cyclin-dependent kinase 1 inhibitor— induced cell cycle block in G₁, S and G₂/M, respectively. SOCE amplitude, monitored in whole-cell voltage clamped and fura2-loaded cells, was markedly reduced (60 to 70%) in all conditions, with full reversibility within 4 hours. Silencing of Orai and STIM1 using siRNA resulted in a large inhibition of SOCE (70 to 80%) whereas siSTIM2 had only a small effect (30%). However, the cell population doubling time was not affected in siSTIM1 cells (18h, the same as in control cells) but was increased in both siOrai1 cells (29h) and in siSTIM2 (23h) even when combined with siSTIM1. This suggests that STIM1 plays no role in cell proliferation in HEK293 cells. Finally, the cell cycle block induced SOCE inhibition was associated with reduced Orai1 expression with full recovery within 4 hours, whereas the expression of STIM1 and STIM2 remained unaltered. These observations reveal a tight relation between cell proliferation, calcium entry and Orai1 expression in HEK293 cells.

Both increases in the basal cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) and $[Ca^{2+}]_{cyt}$ transients may play a major roles in cell proliferation and division. Calcium transients are observed at various stages of cell cycle and more specifically during late G₁ phase, before and during mitosis (1,2). These calcium transients are mainly due to calcium release and reuptake by the endoplasmic reticulum (ER) and are observed over periods of

hours in oocytes (3). Calcium entry sustains the ER Ca^{2+} load and thereby helps to maintain these calcium transients for such a long period. Calcium influx also controls cell growth and proliferation in several cell types (4). Store-operated calcium entry (SOCE) and non capacitative calcium entry (NCCE) are involved in this process (5,6), and we have recently showed that TRPC6, together with STIM1 and Orai1, increase cyclin D1 expression and therefore cell cycle progression in the human hepatoma cell line Huh-7 (7). This confirmed previous findings that the expression and activities of cyclins A, D and E are dependent on SOCE activation. First, SOCE activates calcineurine (8) which in turn controls the activities of cyclin A and E (9). Second, SOCE blockers inhibit induction and activation of cyclins A, D and E (9,10). Third, the timing of cyclin D activation after serum addition matches the timing of increases in amplitude of SOCE (9). This relation between the expression and activity of cyclins and calcium channels also suggests that calcium entry may be needed only at particular stages of the cell cycle. Consistent with this idea, the expression of L-type and T-type calcium channels (11) and SOCE amplitude (12,13) fluctuate along the cell cycle. STIM1, Orai1 and also STIM2 are central to SOCE activity (14), and are involved in cell proliferation in some but not all cell types (7,15-20). Cell proliferation may also result from sustained $[Ca^{2+}]_{cyt}$ increases and it was recently proposed that the resting calcium permeability of the plasma membrane is controlled by STIM2 expression (21). Also, silencing of STIM2 results in a block of endothelial cell proliferation (20).

A change in STIM1, STIM2 or Orai1 activity or expression may well be the cause of the modulation in SOCE amplitude observed previously after cell cycle block in G₁, S or G₂/M

(12,13). We therefore investigated whether the expression of STIM1, STIM2 and Orai1 is related to cell cycle progression, and conversely whether extinction of their expression blocks cell proliferation.

Cell cycle block and synchronization of HEK293 cells can be achieved by various means (22). Cell cycle block in G_1 can be obtained by serum deprivation for 48 hours (13), in S phase by 24 hour-treatment with hydroxyurea (23), and in G_2/M by 24 hour-treatment with the selective CDK1 inhibitor RO-3306 (24). We monitored SOCE amplitude and ER Ca^{2+} load using whole-cell voltage clamp and calcium video-imaging in cells blocked by these treatments (in G_1 , S and G_2/M), and 4 hours after release from these blocks. Calcium channel expression after serum addition increased rapidly, within less than 4 hours, as reported elsewhere for TRPC6 in vascular smooth muscle cells (25). This is consistent with the major role of these channels in providing the calcium increases needed to trigger cell proliferation.

We demonstrate that SOCE and the ER Ca^{2+} load depend on cell cycle progression. They were similarly reduced whatever the phase in which cell cycle was blocked, suggesting that cells adapt their calcium needs to their physiology. To do this, cells quickly modulate the expression of plasma membrane calcium channels, and we show that Orai1 expression was decreased when the cell cycle was blocked. Orai1 acts together with STIM2 to control cell proliferation in HEK293 cells whereas STIM1 appears not to play a role in this process.

Experimental Procedures

Cell culture HEK293 cells stably transfected with the human m3 muscarinic receptor (HEKm3) were used as described previously (26).

Calcium imaging HEKm3 cells were loaded for 45 minutes with $4\mu M$ fura2-AM at $37^\circ C$ and fluorescence was recorded as described previously (7). Experiments were done at $37^\circ C$.

Whole-cell voltage clamp and capacitance measurements Whole-cell voltage-clamp experiments were performed with HEKm3 cells at a holding potential of $0mV$ at $37^\circ C$. Currents were recorded by a patch-clamp technique from a

voltage ramp ($-100mV$ to $+60mV$) applied every 2 seconds. The SOCE current was recorded at $-100mV$ and no change in outward currents, at $+60mV$, was observed in cells used in this study. Signals were amplified using an Axopatch 200B amplifier, and the data were digitized with Digidata 1322A and recorded with PCLAMP-software (Axon Instruments, Molecular Devices, USA). A P-97 pipette puller (Sutter Instrument, CA, USA) was used to make patch pipettes from borosilicate glass capillaries (Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Germany). The resistance of the pipettes, filled with the intracellular solution used, varied from 3 to $6 M\Omega$.

The extracellular solution for patch-clamp recordings was: $116mM$ NaCl, $10mM$ HEPES, $5.6mM$ KCl, $1.2mM$ $MgCl_2$ and $10mM$ $CaCl_2$ (pH 7.3 adjusted with TEA-OH, osmolarity $320mOsm/l$ adjusted if necessary with d-mannitol). The intracellular solution for SOC current recording was: $120mM$ CsMet, $10mM$ HEPES, $1mM$ $MgCl_2$, and $10mM$ BAPTA (1.2-bis(2-amonophenoxy)ethane N,N,N',N'tetraacetic acid), pH 7.2 adjusted with CsOH and osmolarity $295mOsm/l$ adjusted with d-mannitol. In certain conditions Adenophostin A (Calbiochem, VWR International S.A.S, Fontenay-aux-Roses, France) was added to a final concentration of $1\mu M$. All other reagents and chemicals were provided by Sigma Aldrich France (Saint-Quentin Fallavier, France). Capacitance values were automatically calculated by PCLAMP software.

Western-blots The cell culture medium was discarded and flasks were washed with iced NaCl solution. Cellular proteins were then extracted using RIPA buffer [1% (v/v) Triton X-100, 1% (w/v) Na deoxycholate, $150mM$ NaCl and $20mM$ sodium or potassium phosphate, pH 7.2] with $5mM$ EDTA and anti-protease cocktail (P8340; Sigma) for 30 min on ice. After scrapping, any insoluble material was removed by centrifugation at $15000 g$ for 15 min at $4^\circ C$ and the amount of protein was assessed by the BCA method (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, U.S.A.). Equal amounts of proteins were subjected to SDS/PAGE (10% gels). The proteins were transferred onto nitrocellulose membranes using a semi-dry electroblotter (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Membranes were saturated in non-fat milk and incubated overnight with diluted primary

antibodies: Rabbit anti-Orai1 and anti-STIM2 (ProSci Inc, Interchim, Montluçon, France) and mouse anti-STIM1 (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France). The membranes were then washed with a TNT buffer (15mM Tris/HCl, pH 8, 140mM NaCl and 0.05% Tween 20) and treated with the corresponding horseradish peroxidase-linked secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit, Pierce, Thermo Fischer Scientific, Brébières, France) for 1 h at room temperature. After several washes in TNT buffer, the membranes were processed for chemiluminescent detection using the Super Signal West Dura chemiluminescent substrate (Pierce), according to the manufacturer's instructions. The membranes were then exposed to X-Omat AR films (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, U.S.A.). The intensity of the signals was evaluated by densitometry and semi-quantified as the intensity of band corresponding to the protein of interest divided by the intensity of the band corresponding to actin for each experiment. Each experiment presented was repeated at least twice.

Cell transfection Ready-to-use siOrai1, siSTIM1 and siSTIM2 (50 nM siRNA) were transiently transfected into the cell line HEK293, using the HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen SA, Courtaboeuf, France). Control siRNA experiments were performed by transfecting siRNA against Luciferase.

siRNA Sequences

siLuciferase (siCTRL)

CUUACGCUGAGUACUUCGA

siOrai1

UGAGCAACGUGCACAAUCU

siSTIM1

GGCUCUGGAUACAGUGCUC

siSTIM2

AACTGAGAAGCAGTTGGTCTG

Cell cycle The numbers of cells in phases G₁, S and G₂/M were assessed by studying the cell cycle. Cells were harvested and washed with phosphate-buffered saline and fixed overnight with 70% ice-cold ethanol at -20°C. The fixed cells were stained with a solution containing Propidium Iodide (25µg/ml), RNase A (2µg/ml) and Triton x-100, and then analyzed with a Becton Dickinson FACScan cytofluorometer.

Cell proliferation Cells were seeded in 96-well plates at a density of 5000 cells/cm² in a final volume of 200µL of culture medium. Cells were transfected as indicated above and the proliferation rate was determined daily for 5 days, using an MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) reagent kit (Promega France, Charbonnières-les-Bains, France).

Materials All culture media were obtained from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Thapsigargin was obtained from Alomone Laboratories (Jerusalem, Israel), and fura-2/AM was from Molecular Probes Europe (Leiden, The Netherlands). All other reagents were from Sigma Adrich France (Saint-Quentin Fallavier, France).

Statistics Data were analyzed and curves fitted with Microcal Origin software (Microcal Software Inc, Northampton, MA, USA). An unpaired t test was used and results are expressed as means ± SEM., with p<0.5 (*), p<0.1 (**) and p<0.01 (***).

RESULTS

Serum-free treatment for 48 hours resulted in HEK293 cells being blocked in the G₁ phase of the cell cycle as assessed by FACS (Fig 1A): the proportion of cells in G₁ phase increased from 55 ± 1 to 68 ± 1 % whereas those in G₂/M phase fell from 28 ± 2 to 15 ± 2 %; the percentage cells and in S phase remained unchanged. SOCE was investigated under these conditions and 4 hours after the addition of 10% serum to the cell culture medium to assess the kinetics of cell cycle block reversal. SOCE was monitored using calcium imaging in fura-2-loaded cells and whole-cell voltage clamp. Thapsigargin (TG; 1µM) was added to the calcium-free medium used to deplete intracellular calcium stores and SOCE was measured after addition of 2mM Ca²⁺ in calcium imaging experiments using a previously described protocol (7). Stores were depleted from whole-cell voltage clamped HEK293 cells with pipettes containing 10mM intracellular BAPTA and 1µM adenophostin A. Adenophostin A was added to maximize SOCE amplitude as previously described (27,28). Serum starvation for 48h reduced calcium influx into cells by approximately

60% as assessed by imaging and patch-clamp experiments (Fig 1B, 1C, respectively). Maximal amplitudes were restored within 4 hours of serum addition. SOCE amplitudes in the absence of adenophostin A were 0.97 ± 0.14 pA/pF (n=15) for in controls, 0.42 ± 0.06 (n=12) after serum starvation and 0.99 ± 0.21 (n=10) 4 hours after serum addition. ER Ca^{2+} content was determined from the peak of TG-induced responses in Ca-free solution: it was reduced by 50% in the absence of serum for 48 hours and recovered more slowly than calcium influx after the addition of serum 4 hours later (Fig 1B). TG-sensitive Ca^{2+} stores had fully recovered after less than 24 hours (data not shown).

Cell cycle block in S phase was obtained by a 24-hour treatment with 1mM hydroxyurea (HU). This caused an increase in the percentage of cells in S phase from 15 to 50 % and a decrease in cells either in G₁ or G₂/M phases as assessed by FACS (Fig 2A). Calcium entry was reduced after 24 hours of treatment of cells with 1mM HU (Fig 2B) and whole cell voltage clamp recordings showed a 50% reduction of calcium currents with full recovery within 4 hours (Fig 2C). SOCE amplitudes in the absence of adenophostin A were 0.92 ± 0.04 pA/pF in controls (n=12), 0.46 ± 0.11 in serum-deprived cells (n=10) and 1.02 ± 0.11 4 hours after serum addition (n=10). TG-sensitive Ca^{2+} stores were reduced by 50% after 24 hours in the presence of 1mM HU (Fig 2B).

We used the cdk1 inhibitor RO-3306 (10 μ M) to obtain a G₂/M cell cycle block and FACS experiments showed a massive shift to this phase (Fig 3A). Calcium imaging experiments showed a clear inhibition of SOCE amplitude by about 60% (Fig 3B) which was confirmed in whole-cell voltage clamped cells (Fig 3C). This effect was rapidly reversible with full recovery within 4 hours, confirming the reversible effect of the cdk1 inhibitor (24). SOCE amplitudes in the absence of adenophostin A were 1.02 ± 0.07 in controls (n=12), 0.34 ± 0.17 in serum-deprived cells (n=11) and 0.88 ± 0.25 (n=10) 4 hours after serum addition. TG-sensitive Ca^{2+} stores were reduced by 35% after 24 hours in the presence of 10 μ M RO-3306 with almost full recovery within 4 hours (Fig 3B).

Cell capacitance was measured in whole-cell configuration in all conditions (Fig 4). Cell capacitance can be used as an index of the cell

surface area. We observed a decrease in the surface area of cells kept in serum-free medium for 48 hours, no significant effects in HU-treated cells, and cell surface doubling following the presence of 10 μ M RO-3306 for 24 hours. Capacitance was between 10 and 38 pF in control cells, and rose to between 20 and 53 pF in RO-3306 treated cells with a fast recovery to 18 to 35 pF within 4 hours. Cell shape and size were clearly modified in the presence of the cdk1 inhibitor (supp data Fig 1). Video-imaging was performed up to 6 hours after the release from RO-3306-induced cell cycle block and we observed full cell division of several cells (data not shown).

STIM1, STIM2 and Orai1 play major roles in SOCE. We studied the consequences of silencing STIM1, STIM2 and Orai1 on cell proliferation and SOCE amplitude (silencing of protein production following transfection was monitored by western blotting; Fig 5A). SOCE amplitudes in all conditions in whole-cell voltage clamped cells were substantially reduced by silencing of any of STIM1, STIM2 and Orai1 (Fig 5B). Cell proliferation was reduced in siOrai1 as well as siSTIM2 transfected cells whereas siSTIM1 had no effect. Cell proliferation was similarly inhibited by siRNA against both STIM1 and STIM2 and siRNA against STIM2 only, suggesting that STIM1 is not involved in cell proliferation in HEK293 cells (Fig 5C).

As calcium entries and cell proliferation appeared to be associated, we investigated whether cell cycle block affected the expression of STIM1, STIM2 and Orai1. Proteins from HEK293 cells kept in serum-free conditions, in the presence of HU, and in the presence of RO-3306 were subjected to western blotting, with kinetics of reversal from cell cycle block also assessed. Orai1 expression was lower in all conditions than in controls and fully recovered within 4 hours after cell cycle release; STIM1 and STIM2 expression were unaffected by the treatments (Fig 6). RT-PCR experiments showed that the levels of Orai1 mRNA remained the same whatever the conditions (supp data Fig 2), suggesting that the control of Orai1 expression is at the translational; this would be consistent with the rapidity of recovery of Orai1 expression.

DISCUSSION

Cell proliferation and calcium entry are intimately related and our study shows that STIM2 and Orai1 are the two main actors in these processes in HEK293 cells. These two proteins play a major role in endothelial cells proliferation with minor STIM1 involvement (20). We showed previously that TRPC6 together with STIM1 and Orai1 are needed for human hepatoma cell proliferation (7), and other studies have implicated TRPC1 rather than TRPC6 in this plasma membrane complex (29). Possibly, the molecular nature of the calcium channels involved in cell proliferation might be tissue-specific. However, note that Orai1 forms the core of all these calcium channels as silencing of this protein always results in a clear decrease in cell proliferation rate.

SOCE and NCCE have been both proposed to account for cell proliferation (6). As low frequency calcium transients are usually associated with cell cycle, NCCE was the most likely candidate as intracellular calcium store depletion was thought to result from sustained calcium signals following cell stimulation with high agonist concentrations. However, SOCE is clearly involved in cell proliferation in several cell types (7,20,30,31). STIM1 is involved in both SOCE and NCCE (32) but we show here that HEK293 cell proliferation rates were the same over five days in the presence or absence of STIM1. Recent work suggested that STIM1 silencing may result in a 20% reduction in cell proliferation in endothelial cells but the day to day increase indicated that this effect was transient and only occurred two to three days after transfection (20). However, other studies of neointima formation in rat clearly implicate STIM1 in cell proliferation (33,34). Substitution of STIM1 by STIM2 may explain why in our study STIM1 knock-down had no effect on cell proliferation. However, although STIM2 knock-down significantly reduced cell proliferation rates as in endothelial cells (20), silencing both STIM1 and STIM2 showed no greater effect, suggesting that STIM1 plays no role in HEK293 cell proliferation. The issue is to identify which calcium entry is responsible for cell proliferation and determine the molecular nature of the channels involved. First, Orai1 silencing blocks both SOCE and cell proliferation. Therefore, STIM2 may be associated with Orai1 to form a specific SOCE pathway involved in cell proliferation. Second, it was recently suggested that STIM2 regulates

calcium entry independently of STIM1, and can induce sustained elevation of basal $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ upon small ER calcium depletion (21). This would be similar to T-type voltage-gated calcium channels letting calcium in at resting membrane potential due to their intrinsic properties. A steady-state calcium current through T-type channels, i.e. a T window current, can be generated at membrane potential between -75 and -35mV and therefore expression of T-type voltage-gated calcium channels during G1 and S phases may result in a sustained calcium influx needed for cell cycle progression (11). Third, STIM2 may form a complex with Orai1 to constitute the store-independent calcium entry (14). The low calcium transient frequency and the slow and sustained elevation of basal $[Ca^{2+}]_{\text{cyt}}$ like those observed during cell division may consequently result from this plasma membrane complex. Data from this study does not allow us to discriminate between these three possibilities. Further experiments are needed to demonstrate whether NCCE is decreased in STIM2 knock-down cells, and to establish whether or not the nature of the store-independent calcium entry is related to Iarc.

STIM1 and Orai1 are able to form complexes with TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC5 and TRPC6 (20,35-38). These different TRPC are present in HEK293 cells and we cannot exclude the possibility that they play a role in cell proliferation; indeed, TRPC1, TRPC4 and TRPC6 have been clearly associated with this physiological process in several other cell types (for review, see (39)).

The effects of cell cycle block on SOCE amplitude have been investigated previously (12,13). Several approaches have been used to block cell cycle, but it seems clear that a block in G1 results in a large reduction in SOCE amplitude in all cases. Recovery from G1 block was much faster in our study (4h) than in RBL cells (16h) (12), and earlier experiments on cell population (data not shown) did not indicate any overshoot over a period of 24 hours after re-addition of serum. This fast recovery is likely to be due to protein translation rather than DNA transcription because Orai1 mRNA levels were identical in all conditions although Orai1 expression decreased when the cell cycle was blocked. Differing from the effects of 24 hours of serum deprivation (12), 48 hours of deprivation caused an ER Ca^{2+} load reduction in HEK293 as it

does in pulmonary artery smooth muscle cells (30,31). This suggests that the depletion of Ca^{2+} stores might take longer and results initially from a decreased calcium influx. Decreased SERCA2 expression in myocytes starved of serum (15,40) may also explain the observed reduction in the ER Ca^{2+} load. Full recovery of the ER Ca^{2+} load was much slower (24h, data not shown) than that of SOCE, and, to our knowledge, data concerning SERCA expression kinetics after a cell cycle block are not available. The different drugs used in other studies and cell cycle block at different stages may explain the discrepancies between our SOCE reduction in S and G₂/M phases and the increase described in RBL cells (13). However, the fast SOCE recovery that we observed within 4 hours of cell cycle block release, suggested that the transduction pathways are intimately connected to the calcium channels.

SOCE is involved in various physiological processes and it is likely that there are tight regulations of calcium entries and that this accounts for such variety. Specific complexes are probably formed in the plasma membrane to trigger localized calcium entries which may specifically activate cyclins and cyclin-dependent kinases. Here we show that STIM1 knock-down reduces SOCE amplitude but allows normal cell

proliferation rates. To our knowledge, only one interaction between a cell cycle component and a calcium channel has been described previously: the complex cdc2/cyclin B1 regulates InsP3 receptor activity (41). It would therefore very interesting to know whether STIM1, Orai1 and STIM2 interfere with a cell cycle component to trigger or not HEK293 cell proliferation.

Cell cycle progression is regulated by calcium/calmodulin-dependent pathways (42,43) and CaMKII activity (44) and this may provide the link between calcium influx and cyclin/cdk activity. Calcium/calmodulin is required at two points during cell cycle, at the G1/S boundary and in the G2/M transition, M phase progression, and exit from mitosis (42). It is also known that L-type voltage-dependent calcium channels can form a membrane complex with calmodulin to activate specific intracellular signaling pathways and transcription factors such as MAP kinase and CREB (45). Also, TRPC3 can regulate the expression of particular genes in myocytes without affecting other cell functions (46). Therefore, we suggest that plasma membrane signaplex formation may account for the regulation of cell cycle progression in HEK293 cells as well as in other cell types.

REFERENCES

1. Galione, A., Lee, H. C., and Busa, W. B. (1991) *Science* **253**(5024), 1143-1146
2. Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S., and Mikoshiba, K. (1992) *Science* **257**(5067), 251-255
3. Ozil, J. P., Markoulaki, S., Toth, S., Matson, S., Banrezes, B., Knott, J. G., Schultz, R. M., Huneau, D., and Ducibella, T. (2005) *Developmental biology* **282**(1), 39-54
4. Enfissi, A., Prigent, S., Colosetti, P., and Capiod, T. (2004) *Cell Calcium* **36**(6), 459-467
5. Thebault, S., Flourakis, M., Vanoverberghe, K., Vandermoere, F., Roudbaraki, M., Lehen'kyi, V., Slomianny, C., Beck, B., Mariot, P., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Shuba, Y., Capiod, T., Skryma, R., and Prevarskaya, N. (2006) *Cancer Res* **66**(4), 2038-2047
6. Munaron, L., Antoniotti, S., and Lovisolo, D. (2004) *J Cell Mol Med* **8**(2), 161-168
7. El Boustany, C., Bidaux, G., Enfissi, A., Delcourt, P., Prevarskaya, N., and Capiod, T. (2008) *Hepatology* **47**(6), 2068-2077
8. Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2003) *J Biol Chem* **278**(41), 40088-40096
9. Tomono, M., Toyoshima, K., Ito, M., Amano, H., and Kiss, Z. (1998) *Arch Biochem Biophys* **353**(2), 374-378
10. Glassford, J., Soeiro, I., Skarell, S. M., Banerji, L., Holman, M., Klaus, G. G., Kadowaki, T., Koyasu, S., and Lam, E. W. (2003) *Oncogene* **22**(15), 2248-2259
11. Kuga, T., Kobayashi, S., Hirakawa, Y., Kanaide, H., and Takeshita, A. (1996) *Circ Res* **79**(1), 14-19

12. Boddington, M. (2001) *Cell Calcium* **30**(2), 141-150
13. Tani, D., Monteilh-Zoller, M. K., Fleig, A., and Penner, R. (2007) *Cell Calcium* **41**(3), 249-260
14. Parvez, S., Beck, A., Peinelt, C., Soboloff, J., Lis, A., Monteilh-Zoller, M., Gill, D. L., Fleig, A., and Penner, R. (2008) *Faseb J* **22**(3), 752-761
15. Berra-Romani, R., Mazzocco-Spezia, A., Pulina, M. V., and Golovina, V. A. (2008) *Am J Physiol Cell Physiol* **295**(3), C779-790
16. Li, J., Sukumar, P., Milligan, C. J., Kumar, B., Ma, Z. Y., Munsch, C. M., Jiang, L. H., Porter, K. E., and Beech, D. J. (2008) *Circulation research*
17. Takahashi, Y., Watanabe, H., Murakami, M., Ono, K., Munehisa, Y., Koyama, T., Nobori, K., Iijima, T., and Ito, H. (2007) *Biochemical and biophysical research communications* **361**(4), 934-940
18. Gwack, Y., Srikanth, S., Oh-Hora, M., Hogan, P. G., Lamperti, E. D., Yamashita, M., Gelinias, C., Neems, D. S., Sasaki, Y., Feske, S., Prakriya, M., Rajewsky, K., and Rao, A. (2008) *Molecular and cellular biology* **28**(17), 5209-5222
19. Vig, M., DeHaven, W. L., Bird, G. S., Billingsley, J. M., Wang, H., Rao, P. E., Hutchings, A. B., Jouvin, M. H., Putney, J. W., and Kinet, J. P. (2008) *Nature immunology* **9**(1), 89-96
20. Abdullaev, I. F., Bisailon, J. M., Potier, M., Gonzalez, J. C., Motiani, R. K., and Trebak, M. (2008) *Circ Res* **103**(11), 1289-1299
21. Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., and Meyer, T. (2007) *Cell* **131**(7), 1327-1339
22. Uzbekov, R. E. (2004) *Biochemistry* **69**(5), 485-496
23. Nakamura, M., Saito, H., Ebinuma, H., Wakabayashi, K., Saito, Y., Takagi, T., Nakamoto, N., and Ishii, H. (2001) *J Cell Physiol* **187**(3), 392-401
24. Vassilev, L. T., Tovar, C., Chen, S., Knezevic, D., Zhao, X., Sun, H., Heimbrook, D. C., and Chen, L. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(28), 10660-10665
25. Yu, Y., Sweeney, M., Zhang, S., Platoshyn, O., Landsberg, J., Rothman, A., and Yuan, J. X. (2003) *Am J Physiol Cell Physiol* **284**(2), C316-330
26. Mignen, O., Brink, C., Enfissi, A., Nadkarni, A., Shuttleworth, T. J., Giovannucci, D. R., and Capiod, T. (2005) *J Cell Sci* **118**(Pt 23), 5615-5623
27. Broad, L. M., Armstrong, D. L., and Putney, J. W., Jr. (1999) *J Biol Chem* **274**(46), 32881-32888
28. Mignen, O., Thompson, J. L., and Shuttleworth, T. J. (2001) *J Biol Chem* **276**(38), 35676-35683
29. Ong, H. L., Cheng, K. T., Liu, X., Bandyopadhyay, B. C., Paria, B. C., Soboloff, J., Pani, B., Gwack, Y., Srikanth, S., Singh, B. B., Gill, D., and Ambudkar, I. S. (2007) *J Biol Chem* **282**(12), 9105-9116
30. Golovina, V. A., Platoshyn, O., Bailey, C. L., Wang, J., Limsuwan, A., Sweeney, M., Rubin, L. J., and Yuan, J. X. (2001) *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(2), H746-755
31. Sweeney, M., Yu, Y., Platoshyn, O., Zhang, S., McDaniel, S. S., and Yuan, J. X. (2002) *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**(1), L144-155
32. Shuttleworth, T. J., Thompson, J. L., and Mignen, O. (2007) *Cell Calcium* **42**(2), 183-191
33. Aubart, F. C., Sassi, Y., Coulombe, A., Mougenot, N., Vrignaud, C., Leprince, P., Lechat, P., Lompre, A. M., and Hulot, J. S. (2009) *Mol Ther* **17**(3), 455-462
34. Guo, R. W., Wang, H., Gao, P., Li, M. Q., Zeng, C. Y., Yu, Y., Chen, J. F., Song, M. B., Shi, Y. K., and Huang, L. (2009) *Cardiovasc Res* **81**(4), 660-668
35. Ambudkar, I. S., and Ong, H. L. (2007) *Pflugers Arch* **455**(2), 187-200
36. Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S., and Worley, P. F. (2006) *Nat Cell Biol* **8**(9), 1003-1010
37. Liao, Y., Erxleben, C., Yildirim, E., Abramowitz, J., Armstrong, D. L., and Birnbaumer, L. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11), 4682-4687
38. Lopez, J. J., Salido, G. M., Pariente, J. A., and Rosado, J. A. (2006) *J Biol Chem* **281**(38), 28254-28264
39. Abramowitz, J., and Birnbaumer, L. (2009) *Faseb J* **23**(2), 297-328

40. Magnier-Gaubil, C., Herbert, J. M., Quarck, R., Papp, B., Corvazier, E., Wuytack, F., Levy-Toledano, S., and Enouf, J. (1996) *J Biol Chem* **271**(44), 27788-27794
41. Malathi, K., Li, X., Krizanova, O., Ondrias, K., Sperber, K., Ablamunits, V., and Jayaraman, T. (2005) *J Immunol* **175**(9), 6205-6210
42. Kahl, C. R., and Means, A. R. (2003) *Endocr Rev* **24**(6), 719-736
43. Takuwa, N., Zhou, W., and Takuwa, Y. (1995) *Cell Signal* **7**(2), 93-104
44. Morris, T. A., DeLorenzo, R. J., and Tombes, R. M. (1998) *Exp Cell Res* **240**(2), 218-227
45. Dolmetsch, R. E., Pajvani, U., Fife, K., Spotts, J. M., and Greenberg, M. E. (2001) *Science* **294**(5541), 333-339
46. Brenner, J. S., and Dolmetsch, R. E. (2007) *PLoS ONE* **2**(8), e802

FOOTNOTES:

Acknowledgements: We thank Nathalie Jouy (Institut de Biologie Lille, France) for FACS experiments and analysis. This work was supported by a grant from the Ligue Contre le Cancer (TC).

The abbreviations used are: STIM1, stromal interacting molecule 1; STIM2, stromal interacting molecule 2; SOCE, Store-operated calcium entry; NCCE, non capacitative calcium entry

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Serum-free induced cell cycle block in G₁ phase. A) FACS analysis of cell cycle phases (%) in control cells (left hand trace) and in cells after 48 hours in culture medium without serum (middle trace). Histogram summarizing percentage distribution into G₁, S and G₂/M phases, calculated from 3 separate experiments. B) Histogram summarizing ER Ca²⁺ contents and SOCE data obtained from 186 cells in 4 separate experiments: control experiments (white bars), and in serum-deprived cells (black bars) and after serum addition (gray bars). C) Individual traces showing the store-operated calcium inward current densities in control cells (white squares), and cells 48 hours after serum withdrawal (black circles) and 4 hours after serum re-addition (gray diamonds) in the presence of 10mM BAPTA and 1μM adenophostin A in the patch pipette. Time=0 indicates whole-cell breakthrough and inward currents are expressed as current densities based on individual cell capacitance measurements. Histograms summarizing data obtained for 25 (control, white bar), 14 (48h serum free, black bar), and 18 (4h after serum addition, grey bar) individual cells. Cumulative data (mean ± s.e.m.). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

Fig. 2. Hydroxyurea-induced cell cycle block in S phase. A) FACS analysis of cell cycle phases (%) in control cells (left hand trace) and cells after 24 hours in the presence of 1mM hydroxyurea (HU, middle trace). Histogram summarizing percentage distribution into G₁, S and G₂/M phases calculated from 3 separate experiments. B) Histogram summarizing ER Ca²⁺ contents and SOCE data obtained from 80 to 120 cells in 3 separate experiments: control cells (white bars) and HU-treated cells (black bars). C) Individual traces showing the store-operated calcium inward current densities in control cells (white squares), and cells treated with 1mM HU for 24 hours (black circles) and 4 hours after recovery (gray diamonds) in the same experimental conditions as in fig 1. Histograms summarizing data obtained from 10 (control, white bar), 12 (1mM HU, black bar), and 12 (4h after serum addition, gray bar) cells. Cumulative data (mean ± s.e.m.). **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

Fig. 3. RO-3306 induced cell cycle block in G₂/M phase. A) FACS analysis of cell cycle phases (%) in control cells (left hand trace) and in cells treated for 24 hours with 10μM RO-3306 (middle trace). Histogram summarizing percentage distribution into G₁, S and G₂/M phases calculated from 3 separate experiments. B) Histogram summarizing ER Ca²⁺ contents and SOCE data obtained from 123 cells in 4 separate experiments: controls (white bars), and RO-3306 treated cells (black bars), and after 4 hours recovery (gray bars). C) Individual traces showing the store-operated calcium inward current densities in control cells (white squares), and cells treated with 10μM RO-3306 for 24 hours (black circles) and 4

hours after recovery (gray diamonds) in the same experimental conditions as in fig 1. Histograms summarizing data obtained from 11 (control, white bar), 12 (1mM HU, black bar), and 10 (4h after serum addition, gray bar) cells. Cumulative data (mean \pm s.e.m.). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Fig. 4. Cell cycle block and cell capacitance. Cell capacitance (pF) distribution in control cells, cells starved of serum for 48 hours (48h-SVF) and after re-addition of serum (48h-SVF + 4hSVF), cells treated with 1mM HU for 24 hours (24h HU) and after recovery (24h HU + 4hSVF), and cells treated with 10 μ M RO-3306 (24h RO-3306) and after recovery (24h RO-3306 + 4hSVF).

Fig. 5. STIM1, STIM2 and Orai1 expression and SOCE amplitude and cell proliferation. A) Western blots showing the Orai1 (top left), STIM1 (top right) and STIM2 (bottom left) protein abundance in the presence of respective siRNAs and siRNA controls (siCTRL). Numbers above gels indicate relative expression (normalized to actin expression). Histogram (bottom right) summarizing data obtained from 3 separate experiments with control cells (white bars), cells transfected with control siRNA (black bars), and Orai1, STIM1 or STIM2 knock-down cells (gray bars). B) Effect of Orai1, STIM1 and STIM2 silencing on SOCE in whole-cell voltage clamped HEK293 cells. Histograms summarizing data obtained from 16 (ctrl, white bar), 10 (siOrai1, black bar), 11 (siSTIM1, light grey), and 11 (siSTIM2, dark grey) individual cells. C) Cell numbers over the 5 days following siRNA transfection: control (white circle), siSTIM1 (black circle), siSTIM2 (white triangle), siSTIM1 and siSTIM2 (black triangle), and siOrai1 (white star) HEK293 cells. Traces are means of three separate experiments. Cumulative data (mean \pm s.e.m.). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Fig. 6. Orai1, STIM1, and STIM2 expression after cell cycle block. A) Western blots showing Orai1, STIM1, and STIM2 proteins in control cells (CTRL), cells starved of serum for 48 hours (48h-SVF) and after recovery (48h-SVF + 4hSVF), cells treated with 1mM HU for 24 h (24h HU) and after recovery (24h HU + 4hSVF), and cells treated with RO-3306 for 24h (24h RO-3306) and after recovery (24h RO-3306 + 4hSVF). Numbers above gels indicate relative expression (normalized to actin expression). B) Histograms summarizing data expression obtained from 3 separate experiments for Orai1 (black bars), STIM1 (light grey bars), and STIM2 (dark grey bars). Cumulative data (mean \pm s.e.m.). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

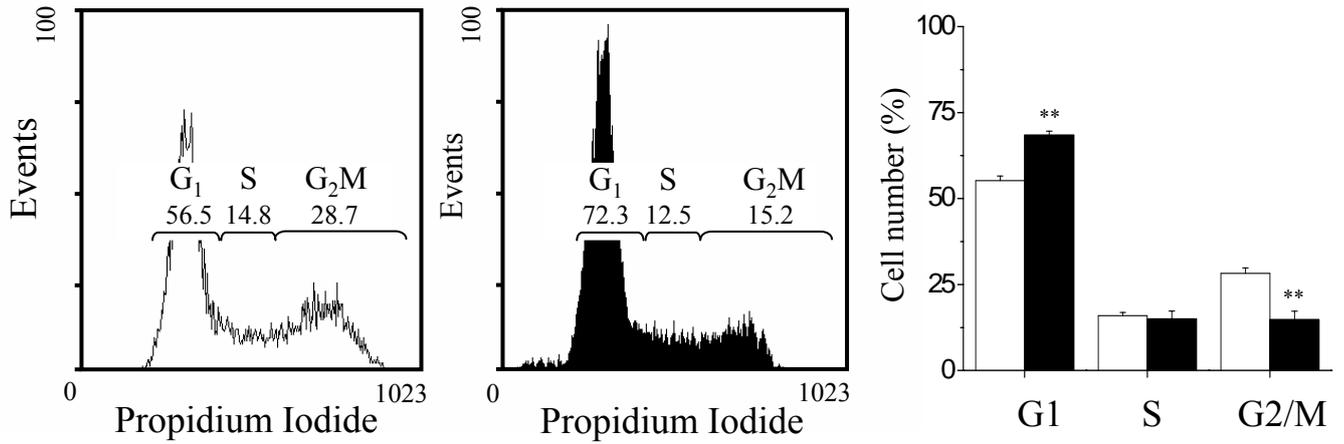
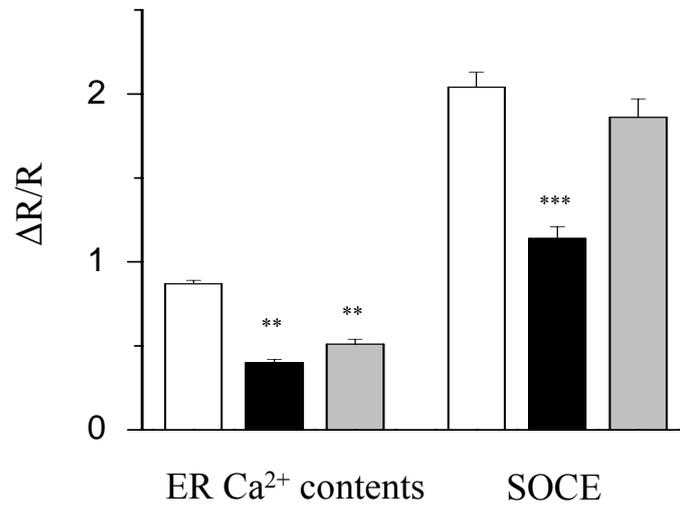
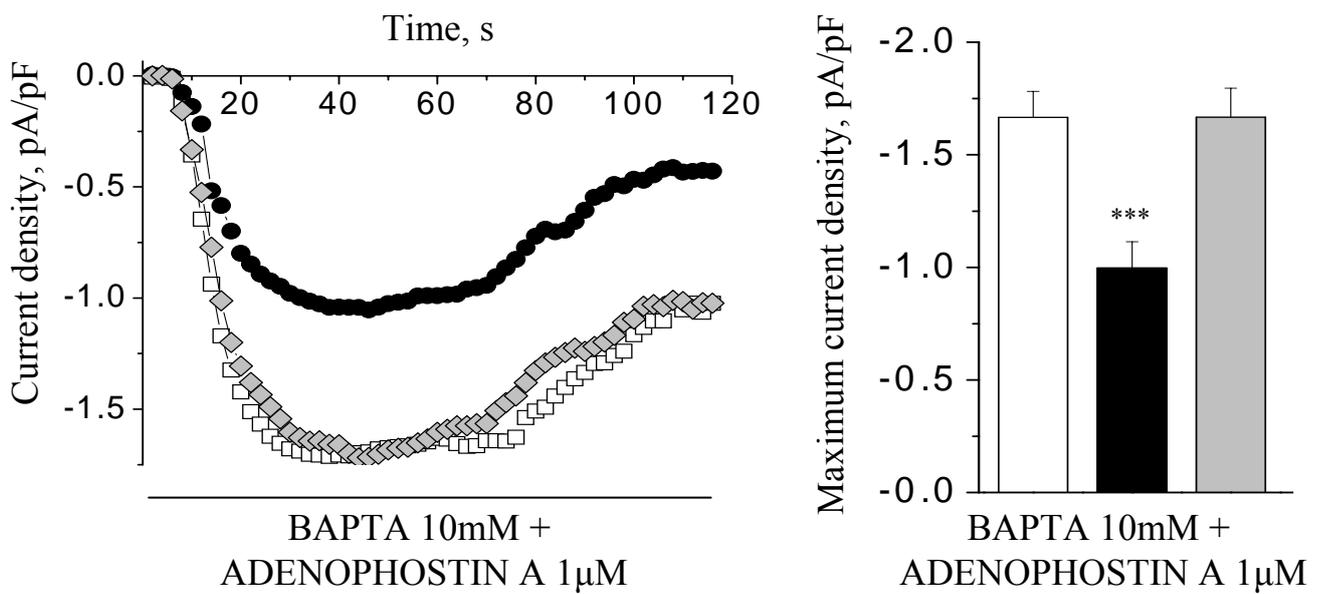
FIGURE 1**A****B****C**

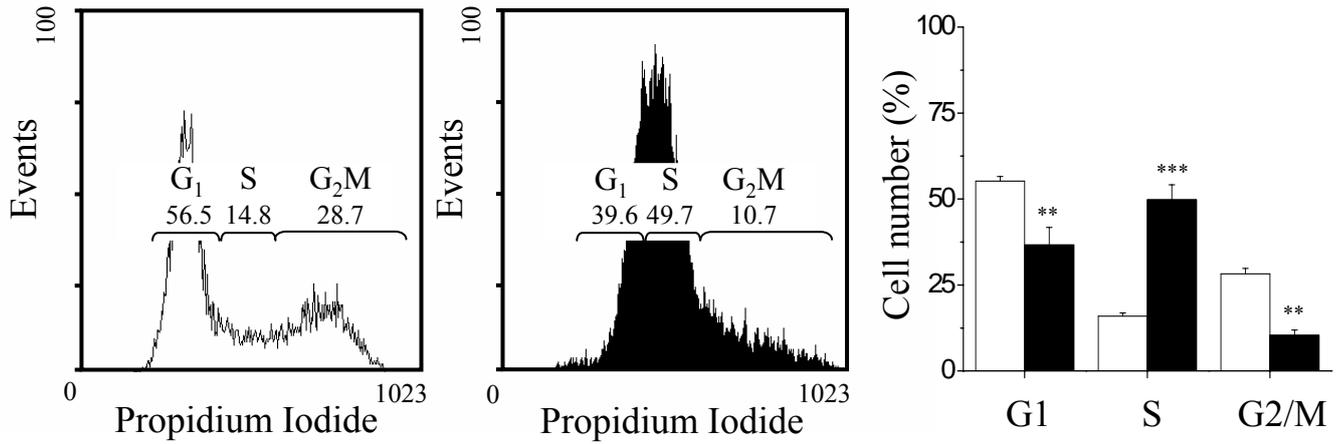
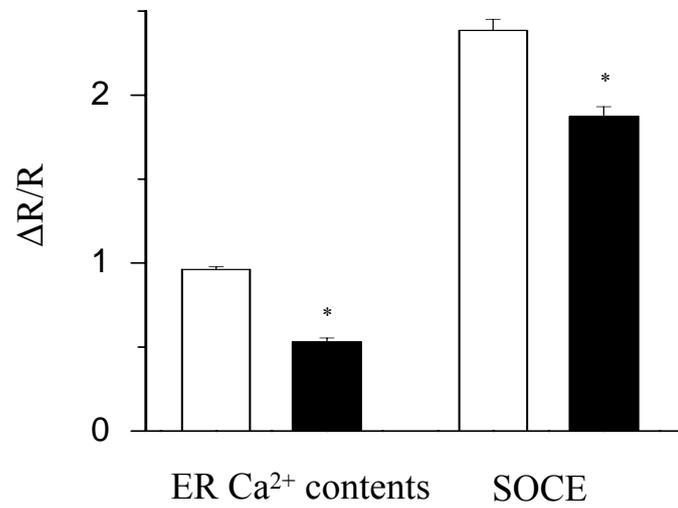
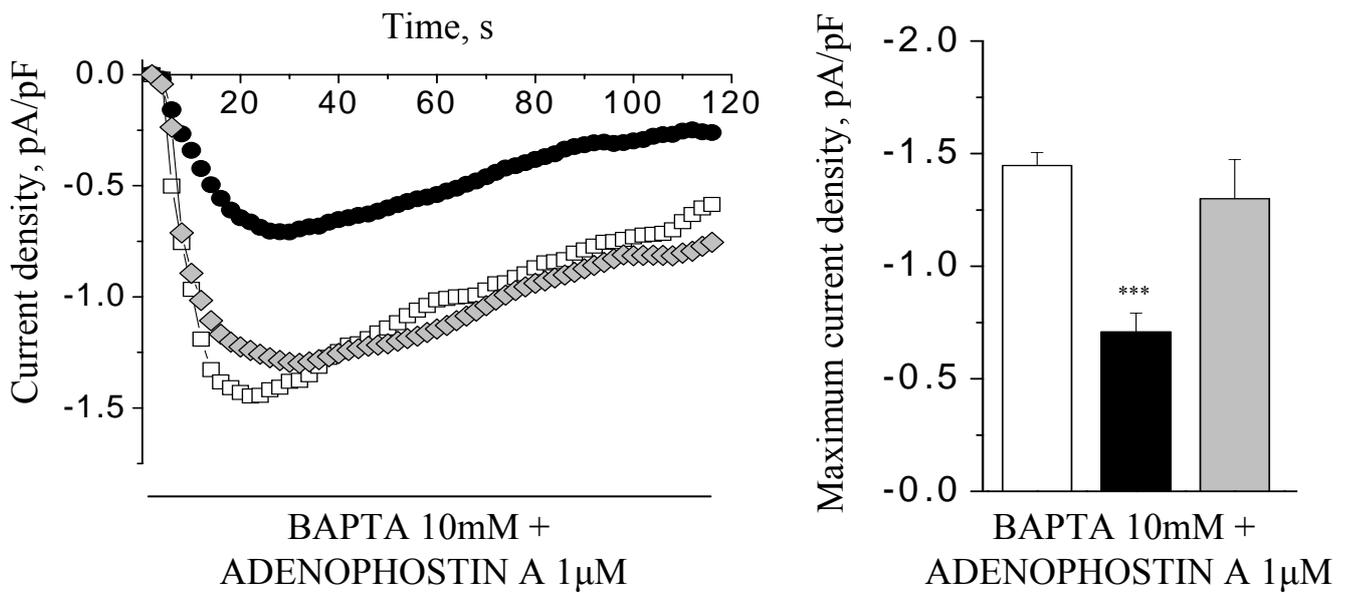
FIGURE 2**A****B****C**

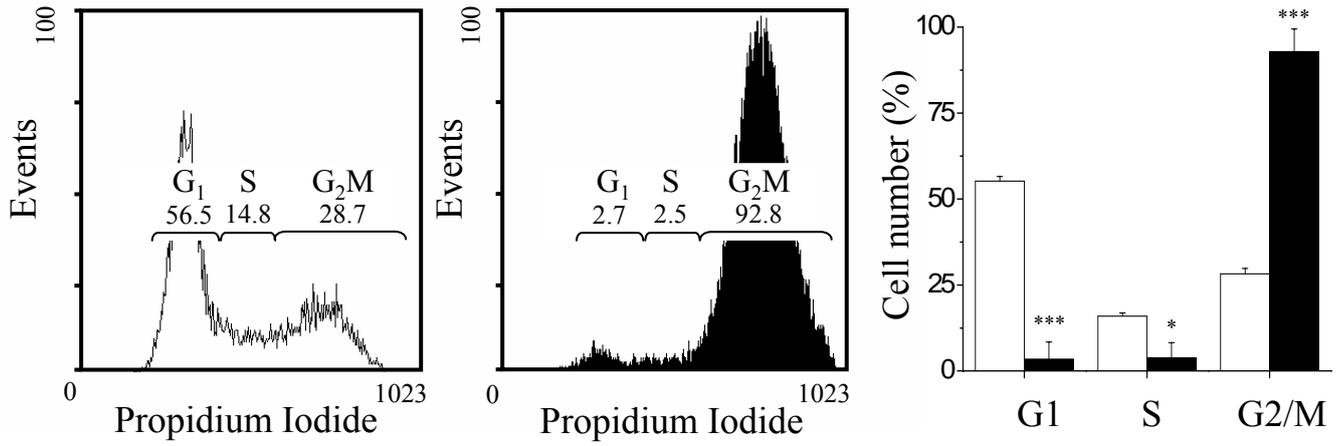
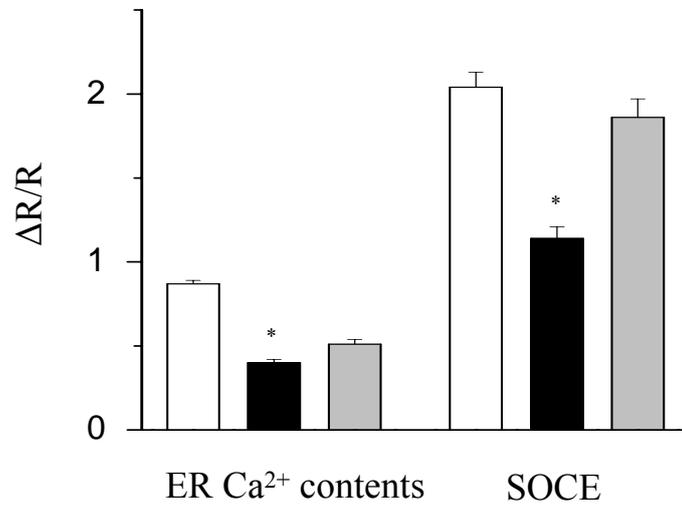
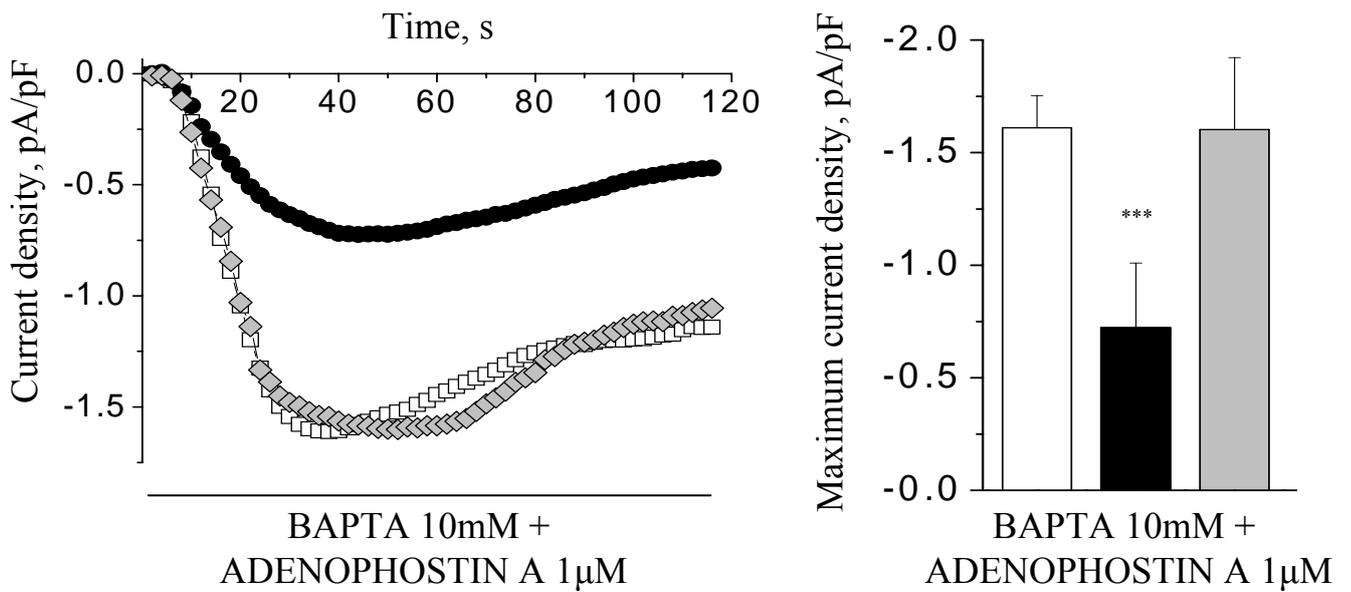
FIGURE 3**A****B****C**

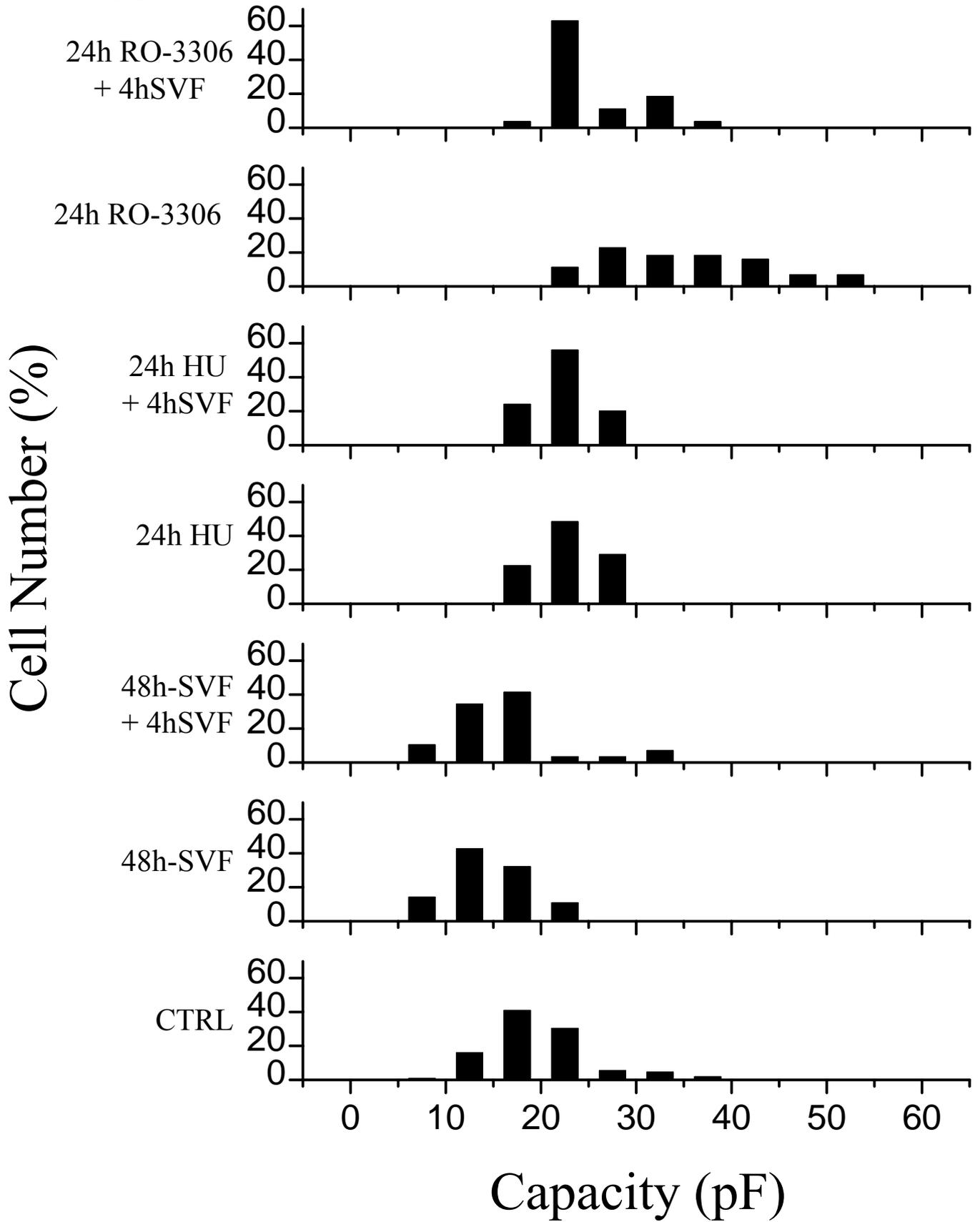
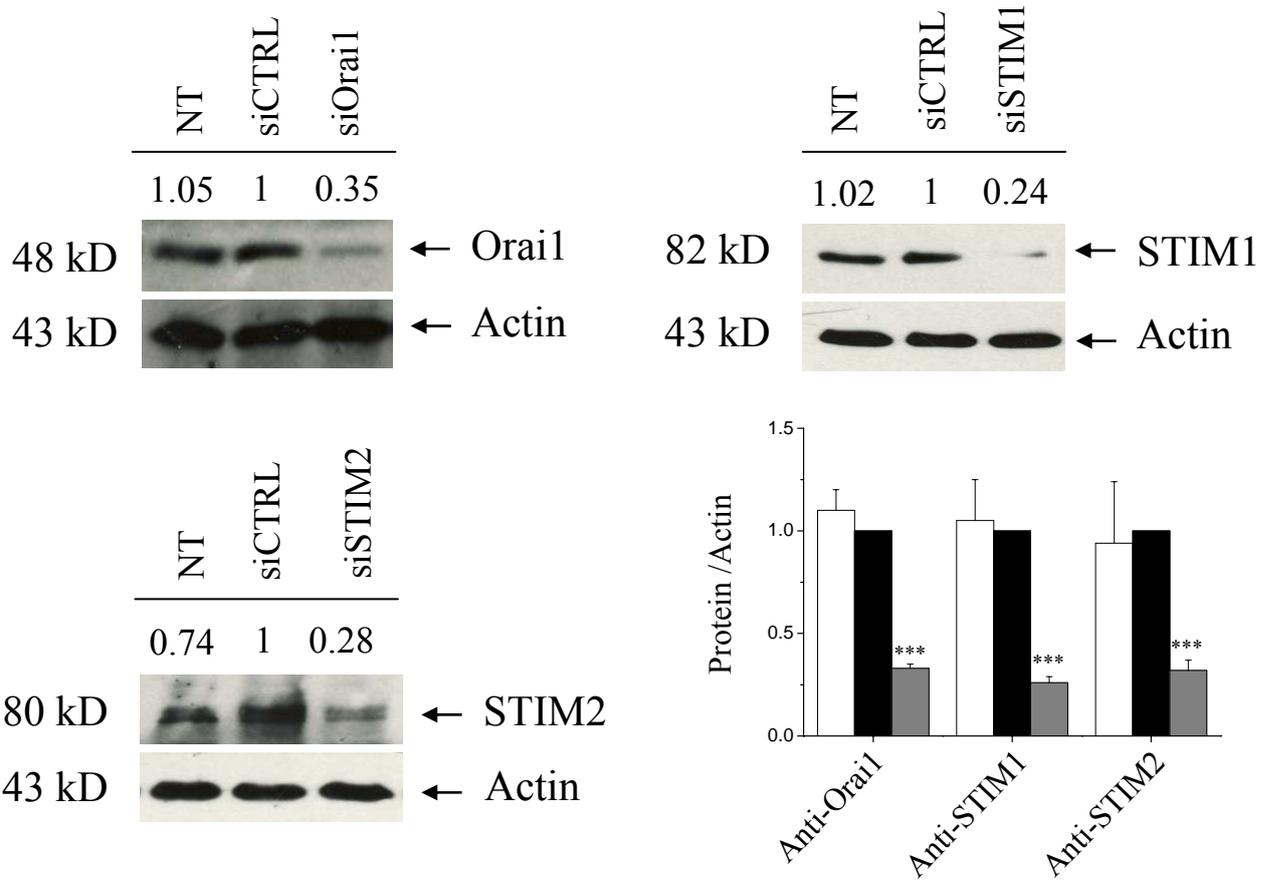
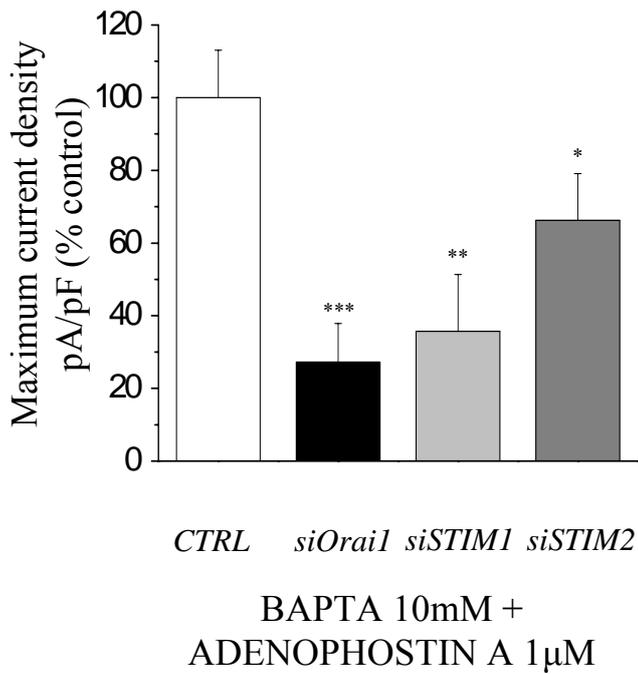
FIGURE 4

FIGURE 5

A



B



C

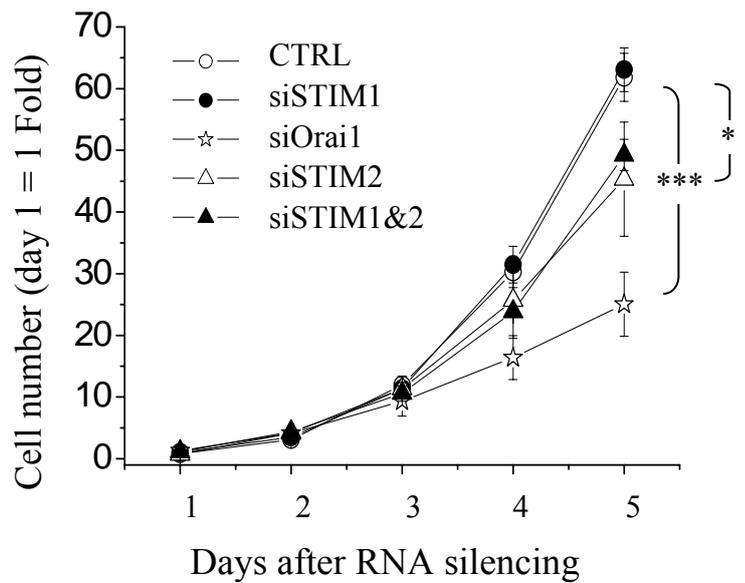
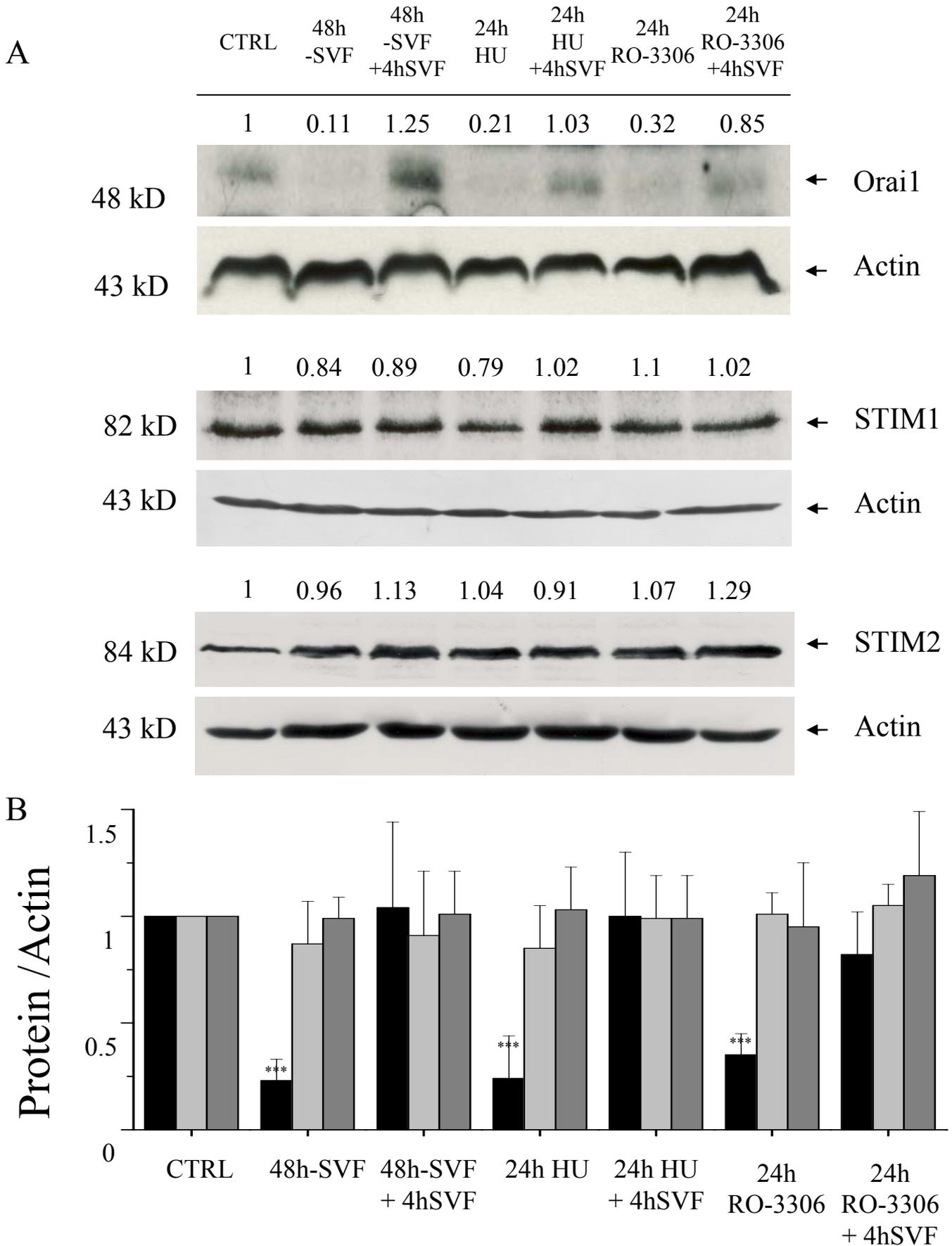


FIGURE 6

Résultats supplémentaires 2

Résultats A :

Pour estimer la toxicité des différents traitements (48h - SVF, 24h HU 1 mM et 24h RO-3306 10 μ M), sur les cellules HEK293, nous avons effectué un test d'apoptose (coloration à l'Hoechst). Dans ces conditions, aucune apoptose n'était détectable, par contre la morphologie des cellules variait en fonction du traitement appliqué. Par exemple, la taille des cellules privées de sérum était inférieure à celle des cellules contrôles. A l'inverse, les cellules traitées par le RO-3306 voient leur taille globale et nucléaire augmentée (voir également l'article 2, figure représentant la capacité cellulaire en fonction des traitements). De plus, les cellules privées de sérum sont tassées en paquet à la différence des cellules traitées par le RO-3306 qui présentaient des prolongements les reliant les unes aux autres. Enfin, les cellules traitées par l'HU, pendant 24 h, ne présentaient aucun signe morphologique distinct par rapport aux cellules contrôles (Figure A).

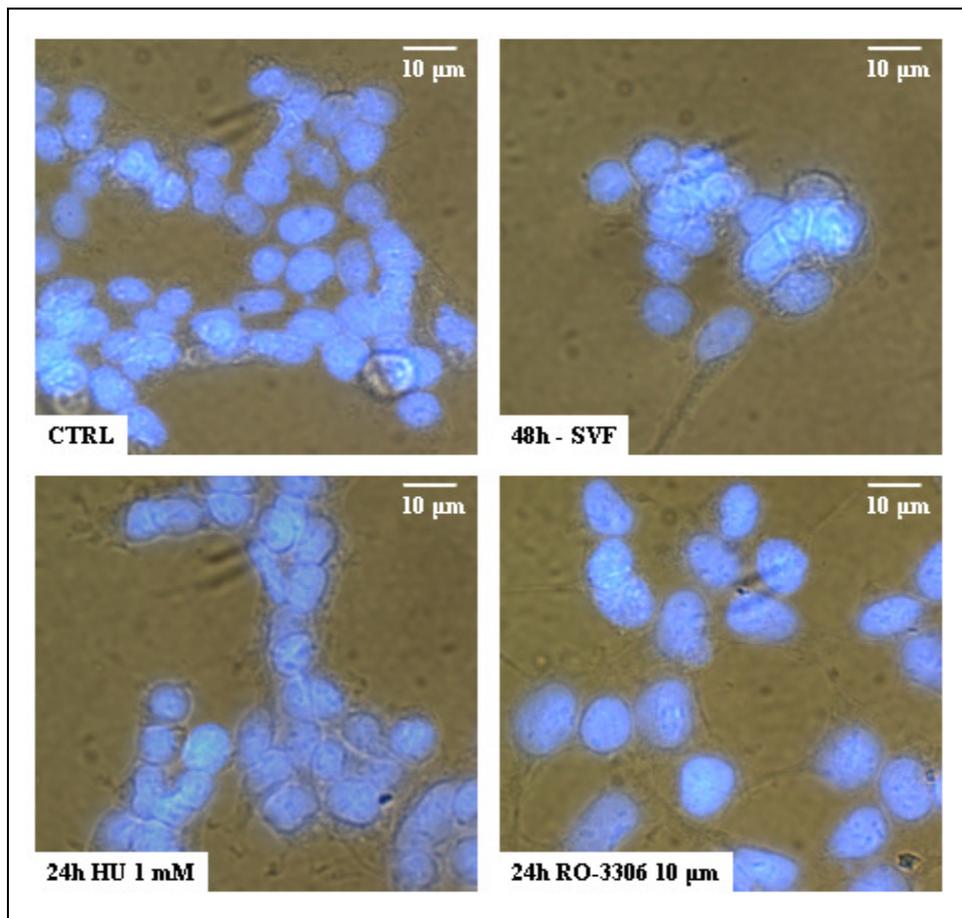


Figure A : Marquage des HEK293 à l'Hoechst selon les différents traitements : dans ces conditions aucune apoptose est notable.

CTRL : cellules non traitées.

48h - SVF : cellules privées pendant 48 heures de SVF (bloquées en G₁).

24h HU 1 mM : cellules traitées 24 heures par l'hydroxyurée (bloquées en S).

24h RO-3306 10 μM : cellules traitées 24 heures par le RO-3306 (bloquées en G₂/M)

Résultats B :

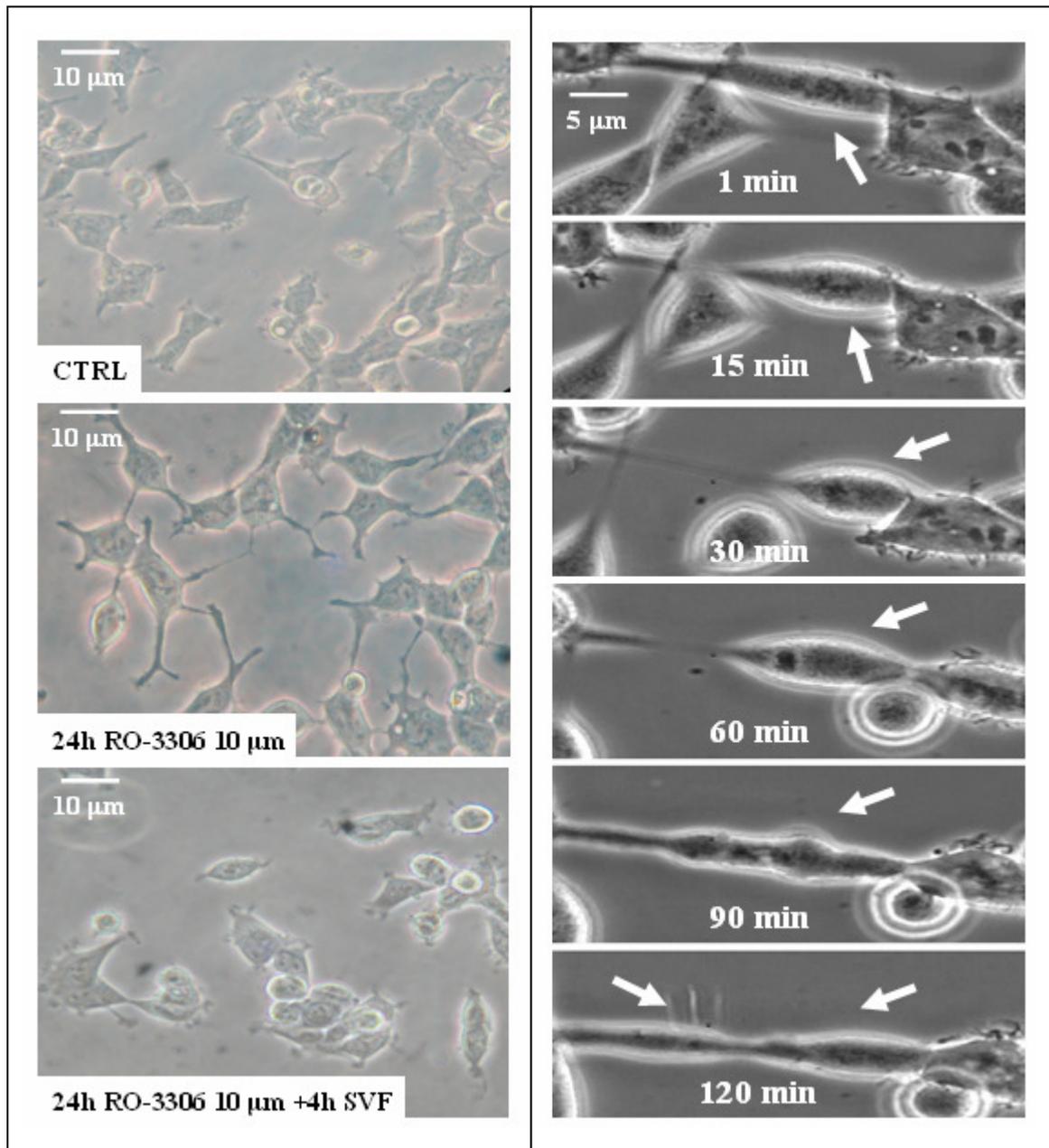


Figure B : Entrée en mitose des HEK293 après retrait du RO-3306 et rinçage par du SVF.

A gauche : Aspect morphologique des HEK293 CTRL, après un arrêt en phase G₂/M (dû à un traitement de 24 h par le RO-3306 à 10 μM) et après retrait du RO-3306 et rinçage par du SVF.

A droite : Evolution au cours du temps de la mitose d'une cellule HEK293 (flèche blanche) ayant entamé sa division (phase M) après retrait du RO-3306 et rinçage par du SVF.

Résultats C :

Dans l'article 2, nous avons suivi le développement du courant SOC, induit par 10 mM de BAPTA et 1 μ M d'Adénophostine (analogue de l' IP_3), en fonction des différents traitements bloquant à trois niveaux différents le cycle cellulaire des HEK3. Nous nous sommes également intéressés au développement de ce courant SOC mais induit uniquement par le BAPTA à 10 mM afin de comparer, selon les traitements, le SOC induit par un analogue de l' IP_3 (et le BAPTA) et le SOC induit uniquement par le BAPTA. Les résultats montrent que ce dernier est diminué en fonction des traitements de la même façon que le SOC induit par l'Adénophostine (Figure C).

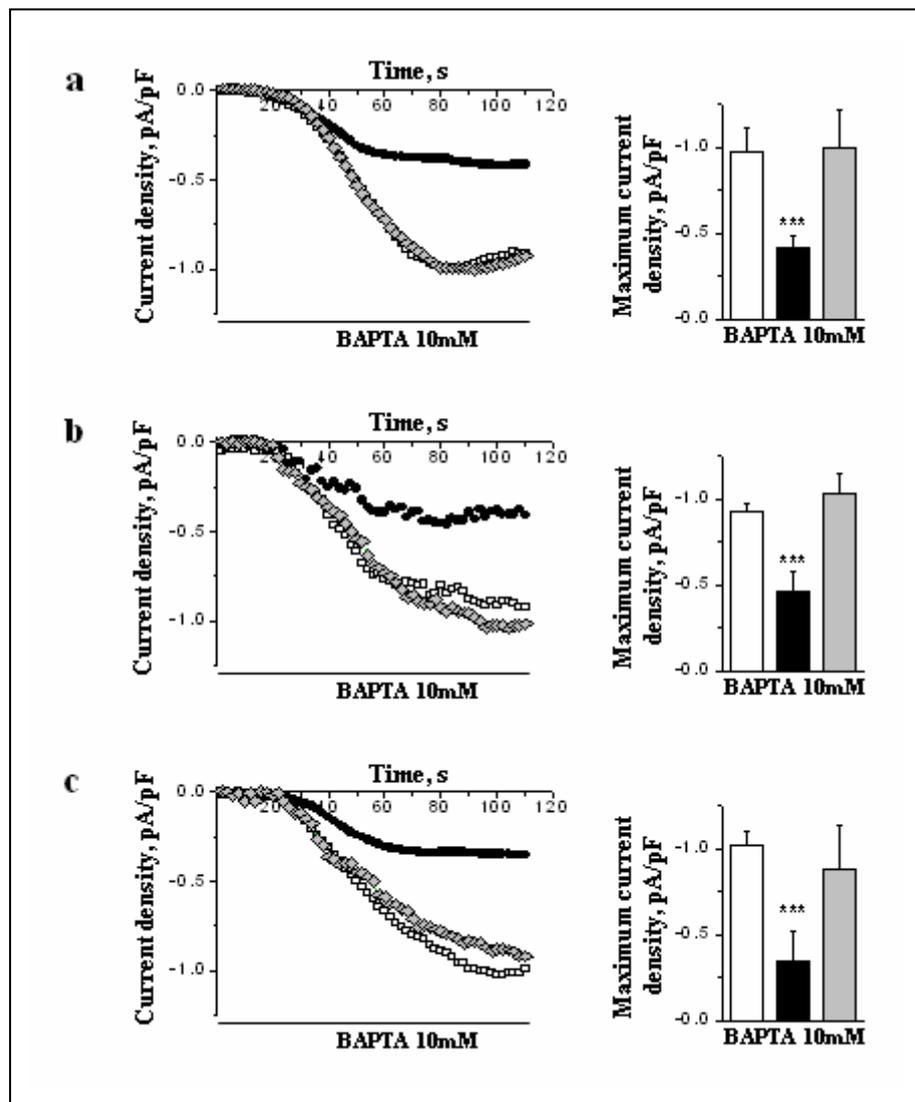


Figure C : Effet des différents traitements, sur le SOC induit uniquement par 10 mM de BAPTA au niveau des cellules HEK3. $p < 0.001$: ***.

Tracé blanc et colonne blanche : CTRL.

Tracé noir et colonne noire : 48h - SVF, figure a ; 24h HU 1 mM, figure b ; 24h RO-3306 10 μ M, figure c.

Tracé gris et colonne grise : 48h - SVF + 4h SVF, figure a ; 24h HU 1 mM + 4h SVF, figure b ; 24h RO-3306 10 μ M + 4h SVF, figure c.

Résultats D :

Nous avons démontré, dans l'article 2, que seule l'expression de la protéine Orai1 variait en fonction des traitements (48h - SVF, 24h HU 1 mM et 24h RO-3306 10 μ M) (article 2, figure 6). En effet, l'expression protéique de Orai1 diminue lorsque les cellules HEK293 sont bloquées dans l'une des 3 phases (G_1 , S et G_2) du cycle cellulaire. Toutefois, il suffit de lever l'inhibition, par un rinçage au SVF pendant 4 heures, pour récupérer la quasi-totalité de la protéine Orai1 et par la suite la CCE. Alors, pour comprendre si le blocage du cycle cellulaire induit l'inhibition de la traduction ou de la transcription de Orai1, nous avons eu recours aux PCR semi-quantitatives pour évaluer la présence de l'ARN_m de Orai1. Nos résultats montrent que ce dernier est présent quelque soit le blocage (Figure D). Par contre ce messager ne semblerait pas être traduit en protéines. Ce résultat expliquerait la possibilité de récupération rapide de la CCE une fois l'inhibition levée.

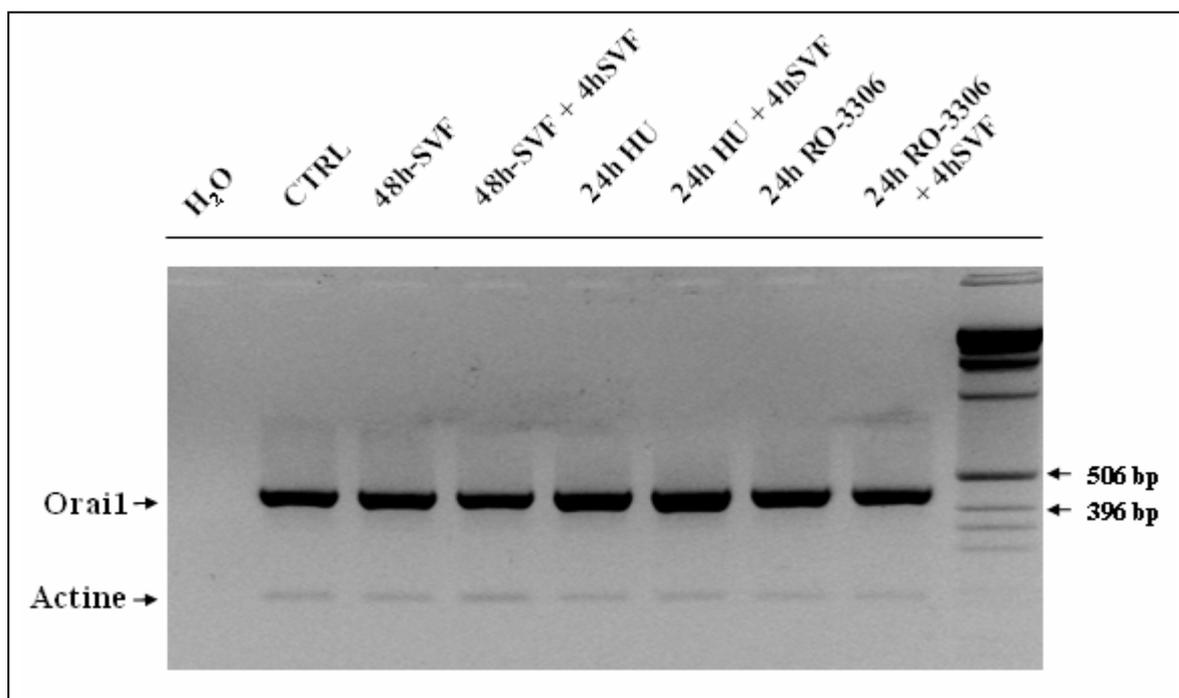


Figure D : PCR semi-quantitative (par rapport à l'actine) montrant l'absence de variation de l'ARN_m de Orai1 en fonction des différents traitements (48h - SVF, 24h HU 1 mM et 24h RO-3306 10 μ M).

Discussion et perspectives

Différentes études montrent l'implication des canaux calciques dans la prolifération et la croissance de divers types cellulaires (pour revues : [Berridge *et al.*, 1998] et [Berridge *et al.*, 2000]). Parmi ces canaux, il existe une famille ayant un rôle important dans ces phénomènes, c'est la famille des canaux TRP (pour revue : [Minke, 2006]). Toutefois, il existe peu de données impliquant ces canaux dans la physiopathologie du foie. En plus des TRP, 2 autres familles de canaux, pouvant être à l'origine d'une entrée calcique, ont récemment émergé : ce sont les STIM [Parker *et al.*, 1996 ; Liou *et al.*, 2005 ; Roos *et al.*, 2005] et les Orai [Feske *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006]. En 2008, l'équipe de Trebak proposa un rôle pour ces 2 familles dans la prolifération des cellules endothéliales [Abdullaev *et al.*, 2008].

TRPC et CCE

Chez les mammifères, les canaux de la superfamille des TRP présentent différentes perméabilités aux ions Ca^{2+} (pour revues : [Venkatachalam and Montell, 2007] et [Nilius, 2007]). Au cours des 14 dernières années, les TRP ont fait l'objet d'intenses recherches visant à les impliquer dans le SOC. Beaucoup de ces études ont porté sur les membres de la famille des TRPC (TRPC1 à 7) pouvant être activés par des mécanismes impliquant la voie PLC [Montell, 2005]. Malgré les preuves accumulées présentant le rôle des TRPC dans le SOC (pour revues : [Smyth *et al.*, 2006] et [Trebak *et al.*, 2007]), cette implication reste controversée. En effet, il est difficile de parvenir à un consensus concernant le rôle des protéines TRPC dans le SOC. En plus, l'entrée en scène de deux nouveaux protagonistes, STIM1 et Orai1, n'a pas permis de résoudre cette équation, elle l'a à l'inverse compliquée. Toutefois, même si un complexe canal, impliquant STIM1 et Orai1, génère un courant dont les caractéristiques pharmacologiques et électrophysiologiques sont identiques à ceux du courant CRAC (sous type particulier du courant SOC) [Feske *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006], les évidences bibliographiques, basées notamment sur les stratégies de « knock down », semblent montrer une nette implication des canaux TRPC dans le courant SOC [Liu *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2003 ; Brueggemann *et al.*, 2006 ; Rao *et al.*, 2006 ; Brechard *et al.*, 2008]. Ce dernier est très hétérogène, en terme de profil pharmacologique et de sélectivité aux ions, en fonction des TRPC impliqués et des différents types cellulaires (pour revue : [Parekh and Putney, 2005]). Cette grande variabilité peut s'expliquer par la capacité qu'ont les TRPC à se rassembler en homo ou hétérotétramères, ainsi différentes isoformes peuvent donner naissance à divers groupes de canaux ioniques donnant lieu à des sélectivités ioniques différentes (pour revues : [Albert *et al.*, 2007] et [Ambudkar, 2007]). Si l'on prend le cas de TRPC1, son implication dans le SOC a été démontrée dans divers types cellulaires tels que : les kératinocytes, les cellules musculaires lisses, les DT-40, les

HEK293, les cellules endothéliales et les thrombocytes (pour revues : [Beech, 2005] et [Ambudkar, 2007]). Dans ces conditions, TRPC1 est responsable d'un courant cationique non-sélectif de type SOC. A l'inverse, d'autres études ont démontré que, sur les mêmes cellules, le canal TRPC1 n'est pas responsable du courant SOC dans les cellules endothéliales, les thrombocytes et les cellules musculaires lisses [Abdullaev *et al.*, 2008 ; Varga-Szabo *et al.*, 2008]. De plus, TRPC1 peut former avec STIM1 et Orai1 un complexe ternaire impliqué dans un influx calcique capacitif [Ong *et al.*, 2007]. Depuis, un nombre croissant d'études démontre une interaction entre STIM1 et certains TRPC [Yuan *et al.*, 2007]. Concernant les autres TRPC, des études ont démontré que TRPC3 et C7 sont capables de générer un courant de type SOC lorsqu'ils sont complexés à TRPC1 [Liu *et al.*, 2005 ; Zagranichnaya *et al.*, 2005] et que TRPC4 et TRPC5 peuvent être impliqués dans un courant de type SOC [Wang *et al.*, 2004 ; Cioffi *et al.*, 2005 ; Xu *et al.*, 2006]. De ce fait, le rôle des TRPC en tant que sous-unités (voire même en tant que pore du canal) du SOC ne peut pas être exclu à ce stade.

J'ai démontré, au cours de ma thèse, que TRPC1 est exprimé dans les hépatomes humains Huh-7, même si la taille de la bande détectée (61 kD), en Western-Blot, est inférieure à la taille prédite (91 kD) de cette protéine. En effet, TRPC1 dans les Huh-7 est une protéine tronquée mais, cette forme est tout de même détectable par des amorces dessinées contre la forme 91 kD de TRPC1 et elle est détruite par les siRNA dirigée contre cette dernière. De plus, par la technique des siRNA, j'ai montré que TRPC1 n'est pas impliqué dans une CCE dans les cellules Huh-7 [El Boustany *et al.*, 2008].

TRPC6 et CCE

Il est connu, depuis une dizaine d'années, que TRPC6 peut être activé par des seconds messagers tel que le DAG, indépendamment de la vidange des stocks calciques réticulaires [Hofmann *et al.*, 1999 ; Okada *et al.*, 1999]. Néanmoins, il serait réducteur de limiter son mode d'activation à la voie NCCE. En effet, les évidences montrant la possibilité d'une activation de ce canal, par la voie CCE n'ont cessé d'augmenter ces 5 dernières années. La modulation de l'expression endogène de TRPC6, notamment par la technique de siRNA, a démontré l'implication de ce canal dans la réponse capacitive. En effet, l'inhibition de l'expression de TRPC6 dans les HL-60 entraîne la réduction de la CCE [Brechard *et al.*, 2008]. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre ce canal inhibe le développement du courant SOC dans les myocytes [Saleh *et al.*, 2008]. Liao *et al.* ont démontré que selon le niveau d'expression de Orai1, dans les cellules HEK293 exprimant TRPC6 de façon stable (HEK293-TRPC6), TRPC6 sera impliqué

dans un mécanisme soit capacitif, soit non capacitif. En effet, de très faibles quantités d'ADN (0.1 µg par opposition à 1-3 µg) de Orai1, transfectées dans les cellules HEK293-TRPC6, engendrent une disparition de la sensibilité de TRPC6 à l'OAG, par contre ce canal devient activable suite à une vidange des stocks calciques réticulaires [Liao *et al.*, 2007]. Ce changement de fonctionnalité de TRPC6, dépendant de la quantité de Orai1 exprimée au niveau cellulaire, est retrouvé également pour TRPC3 [Liao *et al.*, 2007]. De ce fait, Birnbaumer et son équipe ont proposé un modèle dans lequel les TRPC formeraient les pores du canal et Orai1 serait la sous-unité régulatrice qui interagirait avec les TRPC et formerait le lien avec STIM1 [Liao *et al.*, 2008]. Afin de pouvoir concilier ce modèle avec certaines données publiées par plusieurs laboratoires, démontrant que des mutations des résidus E106 (situés au niveau de la région présumée du pore de Orai1) donnent lieu à un changement dans la sélectivité du canal CRAC [Prakriya *et al.*, 2006 ; Vig *et al.*, 2006 ; Yeromin *et al.*, 2006], Birnbaumer et ses collègues [Liao *et al.*, 2007] ont établi une analogie entre Orai1 et KCNE1 qui est la sous-unité β régulatrice du canal potassique KCNQ1 [Melman *et al.*, 2002]. En effet, KCNE1 n'intervient ni dans la formation du pore ni dans la régulation des ouvertures et des fermetures, dépendantes du voltage, du canal KCNQ1 pourtant, des mutations ponctuelles dans le domaine transmembranaire, de la sous-unité β KCNE1, altèrent la dépendance de ce canal au voltage ainsi que sa sélectivité [Melman *et al.*, 2002]. En conclusion, cette équipe suggère que TRPC6 peut appartenir soit à la CCE soit à la NCCE, en fonction de la quantité de Orai1 exprimée au niveau cellulaire. Dans ces conditions Orai1 pourrait être assimilé à une sous-unité β régulatrice des canaux TRPC les liant indirectement à STIM1. Néanmoins, cette hypothèse peut difficilement expliquer la génération d'un énorme courant CRAC (« huge CRAC-like currents ») uniquement par la surexpression de STIM1 et Orai1 sans la surexpression d'aucun TRPC [Mercer *et al.*, 2006 ; Peinelt *et al.*, 2006 ; Soboloff *et al.*, 2006].

Mes travaux ont permis de démontrer, grâce à la technique des siRNA et à la génération de clones stables surexprimant ou sousexprimant TRPC6, que ce dernier intervient dans la CCE dans les hépatomes humains Huh-7 [El Boustany *et al.*, 2008]. De plus, dans les Huh-7 TRPC6 n'intervient pas dans la NCCE. En effet, des siRNA dirigés contre ce canal ne provoquent pas une diminution de l'entrée calcique induite par l'OAG, par conséquent, il est envisageable que le rapport entre l'expression de TRPC6 et d'Orai1 fait basculer la balance en faveur d'un TRPC6 impliqué préférentiellement dans la CCE dans les Huh-7.

TRPC et prolifération

La famille des TRPC, découvert dans les années 90, joue divers rôles dans la régulation de plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques chez les mammifères. En particulier, différents membres de cette famille sont impliqués dans la prolifération et la tumorigenèse d'une multitude de tissus.

TRPC1 est exprimé dans une large variété d'organes (pour revue : [Beech *et al.*, 2003]) où il exerce plusieurs rôles physiologiques. Par exemple, des oligonucléotides antisens dirigés contre TRPC1 engendrent une réduction de la CCE et de la prolifération des cellules pulmonaires aortiques musculaires lisses (PASMC) [Sweeney *et al.*, 2002]. De plus, l'amplitude de la CCE et le niveau d'expression de TRPC1 augmente lors de la prolifération des PASMC [Golovina *et al.*, 2001]. Dans le cadre de la réaction sclérotique, suite à une lésion artérielle, l'expression de TRPC1 augmente lors de la prolifération des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire (VSM) et lors de la formation de la neointima chez la souris, le rat et l'homme. Un traitement par un anticorps dirigé contre TRPC1 bloque la prolifération des VSM *in vitro* [Kumar *et al.*, 2006]. TRPC1 est également impliqué dans le contrôle de la croissance neuronale. En effet, des antisens dirigés contre TRPC1 entraînent une diminution de la CCE et de la prolifération, induite par le bFGF, des cellules souches neuronales [Fiorio Pla *et al.*, 2005].

Quant à TRPC3, il contribue à la progression du cancer des ovaires chez la femme. En effet, la diminution de l'expression de TRPC3 réduit l'influx calcique et la prolifération des SKOV3 [Yang *et al.*, 2009].

TRPC4 voit son expression augmenter lors de l'hypoxie entraînant ainsi, dans les cellules endothéliales, une augmentation de la CCE et de la prolifération [Fantozzi *et al.*, 2003]. L'augmentation de la CCE et de la prolifération, en relation avec l'expression de TRPC4, est également retrouvée dans la lignée PASMC [Zhang *et al.*, 2004]. De plus, l'induction de la prolifération et de la CCE dans les cellules épithéliales coronaires, par l'EGF (chez l'homme ou chez le lapin), est abolie par des siRNA dirigés contre TRPC4 [Yang *et al.*, 2003 ; Yang *et al.*, 2005].

J'ai démontré que seuls TRPC1 et TRPC6 sont présents dans les Huh-7. TRPC1 à la différence de TRPC6, n'intervient pas, dans la CCE et il est envisageable que TRPC1 ne soit pas impliqué dans la prolifération des hépatomes humains. Néanmoins, Trebak *et al.* ont démontré que TRPC1 et 4 peuvent être impliqués dans la prolifération des cellules endothéliales sans être impliqué dans la CCE [Abdullaev *et al.*, 2008]. Pour cela, des expériences supplémentaires visant à diminuer l'expression de TRPC1, par des siRNA, seront nécessaires pour établir le rôle de TRPC1 dans la prolifération des Huh-7.

TRPC6 et prolifération

TRPC6 joue un rôle majeur dans la prolifération de plusieurs types cellulaires. En effet, la stimulation de la prolifération des PASMC, par le PDGF ou l'endothéline 1, augmente l'expression de TRPC6 [Yu *et al.*, 2003 ; Kunichika *et al.*, 2004]. Cette régulation de l'expression de TRPC6 passe par la phosphorylation de STAT3 et l'activation de c-jun [Yu *et al.*, 2003]. De plus, la diminution de l'expression de TRPC6, par la technique des siRNA, diminue la prolifération des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire provenant de patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire idiopathique (IPAH : Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension) [Yu *et al.*, 2004]. Enfin, l'implication de TRPC6 dans la prolifération ne se limite pas aux cellules musculaires lisses. En effet, TRPC6 est impliqué dans la prolifération tumorale, par exemple la prolifération des cellules épithéliales prostatiques cancéreuses est stimulée par la voie impliquant le récepteur $\alpha 1A$ -adrénergique entraînant ainsi une entrée de calcium *via* TRPC6 [Thebault *et al.*, 2006], de même, l'expression de l'ARNm et de la protéine TRPC6 est augmentée dans les cellules épithéliales cancéreuses du sein par rapport aux cellules épithéliales saines [Guilbert *et al.*, 2008].

J'ai démontré, dans mes travaux, que l'augmentation de l'expression de TRPC6 entraîne l'augmentation de la prolifération de la lignée d'hépatomes humains Huh-7. A l'inverse, l'inhibition de l'expression de TRPC6 engendre une réduction de la prolifération de ces cellules [El Boustany *et al.*, 2008]. De plus, la stimulation de la prolifération des hépatocytes humains fraîchement isolés, par des facteurs de croissance mitogènes tels que l'EGF et l'HGF, induit une augmentation de l'expression de TRPC6. L'expression de l'ARNm de TRPC6 augmente dans le foie cancéreux par rapport au foie sain [El Boustany *et al.*, 2008]. Enfin, l'expression de TRPC6 est détectée dans les foyers cancéreux, mais non au niveau des zones saines, dans les coupes de tissus hépatiques humains [El Boustany *et al.*, 2008].

Ces résultats suggèrent que TRPC6 joue un rôle central dans la régulation de la prolifération dans les cellules normales et tumorales.

TRPC, STIM1, Orai1 et CCE dans le foie sain et tumoral

Sachant que TRPC6, STIM1 et Orai1 sont impliqués dans la CCE et la prolifération dans les Huh-7, il était intéressant d'identifier les acteurs potentiels de cette entrée dans le foie sain. En effet, il existe au niveau des hépatocytes de rats une CCE dans laquelle STIM1 et Orai1

interviennent [Barritt *et al.*, 2009]. Par contre, peu voire pas de données, concernant la CCE et ces acteurs, sont disponibles au niveau du foie humain sain.

Nos premiers résultats montrent l'existence d'une CCE dans les hépatocytes humains sains fraîchement dissociés (Figure A). De plus, nous avons démontré que, TRPC5 ainsi que STIM1 et Orai1 sont exprimés au niveau du foie sain. En effet, STIM1 et Orai1 sont impliqués dans la CCE dans divers modèles [Lioudyno *et al.*, 2008 ; Darbellay *et al.*, 2009 ; Potier *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2009] en plus, TRPC5 peut être impliqués dans une forme d'entrée calcique capacitive par exemple dans les cellules musculaires lisses des artérioles [Xu *et al.*, 2006]. De ce fait, 2 cas concernant les acteurs impliqués dans la CCE, au niveau du foie sain, sont envisageables (Figure B en haut). Tout d'abord, il est possible que seuls STIM1 et Orai1 soit responsable de cette entrée calcique capacitive mais il est aussi envisageable que TRPC5 intervient dans ce complexe. Toutefois, le foie sain est quiescent de ce fait, l'entrée de calcium par ces complexes n'induit pas une prolifération.

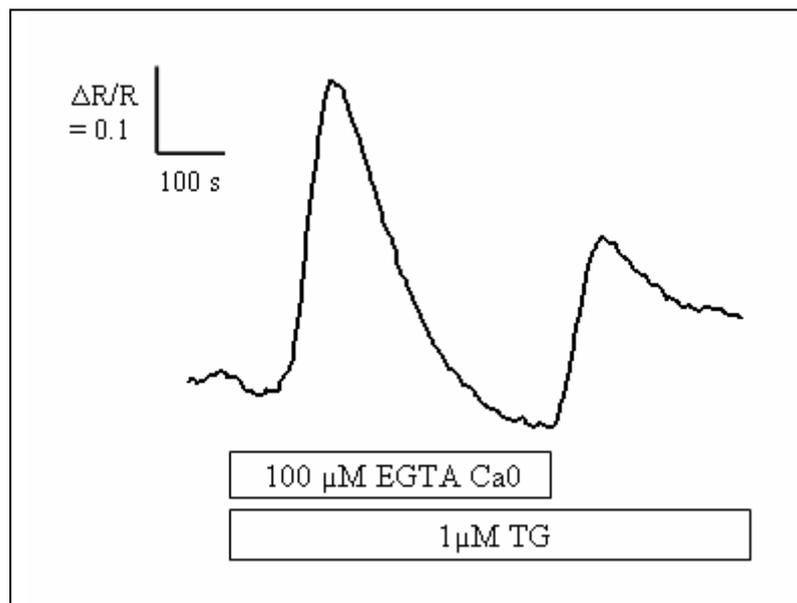


Figure A : Présence d'une CCE induite par 1 μM de thapsigargine au niveau des hépatocytes humains sains fraîchement dissociés.

Enfin, les complexes présents au niveau du foie sain sont retrouvés dans le foie tumoral vu que TRPC5, STIM1 et Orai1 sont présents dans ces conditions. En plus de ces complexes potentiels, il existe un complexe impliquant TRPC6, STIM1 et Orai1 et dont la fonction principale est la prolifération cellulaire (Figure B en bas).

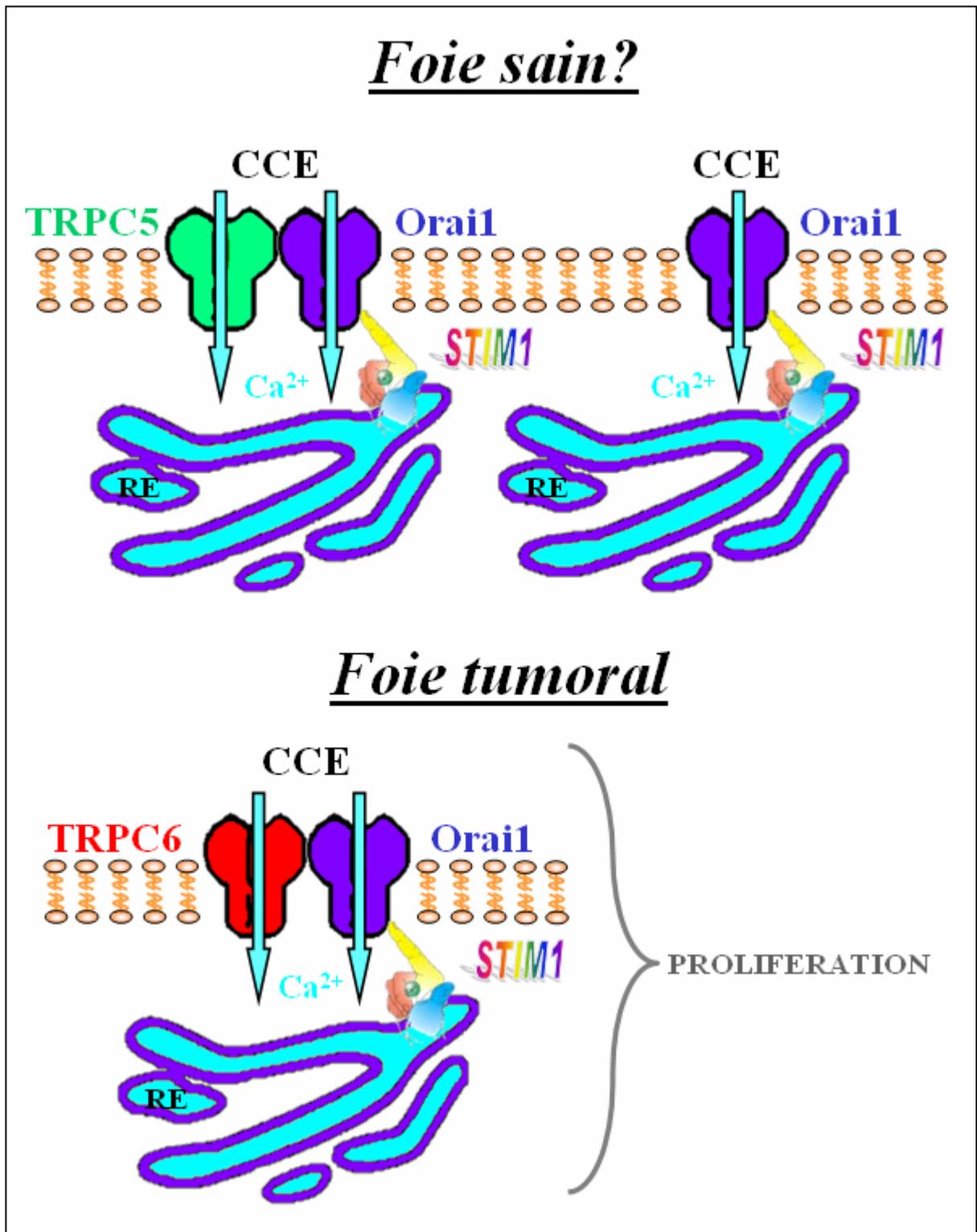


Figure B : Bases moléculaires de la CCE dans le foie humain sain et tumoral.

En haut : CCE due à un complexe formé par STIM1 et Orai1 ou par STIM1, Orai1 et TRPC5 dans le foie sain.

En bas : CCE impliquée dans la prolifération, dans le foie tumoral, dont l'origine est un complexe incluant STIM1, Orai1 et TRPC6.

STIM1, STIM2, Orai1 et CCE

Dans les cellules dépourvues de canaux calciques activés par le potentiel, une des majeures entrées de calcium dans ces cellules est la CCE [Putney, 1986]. Le courant le mieux caractérisé dans cette forme d'entrée calcique est le courant I_{CRAC} qui fut découvert dans les lymphocytes T et les mastocytes [Hoth and Penner, 1992 ; Zweifach and Lewis, 1993]. Néanmoins, les composants moléculaires du canal CRAC ainsi que le mécanisme d'activation de ces canaux n'ont été identifiés que récemment. STIM1 fut la première protéine découverte dans le cadre du complexe CRAC même si son gène fut identifié longtemps avant [Parker *et al.*, 1996 ; Liou *et al.*, 2005 ; Roos *et al.*, 2005]. A partir de là, un autre membre fut identifié par homologie avec la séquence de STIM1 et fut appelé STIM2 [Williams *et al.*, 2001]. La famille des STIM possède au niveau de leur côté N-terminal (luminal) un « EF-Hand » capable de détecter les concentrations calciques intra-réticulaires [Liou *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2005]. En plus de cette famille de STIM une deuxième famille, dont le chef de file est Orai1, a vu le jour [Feske *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006]. La découverte de cette protéine-canal révolutionna la compréhension dans le domaine de la CCE et proposa STIM1 et Orai1 comme les composants essentiels du CRAC. Depuis, les données bibliographiques concernant l'implication de STIM1 et Orai1 [Lioudyno *et al.*, 2008 ; Darbellay *et al.*, 2009 ; Potier *et al.*, 2009 ; Yang *et al.*, 2009] ainsi que STIM2 [Parvez *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2009], dans divers lignées et modèles cellulaires, dans le SOC ne cessent d'augmenter. Mais, certaines de ces protéines, telles que Orai1 [Mignen *et al.*, 2008] et STIM2 [Parvez *et al.*, 2008], peuvent être également impliquées dans une voie d'entrée calcique indépendante de la vidange des stocks calciques réticulaires, montrant ainsi une variabilité fonctionnelle en fonction du tissu ou du type cellulaire donné.

J'ai démontré, par la technique des siRNA, l'importance de STIM1, STIM2 et Orai1 dans le courant SOC présent dans les HEK293.

J'ai également démontré l'implication de STIM1 et Orai1 dans la CCE au niveau des hépatomes humains Huh-7 [El Boustany *et al.*, 2008].

STIM1, STIM2, Orai1 et prolifération

Une des hypothèses concernant la participation des canaux calciques dans la prolifération cellulaire nécessite la mise en place d'un complexe de type SOC. En effet, le courant SOC joue un rôle important dans divers types cellulaires [Golovina *et al.*, 2001 ; Sweeney *et al.*, 2002]. De plus, une étude plus récente sur des cellules endothéliales humaines de la veine ombilicale (HUVEC) et des cellules endothéliales humaines de l'artère pulmonaire a proposé que STIM1

ainsi que STIM2 et Orai1 seraient responsables d'une entrée calcique de type CCE conduisant à la prolifération de ces cellules [Abdullaev *et al.*, 2008 ; Parvez *et al.*, 2008].

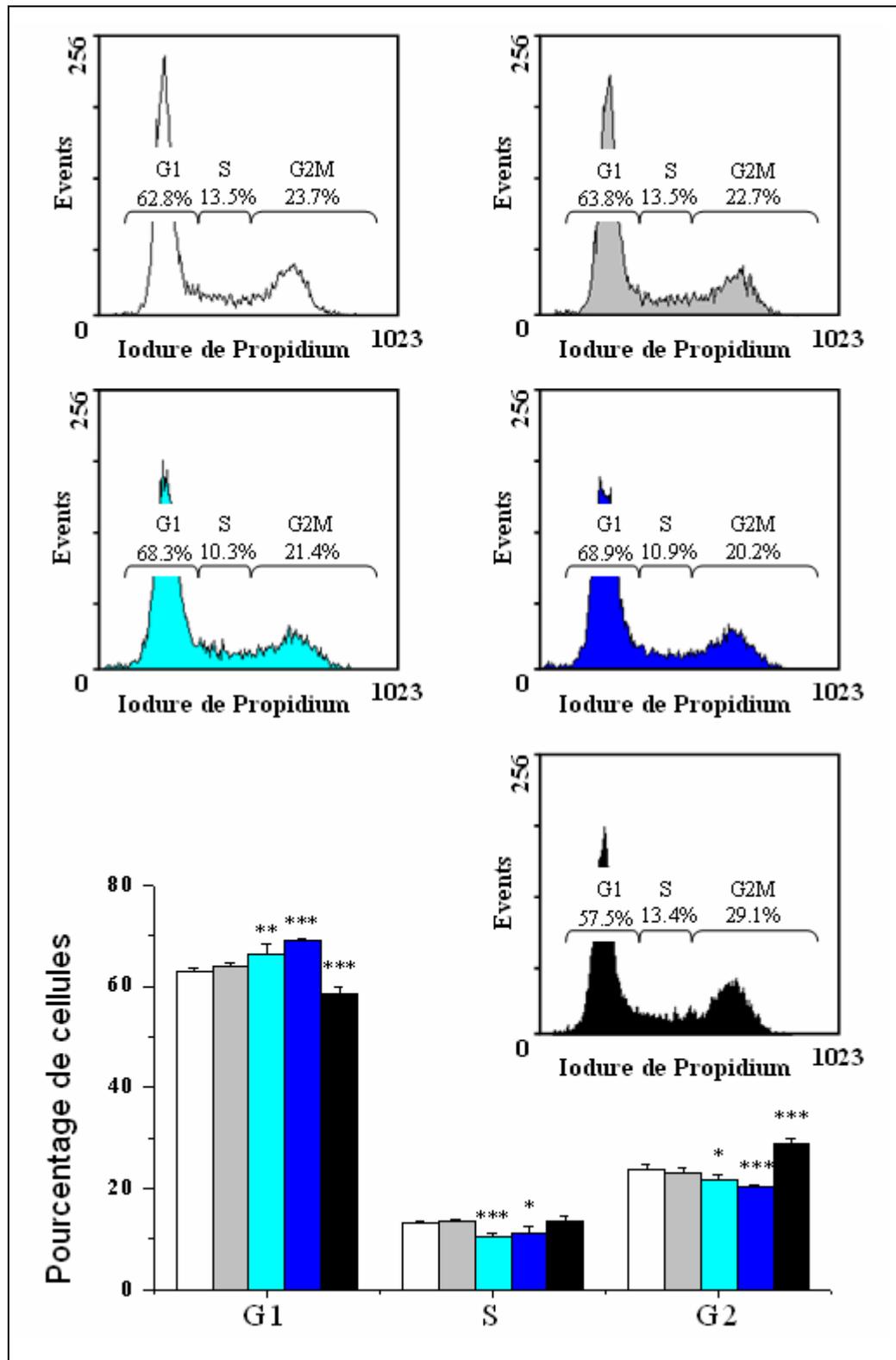


Figure C : En haut, graphes représentant la distribution des HEK293 dans le cycle cellulaire selon les traitements par des siRNA pendant 4 jours.

En bas, histogramme résumant la distribution des HEK3 dans le cycle cellulaire selon les traitements par des siRNA pendant 4 jours.

En blanc : siCTRL.

En gris : siSTIM1.

En cyan : siSTIM2.

En bleu : siSTIM1 et siSTIM2.

En noir : siOrai1.

*$p < 0.05$: * ; $p < 0.01$: ** ; $p < 0.001$: ***.*

Au cours de ma thèse, j'ai mis en évidence que TRPC6, STIM1 et Orai1 sont nécessaires pour la mise en place d'une CCE impliquée dans la prolifération des hépatomes humains [El Boustany *et al.*, 2008]. De plus, j'ai montré que, dans les HEK3, la prolifération cellulaire ainsi que la CCE sont intimement liées et que STIM2 et Orai1, mais non STIM1, seraient les acteurs majeurs de ce processus. Quant à STIM1, il jouerait un rôle mineur dans cette entrée calcique à l'origine de la croissance cellulaire des HEK3 à la différence d'autres lignées cellulaires [Abdullaev *et al.*, 2008]. Enfin, j'ai récemment mesuré le pourcentage des HEK3 dans les différentes phases du cycle cellulaire en fonction de divers traitements par des siRNA dirigés contre STIM1 ou STIM2, ou STIM1 et STIM2, ou Orai1 (Figure C). J'observe d'une part une augmentation de la phase G₂/M (blocage en phase G₂/M) dans les cellules traitées par le siOrai1 par rapport aux siCTRL et d'autre part une augmentation de la phase G₁ (blocage en phase G₁) dans les cellules traitées par le siSTIM2. Toutefois, aucun effet significatif n'a été observé dans les HEK3 traitées par le siSTIM1 confirmant ainsi un rôle majeur de STIM2 et Orai1 dans la prolifération de ces cellules.

Tenant compte de ces données nous pouvons proposer un modèle dans lequel Orai1 et STIM1 seront impliqués dans la CCE, des HEK3, mais cette entrée n'interviendra pas dans la prolifération de ces cellules (Figure D en haut). Par contre, un complexe formé de Orai1 et STIM2 serait à l'origine d'une CCE conduisant à la prolifération de cette lignée (Figure D en bas). Toutefois, il ne faut pas exclure la possibilité qu'un TRPC intervient dans ce complexe comme c'est le cas de TRPC6 au niveau des hépatomes humains.

En conclusion, la variabilité dans l'implication de STIM1 ou STIM2 dans la prolifération semblent être tissu-dépendante, par contre Orai1 formerait le noyau nécessaire à une CCE et en particulier dans le cadre d'une entrée calcique capacitive intervenant dans la prolifération cellulaire et ceci quelque soit le tissu.

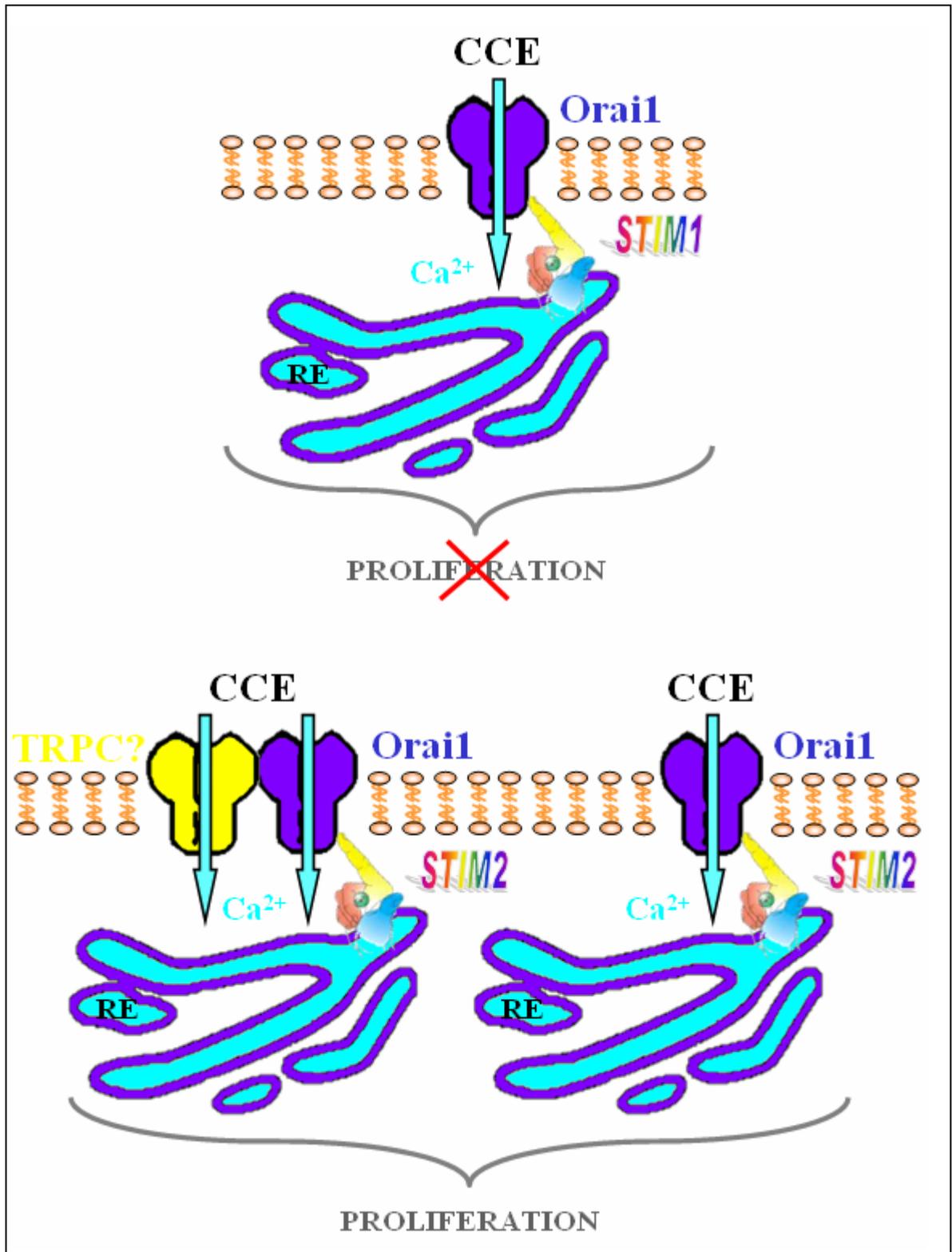


Figure D : Bases moléculaires de la CCE dans les HEK3.

En haut : CCE due à un complexe formé par STIM1 et Orai1 et n'induisant pas une prolifération cellulaire.

En bas : CCE impliquée dans la prolifération, dans les HEK3, dont l'origine est un complexe incluant STIM1, Orai1 et probablement un TRPC.

Calcium, cycline-cdk et prolifération

L'importance des cdk (kinases cycline-dépendantes), des cyclines et du calcium dans le cycle cellulaire et la prolifération est connue depuis plusieurs années [Balk, 1971 ; Hartwell *et al.*, 1974 ; Evans *et al.*, 1983]. Il est établi, de nos jours, une stricte relation entre ces 3 éléments. En effet, les cdk et les cyclines peuvent former des complexes permettant le passage d'une phase du cycle cellulaire à une autre, par exemple le complexe cdk1-cyclineB permet l'entrée en phase G₂/M (pour revues : [Whitaker and Patel, 1990 ; Santella *et al.*, 2005]). L'activation de ce complexe, par le p54 (cdc25-c), est sous la dépendance de phosphatases telles que la calmoduline [Patel *et al.*, 1999] dont l'activité est dépendante du taux de calcium cytosolique [Wang and Waisman, 1979] et plus particulièrement de l'influx calcique [Takuwa *et al.*, 1995]. De ce fait, l'entrée calcique joue un rôle majeur dans le contrôle de la division et de la prolifération cellulaire. Parmi les entrées calciques, la CCE joue un rôle important dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, des études en patch-clamp ont montré une réduction du courant SOC suite à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ [Bodding, 2001]. De plus, les inhibiteurs de cette entrée, tels que le 2-APB ou le CAI, diminuent la prolifération des hépatomes humains [Enfissi *et al.*, 2004]. Néanmoins, il ne faut pas exclure le rôle, dans ce processus, du calcium appartenant aux réserves calciques intra-réticulaires. En effet, de nombreuses données lient la prolifération et la croissance cellulaire à la CCE. Le but de cette dernière étant le remplissage des stocks calciques intra-réticulaires qui est sous le contrôle des SERCA. De ce fait, une régulation de l'expression des SERCA entraînera un changement de l'homéostasie calcique intra-réticulaires et par la suite une modulation de la prolifération et la croissance cellulaire (pour revue : [Lipskaia *et al.*, 2009]).

Le travail dans les HEK3, sur la relation entre l'arrêt du cycle cellulaire (au niveau de différentes phases) et l'amplitude du courant SOC, nous a permis de démontrer que dans une même lignée le blocage au niveau de chaque phase du cycle est nécessairement accompagné d'une diminution du SOC. De plus, nous avons démontré que l'expression de Orai1 est intimement liée à la progression du cycle cellulaire. En effet, l'arrêt du cycle cellulaire (au niveau de différentes phases) induit une diminution de l'expression de la protéine Orai1. Comme le niveau d'expression de l'ARNm de Orai1 n'est pas diminué, ces résultats indiquent que la transcription est normale mais qu'il y a probablement un arrêt de la traduction de cette protéine. De ce fait, la reprise du cycle cellulaire provoque, en un délai minimum de 4 heures, la traduction de Orai1 conduisant à une récupération rapide de l'expression de Orai1 ainsi que de la totalité de la CCE. Même si les mécanismes conduisant à l'arrêt la traduction de Orai1, suite à un

blocage du cycle cellulaire, ne sont pas connus à l'heure actuelle ce travail, néanmoins, a permis de démontrer une étroite relation entre l'expression d'un canal et la progression dans le cycle cellulaire.

Enfin, j'ai également montré, dans les hépatomes humains, qu'une diminution de différentes protéines (TRPC6, STIM1 et Orai1), impliquées dans une CCE, provoque en plus d'une diminution de la prolifération une forte réduction de l'expression de la cycline D1 [El Boustany *et al.*, 2008].

En conclusion, différents acteurs de l'influx calcique peuvent intervenir dans la régulation de cycle cellulaire et en particulier Orai1 qui semble être impliqué dans divers types cellulaires, en particulier dans les cellules endothéliales [Abdullaev *et al.*, 2008], les HEK293 et les Huh-7 [El Boustany *et al.*, 2008].

Localisation du signal calcique au niveau des microdomaines lipidiques

Les radeaux lipidiques (microdomaines ou encore « rafts » lipidiques) sont des entités membranaires riches en cholestérol, en glycosphingolipides et en protéines spécifiques telles que les protéines G et les cavéolines. Les cavéoles, décrites pour la première fois il y a 50 ans environ, sont une famille de radeaux lipidiques dont la protéine structurale est la cavéoline. Des travaux très anciens ont proposé une fonction régulatrice possible de l'entrée du calcium par le biais des cavéoles. En 1974, Popescu *et al.* ont utilisé l'oxalate de potassium afin de visualiser, au niveau de la membrane des cellules musculaires lisses, les précipités de Ca^{2+} par microscopie électronique. Ces précipités furent hautement localisés au niveau des cavéoles [Popescu *et al.*, 1974]. Sur la base de ces études, Popescu proposa une potentielle implication des cavéoles dans la translocation du Ca^{2+} du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire [Popescu, 1974]. Par la suite, différents travaux ont montré l'existence d'une multitude d'acteurs calciques au niveau des cavéoles tels que le IP_3R [Fujimoto *et al.*, 1992], les pompes Ca^{2+} -ATPases [Fujimoto, 1993] et certains membres de la famille des TRP [Lockwich *et al.*, 2000 ; Trevino *et al.*, 2001 ; Torihashi *et al.*, 2002 ; Murata *et al.*, 2007]. Des études récentes ont démontré l'implication des radeaux lipidiques dans la signalisation de 2 autres protéines, STIM1 et Orai1, possédant un rôle majeur dans la CCE [Jardin *et al.*, 2008 ; Pani *et al.*, 2008]. Orai1 peut se lier à différents TRPC et former ainsi un complexe activable par STIM1 (STIM1-Orai1-TRPC1 et TRPC6) [Ong *et al.*, 2007 ; Brechard *et al.*, 2008 ; Jardin *et al.*, 2009]. En effet, la formation d'un complexe STIM1-Orai1-TRPC au sein d'un microdomaine lipidique semble être une étape nécessaire pour l'obtention d'un SOC fonctionnel étant donné que la perturbation de ces radeaux

lipidiques empêche la mise en place d'un signal FRET (représentant un lien entre les composant du complexe SOC) et le développement d'un courant SOC [Sampieri *et al.*, 2008]. Sampieri *et al.* ont également démontré que le recrutement des radeaux lipidiques est sous la dépendance de STIM1 [Sampieri *et al.*, 2008]. De ce fait, l'équipe de Birnbaumer a postulé une hypothèse dans laquelle un complexe STIM1-Orai1 ou STIM1-Orai1-TRPC serait présent dans un radeau lipidique et agirait probablement en tant que CCE par contre, un complexe sans STIM1 (Orai1-TRPC ou TRPC-TRPC) agirait préférentiellement en tant que NCCE en dehors des radeaux lipidiques [Liao *et al.*, 2009] (Figure E).

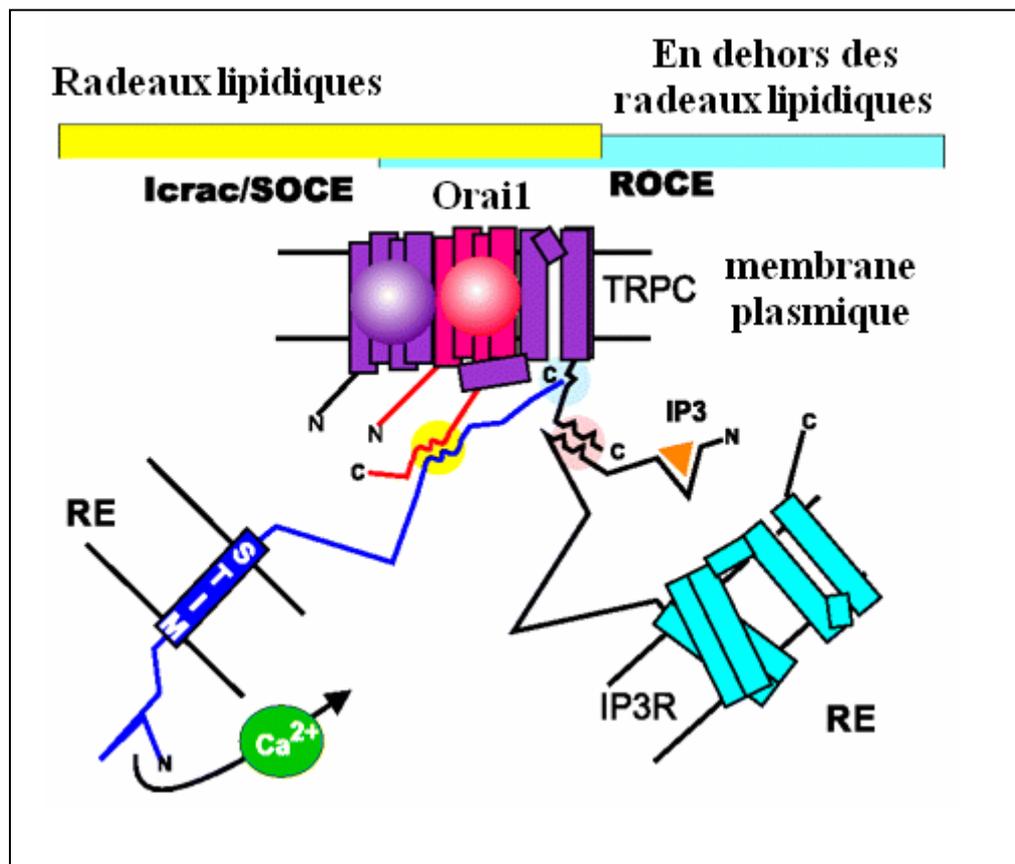


Figure E : Modèle du complexe *TRPC-Orai1*:

TRPC-Orai1 lié physiquement (au niveau du C-terminal) à *STIM1* agissant en tant que SOCE au niveau des radeaux lipidiques.

TRPC-Orai1 (en absence de *STIM1*) agit en tant que ROCE en dehors des radeaux lipidiques.

(Modifiée à partir de : [Liao *et al.*, 2009]).

En conclusion, il est envisageable que TRPC6 forme, dans les hépatomes humains, un complexe avec STIM1 et Orai1 présents au niveau de certains microdomaines et impliqués dans la CCE. De plus, l'absence de TRPC3 dans les cellules Huh-7 empêcherait la mise en place d'un hétérotétramère avec TRPC6 connu pour être généralement impliqué dans une forme d'entrée

non capacitive [Jardin *et al.*, 2009]. Le fait que TRPC3 soit absent pencherait la balance, encore plus, en la faveur de la mise en place d'un complexe STIM1-Orai1-TRPC6 présent au niveau d'un radeaux lipidique et impliqué dans une CCE.

TRPC6 dans une future thérapie génique

Comme déjà présenté, la diminution de l'expression de TRPC6 peut avoir un effet bénéfique sur la diminution de la prolifération des hépatomes humains. De ce fait, il est envisageable de présenter ce canal comme cible thérapeutique potentielle pour la réduction de la vitesse de prolifération d'une tumeur hépatique primitive. Sachant qu'il est pharmacologiquement difficile d'inhiber spécifiquement ce canal, une stratégie alternative, dans le cadre de la destruction de l'expression du messenger de TRPC6, passerait par l'utilisation de siRNA dirigés contre ce TRPC. Néanmoins, la demi-vie des siRNA natifs *in vivo* est courte (1 à 60 minutes) en raison de l'élimination rapide par filtration rénale et par dégradation due aux RNases endogènes présentes dans le sérum. Pour éviter cette perte rapide, certains lipides cationiques sont couramment utilisés avec succès pour la transfection des siRNA. En effet, les acides nucléiques sont complexés avec les lipides cationiques, souvent en présence d'un phospholipide neutre tel que le dioléoyl phosphatidyléthanolamine (DOPE), formant ainsi des particules condensées appelées LIPOPLEXES. Les interactions ioniques entre les lipides cationiques (chargés positivement) et les acides nucléiques (chargés négativement) sont des interactions électrostatiques hydrophobes permettant ainsi la formation d'une particule ayant une taille spécifique et dont la surface présente une charge caractéristique. L'adaptation, en fonction du type cellulaire, de ces deux propriétés (taille et charge) permet une meilleure absorption de ces particules lipidiques au niveau de la surface de la cellule. Byk *et al.* ont synthétisé une famille de lipides cationiques à longueur et à fraction lipidique variables [Byk *et al.*, 1998]. Certaines de ces molécules ont présenté un taux de transfection d'un plasmide particulièrement élevé dans divers types cellulaires [Byk *et al.*, 2001 ; Hofland *et al.*, 2002 ; Nicolazzi *et al.*, 2003 ; Carriere *et al.*, 2004]. Parmi elles, un lipopolyamine (RPR209120) présentant une double chaîne d'acides gras avec un bras de 14 carbones (C14). Ce dernier fut même adapté pour une utilisation non toxique, *in vivo*, permettant ainsi la délivrance des siRNA chez les souris [Khoury *et al.*, 2006 ; Khoury *et al.*, 2008].

Pour l'adressage des siRNA au niveau des hépatocytes, deux stratégies seront explorées :

- Premièrement, différentes compositions et concentrations lipidiques ainsi qu'une variété d'autres facteurs (tels que la présence de sel, le pH, la charge) seront testés pour l'obtention de

l'efficacité optimale pour l'adressage des siRNA, en culture puis *in vivo*, au niveau des hépatocytes. Afin d'obtenir la meilleure interaction électrostatique possible, nécessaire à l'obtention d'une efficacité de transfection maximale, les lipides cationiques (chargés positivement) doivent être complexés avec les acides nucléiques (chargés négativement) selon des ratios quantitatifs bien précis qu'il faut déterminer expérimentalement.

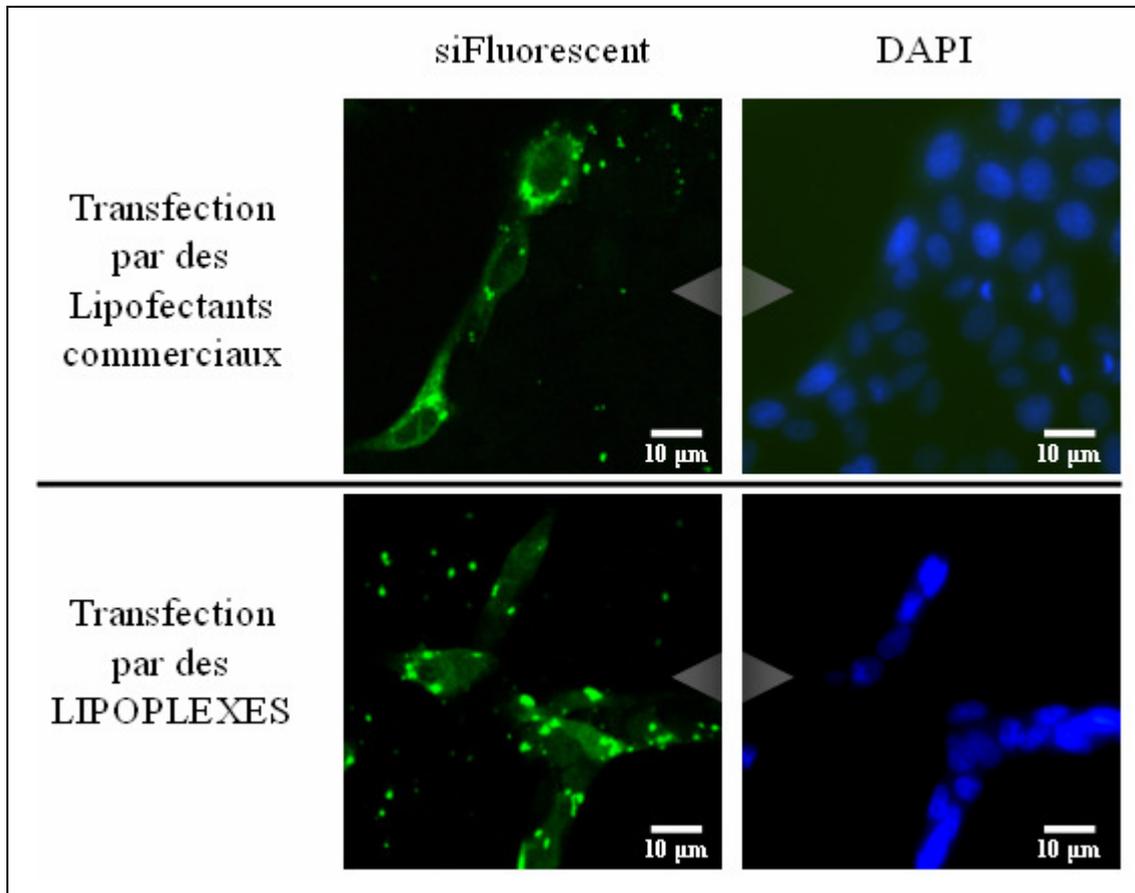


Figure F : Figure permettant l'estimation du rendement de transfection dans les Huh-7.

En vert : cellules transfectées par un siFluorescent (à une concentration de 20 nM).

En bleu : noyaux des cellules transfectées.

En haut : cellules transfectées par des lipofectants commerciaux :

Taux de transfection inférieur à 10 %.

En bas : cellules transfectées par des LIPOPLEXES :

Taux de transfection supérieur à 80 %.

- Deuxièmement, la structure LIPOPLEXES sera modifiée par le galactose afin de cibler spécifiquement les hépatocytes par l'intermédiaire du récepteur asialoglycoprotéine (ASGPR). En effet, les hépatocytes expriment des niveaux élevés de ASGPR. Ce récepteur permet la

clairance, par endocytose, des glycoprotéines sanguines ayant leur résidu galactose-terminal exposé suite à la perte du résidu salicylique-terminal. Cette stratégie, impliquant le ASGPR et les galactoses synthétiques conjugués avec les LIPOPLEXES, a déjà été utilisée pour cibler certains gènes au niveau cellulaire (pour revue : [Molas *et al.*, 2003]) ; [Frisch *et al.*, 2004]. Sous leur forme native, les siRNA injectés par voie intraveineuse sont de préférence adressés au foie (50 %), puis aux poumons, à la rate et au cerveau en proportion presque égale. Toutefois, l'injection à haute pression au niveau de la veine de la queue (HPTV : « High Pressure Tail Vein »), de ces mêmes siRNA chez la souris, augmenterait leur internalisation dans les hépatocytes [Song *et al.*, 2003]. Par conséquent, il est probable que la combinaison de ces techniques d'injection et l'utilisation des LIPOPLEXES aboutissent à un très haut taux de transfection des hépatocytes *in vivo*. Enfin, la vascularisation élevée des tumeurs devrait faciliter l'adressage des siRNA contre TRPC6 au niveau des cellules hépatiques proliférantes.

Nous avons conçu un siRNA dirigé contre TRPC6 capable d'inhiber, *in vitro*, l'expression de ce canal dans la lignée d'hépatomes humains Huh-7. L'efficacité de transfection des siRNA par les LIPOPLEXES sera tout d'abord testée sur des cellules en culture avant d'être adaptée au modèle animal. Plusieurs LIPOPLEXES seront conçus et testés pour éteindre l'expression de TRPC6 le plus efficacement possible. En effet, les premiers tests sur les Huh-7 en culture, avec des siFluorescents, présentent des résultats préliminaires encourageants. Les taux de transfection par les LIPOPLEXES sont 10 à 20 fois supérieurs par rapport aux systèmes de transfection commerciaux (Figure F). Toutefois, des expériences supplémentaires sont encore nécessaires aussi bien au niveau cellulaire que chez l'animal. Par la suite, il serait intéressant de cibler, grâce à ces LIPOPLEXES, des protéines spécifiques aux hépatocytes humains (tels que le ASGPR ou la tyrosine amino-transférase). Enfin, il restera à déterminer la méthode d'injection de ces complexes afin de déterminer la technique la plus adaptée pour un adressage maximal du siRNA contre TRPC6 au niveau du foie.

Conclusion générale

Comme pour la plupart des projets, quelque soit leur nature, celui entrepris au début de ma thèse de doctorat a du faire face à certains problèmes ou à certaines limites techniques qui n'avaient pas pu être anticipés. Mon projet, préalablement établie, s'est donc naturellement façonné en fonction des résultats obtenus et des nouvelles données bibliographiques. Mes 4 années de thèse sont passées très vite, sans doute trop vite pour répondre à toutes les questions que nous nous sommes posées initialement d'autant plus que l'évolution du sujet a soulevé un grand nombre de nouvelles questions.

Néanmoins, les travaux que j'ai réalisés au cours de cette thèse contribuent à élargir les connaissances sur les canaux calciques (TRPC6 et Orai1), présents au niveau de la membrane plasmique, ainsi que leurs protéines partenaires (STIM1 et STIM2) et leur rôle dans la prolifération cellulaire et en particulier dans la tumorigenèse hépatique. Dans le modèle cellulaire hépatique cancéreux, TRPC6, Orai1 et STIM1: 1) participent à l'entrée calcique capacitive et 2) à la prolifération cellulaire. Dans le modèle cellulaire hépatique sain, TRPC6: 1) est absent mais, 2) son expression devient détectable suite à un traitement par les facteurs de croissance et 3) entraînant par la suite la prolifération des hépatocytes sains ainsi que l'apparition de divers marqueurs de prolifération dans ces cellules. Au niveau tissulaire, TRPC6: 1) est absent des coupes de tissus hépatiques sains mais, 2) apparaît au niveau des foyers tumoraux. Dans la lignée HEK293: 1) Orai1, STIM1 et STIM2 participent à l'entrée capacitive mais, 2) seuls Orai1 et STIM2 interviennent dans la prolifération cellulaire et 3) seul l'expression de Orai1 est régulée dans le cadre d'un blocage du cycle cellulaire au niveau des différentes phases.

Nos résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle l'entrée calcique capacitive ainsi que ces acteurs sont impliqués dans la prolifération et la tumorigenèse. Il reste cependant à déterminer le niveau de participation ainsi que le moment d'intervention de ces différents acteurs en fonction des différents types cellulaires.

Finalement, même si les possibilités d'intervention pharmacologique sur les canaux calciques restent peu exploitables en thérapie, l'ensemble de ce travail ouvre la perspective d'une approche thérapeutique potentielle par le biais de TRPC6. En effet, la future mise en place de la thérapie génique ciblée contre TRPC6, par les LIPOPLEXES, permettrait peut-être une approche thérapeutique impliquant: un canal spécifique (TRPC6), une fonction particulière (la prolifération), un tissu donné (le foie) et un état pathologique (le cancer).

***Publication (s) et
communication personnelles***

Publication :

El Boustany C., Bidaux G., Enfissi A., Delcourt P., Prevarskaya N., Capiod T. Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation. *Hepatology*. 2008 Jun;47(6):2068-77.

Articles en préparation :

El Boustany C., Katsogiannou M., Delcourt P., Dewailly E., Prevarskaya N. and Capiod T. Differential roles of STIM1, STIM2 and Orai1 in the control of cell proliferation and SOCE amplitude in HEK293 cells. *Soumis à Journal of Biological Chemistry*.

Maria Katsogiannou, Charbel El Boustany, Florian Gackière, Philippe Delcourt, Anne Athias, Pascal Mariot, Etienne Dewailly, Nathalie Jouy, Christophe Lamaze, Brigitte Mauroy, Natalia Prevarskaya and Christian Slomianny. Caveolae contribute to the apoptosis resistance induced by the alpha1A-adrenoceptor in prostate cancer cells. *Soumis à Molecular Cancer*.

Communication personnelles :

Octobre 2008: Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation.

El Boustany C., Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, Capiod T.
Journée ARC Jeunes Chercheurs, Maison de la Chimie, Paris-France.

Septembre 2008: Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation.

El Boustany C., Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, Capiod T.
10th Meeting of the European Calcium Society, Leuven-Belgium.

Septembre 2007: Direct evidence for a role of TRPC6 in human hepatoma cell proliferation.

El Boustany C., Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, Capiod T.
Journée André Verbert, Ecole Doctorale Biologie Santé, Lille-France.

Septembre 2007: Direct evidence for a role of TRPC6 in human hepatoma cell proliferation.

El Boustany C., Bidaux G, Enfissi A, Delcourt P, Prevarskaya N, Capiod T.
18th Ion Channel Meeting. Presqu'île de Giens-France.

Bibliographie

- Abdullaev, I. F., J. M. Bisailon, M. Potier, J. C. Gonzalez, R. K. Motiani and M. Trebak (2008). "Stim1 and Orail1 mediate CRAC currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation." *Circ Res* **103**(11): 1289-99.
- Abramowitz, J. and L. Birnbaumer (2009). "Physiology and pathophysiology of canonical transient receptor potential channels." *Faseb J* **23**(2): 297-328.
- Albert, A. P., S. N. Saleh, C. M. Peppiatt-Wildman and W. A. Large (2007). "Multiple activation mechanisms of store-operated TRPC channels in smooth muscle cells." *J Physiol* **583**(Pt 1): 25-36.
- Alessandro, R., L. Masiero, L. A. Liotta and E. C. Kohn (1996). "The role of calcium in the regulation of invasion and angiogenesis." *In Vivo* **10**(2): 153-60.
- Ambudkar, I. S. (2006). "Ca²⁺ signaling microdomains: platforms for the assembly and regulation of TRPC channels." *Trends Pharmacol Sci* **27**(1): 25-32.
- Ambudkar, I. S. (2007). "TRPC1: a core component of store-operated calcium channels." *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 1): 96-100.
- Ambudkar, I. S. and H. L. Ong (2007). "Organization and function of TRPC channelosomes." *Pflugers Arch* **455**(2): 187-200.
- Amiri, H., G. Schultz and M. Schaefer (2003). "FRET-based analysis of TRPC subunit stoichiometry." *Cell Calcium* **33**(5-6): 463-70.
- Arnaudeau, S., M. Frieden, K. Nakamura, C. Castelbou, M. Michalak and N. Demaurex (2002). "Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria." *J Biol Chem* **277**(48): 46696-705.
- Baba, Y., K. Hayashi, Y. Fujii, A. Mizushima, H. Watarai, M. Wakamori, T. Numaga, Y. Mori, M. Iino, M. Hikida and T. Kurosaki (2006). "Coupling of STIM1 to store-operated Ca²⁺ entry through its constitutive and inducible movement in the endoplasmic reticulum." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(45): 16704-9.
- Baba, Y., K. Nishida, Y. Fujii, T. Hirano, M. Hikida and T. Kurosaki (2008). "Essential function for the calcium sensor STIM1 in mast cell activation and anaphylactic responses." *Nat Immunol* **9**(1): 81-8.
- Balk, S. D. (1971). "Stimulation of the proliferation of chicken fibroblasts by folic acid or a serum factor(s) in a plasma-containing medium." *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(8): 1689-92.
- Barritt, G. J., T. L. Litjens, J. Castro, E. Aromataris and G. Y. Rychkov (2009). "Store-operated Ca²⁺ channels and microdomains of Ca²⁺ in liver cells." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**(1): 77-83.
- Basora, N., G. Boulay, L. Bilodeau, E. Rousseau and M. D. Payet (2003). "20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) activates mouse TRPC6 channels expressed in HEK293 cells." *J Biol Chem* **278**(34): 31709-16.
- Beck, B., V. Lehen'kyi, M. Roudbaraki, M. Flourakis, M. Charveron, P. Bordat, R. Polakowska, N. Prevarskaya and R. Skryma (2008). "TRPC channels determine human keratinocyte differentiation: new insight into basal cell carcinoma." *Cell Calcium* **43**(5): 492-505.
- Beech, D. J. (2005). "TRPC1: store-operated channel and more." *Pflugers Arch* **451**(1): 53-60.
- Beech, D. J., K. Muraki and R. Flemming (2004). "Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP." *J Physiol* **559**(Pt 3): 685-706.
- Beech, D. J., S. Z. Xu, D. McHugh and R. Flemming (2003). "TRPC1 store-operated cationic channel subunit." *Cell Calcium* **33**(5-6): 433-40.
- Bepler, G. and M. A. Garcia-Blanco (1994). "Three tumor-suppressor regions on chromosome 11p identified by high-resolution deletion mapping in human non-small-cell lung cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12): 5513-7.
- Berlin, J., K. D. Tutsch, R. Z. Arzooonian, D. Alberti, K. Binger, C. Feierabend, A. Dresen, R. Marnocha, J. Pluda and G. Wilding (2002). "Phase I and pharmacokinetic study of a

- micronized formulation of carboxyamidotriazole, a calcium signal transduction inhibitor: toxicity, bioavailability and the effect of food." Clin Cancer Res **8**(1): 86-94.
- Berlin, J., K. D. Tutsch, P. Hutson, J. Cleary, R. P. Rago, R. Z. Arzooonian, D. Alberti, C. Feierabend and G. Wilding (1997). "Phase I clinical and pharmacokinetic study of oral carboxyamidotriazole, a signal transduction inhibitor." J Clin Oncol **15**(2): 781-9.
- Berra-Romani, R., A. Mazzocco-Spezia, M. V. Pulina and V. A. Golovina (2008). "Ca²⁺ handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture." Am J Physiol Cell Physiol **295**(3): C779-90.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman and P. Lipp (1998). "Calcium--a life and death signal." Nature **395**(6703): 645-8.
- Berridge, M. J. and R. F. Irvine (1989). "Inositol phosphates and cell signalling." Nature **341**(6239): 197-205.
- Berridge, M. J., P. Lipp and M. D. Bootman (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." Nat Rev Mol Cell Biol **1**(1): 11-21.
- Besnard-Guerin, C., I. Newsham, R. Winqvist and W. K. Cavenee (1996). "A common region of loss of heterozygosity in Wilms' tumor and embryonal rhabdomyosarcoma distal to the D11S988 locus on chromosome 11p15.5." Hum Genet **97**(2): 163-70.
- Bezprozvanny, I., J. Watras and B. E. Ehrlich (1991). "Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P₃- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum." Nature **351**(6329): 751-4.
- Bianchi, K., A. Rimessi, A. Prandini, G. Szabadkai and R. Rizzuto (2004). "Calcium and mitochondria: mechanisms and functions of a troubled relationship." Biochim Biophys Acta **1742**(1-3): 119-31.
- Birnbaumer, L., A. Dietrich, B. Kawasaki and M. X. Zhu (2003). "Multiple interactions between TRPCs and IP3Rs: TRPC3-interacting domains of IP3R serve to identify TRPCs as components of CCE channels; yet, IP3R activation does not activate TRPC3 channels." Nova Acta Leopold **89**(336): 61-67.
- Birnbaumer, L., X. Zhu, M. Jiang, G. Boulay, M. Peyton, B. Vannier, D. Brown, D. Platano, H. Sadeghi, E. Stefani and M. Birnbaumer (1996). "On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: roles for Trp proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(26): 15195-202.
- Blaustein, M. P. and W. J. Lederer (1999). "Sodium/calcium exchange: its physiological implications." Physiol Rev **79**(3): 763-854.
- Bodding, M. (2001). "Reduced store-operated Ca²⁺ currents in rat basophilic leukaemia cells cultured under serum-free conditions." Cell Calcium **30**(2): 141-50.
- Bootman, M. D., T. J. Collins, L. Mackenzie, H. L. Roderick, M. J. Berridge and C. M. Peppiatt (2002). "2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca²⁺ entry but an inconsistent inhibitor of InsP₃-induced Ca²⁺ release." Faseb J **16**(10): 1145-50.
- Boudjema, K., P. Compagnon, E. Dupont-Bierre, R. Lorho, M. Lakehal, A. S. Thirouard, B. Meunier and M. Messner (2005). "[Liver transplantation for hepatocellular carcinoma]." Cancer Radiother **9**(6-7): 458-63.
- Boulay, G. (2002). "Ca²⁺-calmodulin regulates receptor-operated Ca²⁺ entry activity of TRPC6 in HEK-293 cells." Cell Calcium **32**(4): 201-7.
- Boulay, G., D. M. Brown, N. Qin, M. Jiang, A. Dietrich, M. X. Zhu, Z. Chen, M. Birnbaumer, K. Mikoshiba and L. Birnbaumer (1999). "Modulation of Ca²⁺ entry by polypeptides of the inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor (IP3R) that bind transient receptor potential (TRP): evidence for roles of TRP and IP3R in store depletion-activated Ca²⁺ entry." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14955-60.
- Boulay, G., X. Zhu, M. Peyton, M. Jiang, R. Hurst, E. Stefani and L. Birnbaumer (1997). "Cloning and expression of a novel mammalian homolog of Drosophila transient receptor

- potential (Trp) involved in calcium entry secondary to activation of receptors coupled by the Gq class of G protein." *J Biol Chem* **272**(47): 29672-80.
- Brandl, C. J., S. deLeon, D. R. Martin and D. H. MacLennan (1987). "Adult forms of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle." *J Biol Chem* **262**(8): 3768-74.
- Brandman, O., J. Liou, W. S. Park and T. Meyer (2007). "STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels." *Cell* **131**(7): 1327-39.
- Brechar, S., C. Melchior, S. Plancon, V. Schenten and E. J. Tschirhart (2008). "Store-operated Ca²⁺ channels formed by TRPC1, TRPC6 and Orai1 and non-store-operated channels formed by TRPC3 are involved in the regulation of NADPH oxidase in HL-60 granulocytes." *Cell Calcium* **44**(5): 492-506.
- Brueggemann, L. I., D. R. Markun, K. K. Henderson, L. L. Cribbs and K. L. Byron (2006). "Pharmacological and electrophysiological characterization of store-operated currents and capacitative Ca(2+) entry in vascular smooth muscle cells." *J Pharmacol Exp Ther* **317**(2): 488-99.
- Bucher, N. L. (1963). "Regeneration of Mammalian Liver." *Int Rev Cytol* **15**: 245-300.
- Byk, G., C. Dubertret, V. Escriou, M. Frederic, G. Jaslin, R. Rangara, B. Pitard, J. Crouzet, P. Wils, B. Schwartz and D. Scherman (1998). "Synthesis, activity, and structure--activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer." *J Med Chem* **41**(2): 229-35.
- Byk, G., D. Scherman, B. Schwartz and C. Dubertret (2001). "US Patent 6171612 - Lipopolyamines as transfection agents and pharmaceutical uses thereof." *US Patent* **6 171 612**.
- Byrne, J. A., L. A. Simms, M. H. Little, E. M. Algar and P. J. Smith (1993). "Three non-overlapping regions of chromosome arm 11p allele loss identified in infantile tumors of adrenal and liver." *Genes Chromosomes Cancer* **8**(2): 104-11.
- Cahalan, M. D., S. L. Zhang, A. V. Yeromin, K. Ohlsen, J. Roos and K. A. Stauderman (2007). "Molecular basis of the CRAC channel." *Cell Calcium* **42**(2): 133-44.
- Carafoli, E. (1994). "Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme." *Faseb J* **8**(13): 993-1002.
- Carafoli, E. (2002). "Calcium signaling: a tale for all seasons." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1115-22.
- Carriere, M., V. Escriou, A. Jollet, D. Scherman, M. Azoulay and C. Monneret (2004). "New synthetic glycolipids for targeted gene transfer: synthesis, formulation in lipoplexes and specific interaction with lectin." *Drug Deliv* **11**(6): 351-63.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**(6653): 816-24.
- Cayouette, S., M. P. Lussier, E. L. Mathieu, S. M. Bousquet and G. Boulay (2004). "Exocytotic insertion of TRPC6 channel into the plasma membrane upon Gq protein-coupled receptor activation." *J Biol Chem* **279**(8): 7241-6.
- Chami, M., D. Gozuacik, D. Lagorce, M. Brini, P. Falson, G. Peaucellier, P. Pinton, H. Lecoeur, M. L. Gougeon, M. le Maire, R. Rizzuto, C. Brechot and P. Paterlini-Brechot (2001). "SERCA1 truncated proteins unable to pump calcium reduce the endoplasmic reticulum calcium concentration and induce apoptosis." *J Cell Biol* **153**(6): 1301-14.
- Chami, M., D. Gozuacik, K. Saigo, T. Capiod, P. Falson, H. Lecoeur, T. Urashima, J. Beckmann, M. L. Gougeon, M. Claret, M. le Maire, C. Brechot and P. Paterlini-Brechot (2000). "Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis." *Oncogene* **19**(25): 2877-86.
- Chard, P. S., D. Bleakman, S. Christakos, C. S. Fullmer and R. J. Miller (1993). "Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones." *J Physiol* **472**: 341-57.

- Cheng, K. T., X. Liu, H. L. Ong and I. S. Ambudkar (2008). "Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels." *J Biol Chem* **283**(19): 12935-40.
- Chiu, W. T., M. J. Tang, H. C. Jao and M. R. Shen (2008). "Soft substrate up-regulates the interaction of STIM1 with store-operated Ca²⁺ channels that lead to normal epithelial cell apoptosis." *Mol Biol Cell* **19**(5): 2220-30.
- Christian, E. P., K. T. Spence, J. A. Togo, P. G. Dargis and E. Warawa (1996). "Extracellular site for econazole-mediated block of Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current (I_{crac}) in T lymphocytes." *Br J Pharmacol* **119**(4): 647-54.
- Chubanov, V., S. Waldegger, M. Mederos y Schnitzler, H. Vitzthum, M. C. Sassen, H. W. Seyberth, M. Konrad and T. Gudermann (2004). "Disruption of TRPM6/TRPM7 complex formation by a mutation in the TRPM6 gene causes hypomagnesemia with secondary hypocalcemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 2894-9.
- Cioffi, D. L., S. Wu, M. Alexeyev, S. R. Goodman, M. X. Zhu and T. Stevens (2005). "Activation of the endothelial store-operated ISOC Ca²⁺ channel requires interaction of protein 4.1 with TRPC4." *Circ Res* **97**(11): 1164-72.
- Colton, C. K. and M. X. Zhu (2007). "2-Aminoethoxydiphenyl borate as a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels." *Handb Exp Pharmacol*(179): 173-87.
- Cosens, D. J. and A. Manning (1969). "Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant." *Nature* **224**(5216): 285-7.
- D'Esposito, M., M. Strazzullo, M. Cuccurese, C. Spalluto, M. Rocchi, M. D'Urso and A. Ciccodicola (1998). "Identification and assignment of the human transient receptor potential channel 6 gene TRPC6 to chromosome 11q21-->q22." *Cytogenet Cell Genet* **83**(1-2): 46-7.
- Darbellay, B., S. Arnaudeau, S. Konig, H. Jousset, C. Bader, N. Demaurex and L. Bernheim (2009). "STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation." *J Biol Chem* **284**(8): 5370-80.
- Dawson, J. L. and K. C. Tan (1992). "Anatomy of the liver." *Pathophysiology, diagnosis and management vol 1*(3rd ed): 3-11.
- DeHaven, W. I., J. T. Smyth, R. R. Boyles and J. W. Putney, Jr. (2007). "Calcium inhibition and calcium potentiation of Orai1, Orai2, and Orai3 calcium release-activated calcium channels." *J Biol Chem* **282**(24): 17548-56.
- Desai, A. A., F. Innocenti, L. Janisch, M. DeMario, D. Shepard, J. Ramirez, G. F. Fleming and M. J. Ratain (2004). "A phase I trial of pharmacokinetic modulation of carboxyamidotriazole (CAI) with ketoconazole in patients with advanced cancer." *Cancer Chemother Pharmacol* **54**(5): 377-84.
- Deuffic, S., L. Buffat, T. Poynard and A. J. Valleron (1999). "Modeling the hepatitis C virus epidemic in France." *Hepatology* **29**(5): 1596-601.
- Di Leva, F., T. Domi, L. Fedrizzi, D. Lim and E. Carafoli (2008). "The plasma membrane Ca²⁺-ATPase of animal cells: structure, function and regulation." *Arch Biochem Biophys* **476**(1): 65-74.
- Dietrich, A. and T. Gudermann (2007). "Trpc6." *Handb Exp Pharmacol*(179): 125-41.
- Dietrich, A., H. Kalwa, B. R. Rost and T. Gudermann (2005). "The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance." *Pflugers Arch* **451**(1): 72-80.
- Dietrich, A., M. Mederos y Schnitzler, J. Emmel, H. Kalwa, T. Hofmann and T. Gudermann (2003). "N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity." *J Biol Chem* **278**(48): 47842-52.
- Dolmetsch, R. E., R. S. Lewis, C. C. Goodnow and J. I. Healy (1997). "Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration." *Nature* **386**(6627): 855-8.
- Dutcher, J. P., L. Leon, J. Manola, D. M. Friedland, B. Roth and G. Wilding (2005). "Phase II study of carboxyamidotriazole in patients with advanced renal cell carcinoma refractory

- to immunotherapy: E4896, an Eastern Cooperative Oncology Group Study." Cancer **104**(11): 2392-9.
- Dziadek, M. A. and L. S. Johnstone (2007). "Biochemical properties and cellular localisation of STIM proteins." Cell Calcium **42**(2): 123-32.
- Edmonds, B., R. Reyes, B. Schwaller and W. M. Roberts (2000). "Calretinin modifies presynaptic calcium signaling in frog saccular hair cells." Nat Neurosci **3**(8): 786-90.
- El Boustany, C., G. Bidaux, A. Enfissi, P. Delcourt, N. Prevarskaya and T. Capiod (2008). "Capacitative calcium entry and transient receptor potential canonical 6 expression control human hepatoma cell proliferation." Hepatology **47**(6): 2068-77.
- Enfissi, A., S. Prigent, P. Colosetti and T. Capiod (2004). "The blocking of capacitative calcium entry by 2-aminoethyl diphenylborate (2-APB) and carboxyamidotriazole (CAI) inhibits proliferation in Hep G2 and Huh-7 human hepatoma cells." Cell Calcium **36**(6): 459-67.
- Evans, T., E. T. Rosenthal, J. Youngblom, D. Distel and T. Hunt (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." Cell **33**(2): 389-96.
- Fantozzi, I., S. Zhang, O. Platoshyn, C. V. Remillard, R. T. Cowling and J. X. Yuan (2003). "Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca²⁺ entry in human pulmonary artery endothelial cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(6): L1233-45.
- Fausto, N. (2000). "Liver regeneration." J Hepatol **32**(1 Suppl): 19-31.
- Fausto, N., A. D. Laird and E. M. Webber (1995). "Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration." Faseb J **9**(15): 1527-36.
- Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S. H. Puppel, B. Tanasa, P. G. Hogan, R. S. Lewis, M. Daly and A. Rao (2006). "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function." Nature **441**(7090): 179-85.
- Feske, S., M. Prakriya, A. Rao and R. S. Lewis (2005). "A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients." J Exp Med **202**(5): 651-62.
- Figg, W. D., K. A. Cole, E. Reed, S. M. Steinberg, S. C. Piscitelli, P. A. Davis, M. J. Soltis, J. Jacob, S. Boudoulas, B. Goldspiel and et al. (1995). "Pharmacokinetics of orally administered carboxyamido-triazole, an inhibitor of calcium-mediated signal transduction." Clin Cancer Res **1**(8): 797-803.
- Fiorio Pla, A., D. Maric, S. C. Brazer, P. Giacobini, X. Liu, Y. H. Chang, I. S. Ambudkar and J. L. Barker (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**(10): 2687-701.
- Flemming, R., S. Z. Xu and D. J. Beech (2003). "Pharmacological profile of store-operated channels in cerebral arteriolar smooth muscle cells." Br J Pharmacol **139**(5): 955-65.
- Flourakis, M., F. Van Coppenolle, V. Lehen'kyi, B. Beck, R. Skryma and N. Prevarskaya (2006). "Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA₂-pathway regulated store operated channels activation." Faseb J **20**(8): 1215-7.
- Frisch, B., M. Carriere, C. Largeau, F. Mathey, C. Masson, F. Schuber, D. Scherman and V. Escriou (2004). "A new triantennary galactose-targeted PEGylated gene carrier, characterization of its complex with DNA, and transfection of hepatoma cells." Bioconjug Chem **15**(4): 754-64.
- Frischauf, I., R. Schindl, I. Derler, J. Bergsmann, M. Fahrner and C. Romanin (2008). "The STIM/Orai coupling machinery." Channels (Austin) **2**(4): 261-8.
- Fujimoto, T. (1993). "Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae." J Cell Biol **120**(5): 1147-57.
- Fujimoto, T., S. Nakade, A. Miyawaki, K. Mikoshiba and K. Ogawa (1992). "Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae." J Cell Biol **119**(6): 1507-13.

- Gackiere, F., G. Bidaux, P. Lory, N. Prevarskaya and P. Mariot (2006). "A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry?" Cell Calcium **39**(4): 357-66.
- Galili, G., C. Sengupta-Gopalan and A. Ceriotti (1998). "The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies." Plant Mol Biol **38**(1-2): 1-29.
- Galione, A., H. C. Lee and W. B. Busa (1991). "Ca(2+)-induced Ca²⁺ release in sea urchin egg homogenates: modulation by cyclic ADP-ribose." Science **253**(5024): 1143-6.
- Garcia, R. L. and W. P. Schilling (1997). "Differential expression of mammalian TRP homologues across tissues and cell lines." Biochem Biophys Res Commun **239**(1): 279-83.
- Gelebart, P., V. Martin, J. Enouf and B. Papp (2003). "Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation." Biochem Biophys Res Commun **303**(2): 676-84.
- Glassford, J., I. Soeiro, S. M. Skarell, L. Banerji, M. Holman, G. G. Klaus, T. Kadowaki, S. Koyasu and E. W. Lam (2003). "BCR targets cyclin D2 via Btk and the p85alpha subunit of PI3-K to induce cell cycle progression in primary mouse B cells." Oncogene **22**(15): 2248-59.
- Godin, N. and E. Rousseau (2007). "TRPC6 silencing in primary airway smooth muscle cells inhibits protein expression without affecting OAG-induced calcium entry." Mol Cell Biochem **296**(1-2): 193-201.
- Goel, M., W. G. Sinkins and W. P. Schilling (2002). "Selective association of TRPC channel subunits in rat brain synaptosomes." J Biol Chem **277**(50): 48303-10.
- Golovina, V. A. (1999). "Cell proliferation is associated with enhanced capacitative Ca(2+) entry in human arterial myocytes." Am J Physiol **277**(2 Pt 1): C343-9.
- Golovina, V. A., O. Platoshyn, C. L. Bailey, J. Wang, A. Limsuwan, M. Sweeney, L. J. Rubin and J. X. Yuan (2001). "Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca(2+) entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(2): H746-55.
- Gopinath, R. M. and F. F. Vincenzi (1977). "Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of (Ca²⁺-Mg²⁺)ATPase." Biochem Biophys Res Commun **77**(4): 1203-9.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Gross, S. A., U. Wissenbach, S. E. Philipp, M. Freichel, A. Cavalie and V. Flockerzi (2007). "Murine ORAI2 splice variants form functional Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels." J Biol Chem **282**(27): 19375-84.
- Guerini, D. (1998). "The Ca²⁺ pumps and the Na⁺/Ca²⁺ exchangers." Biometals **11**(4): 319-30.
- Guilbert, A., I. Dhennin-Duthille, Y. E. Hiani, N. Haren, H. Khorsi, H. Sevestre, A. Ahidouch and H. Ouadid-Ahidouch (2008). "Expression of TRPC6 channels in human epithelial breast cancer cells." BMC Cancer **8**: 125.
- Gwack, Y., S. Srikanth, S. Feske, F. Cruz-Guilloty, M. Oh-hora, D. S. Neems, P. G. Hogan and A. Rao (2007). "Biochemical and functional characterization of Orai proteins." J Biol Chem **282**(22): 16232-43.
- Hardie, R. C. and B. Minke (1992). "The trp gene is essential for a light-activated Ca²⁺ channel in Drosophila photoreceptors." Neuron **8**(4): 643-51.
- Harper, J. L., C. S. Camerini-Otero, A. H. Li, S. A. Kim, K. A. Jacobson and J. W. Daly (2003). "Dihydropyridines as inhibitors of capacitative calcium entry in leukemic HL-60 cells." Biochem Pharmacol **65**(3): 329-38.
- Hartwell, L. H., J. Culotti, J. R. Pringle and B. J. Reid (1974). "Genetic control of the cell division cycle in yeast." Science **183**(120): 46-51.

- Hewavitharana, T., X. Deng, J. Soboloff and D. L. Gill (2007). "Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway." Cell Calcium **42**(2): 173-82.
- Hirota, J., M. Baba, M. Matsumoto, T. Furuichi, K. Takatsu and K. Mikoshiba (1998). "T-cell-receptor signalling in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R) type-1-deficient mice: is IP3R type 1 essential for T-cell-receptor signalling?" Biochem J **333** (Pt 3): 615-9.
- Hisatsune, C., Y. Kuroda, K. Nakamura, T. Inoue, T. Nakamura, T. Michikawa, A. Mizutani and K. Mikoshiba (2004). "Regulation of TRPC6 channel activity by tyrosine phosphorylation." J Biol Chem **279**(18): 18887-94.
- Hoenderop, J. G., T. Voets, S. Hoefs, F. Weidema, J. Prenen, B. Nilius and R. J. Bindels (2003). "Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca²⁺ channels TRPV5 and TRPV6." Embo J **22**(4): 776-85.
- Hofer, A. M. and T. E. Machen (1993). "Technique for in situ measurement of calcium in intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive stores using the fluorescent indicator mag-fura-2." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(7): 2598-602.
- Hofland, H. E., C. Masson, S. Iginla, I. Osetinsky, J. A. Reddy, C. P. Leamon, D. Scherman, M. Bessodes and P. Wils (2002). "Folate-targeted gene transfer in vivo." Mol Ther **5**(6): 739-44.
- Hofmann, T., A. G. Obukhov, M. Schaefer, C. Harteneck, T. Gudermann and G. Schultz (1999). "Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol." Nature **397**(6716): 259-63.
- Hofmann, T., M. Schaefer, G. Schultz and T. Gudermann (2000). "Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry." J Mol Med **78**(1): 14-25.
- Hofmann, T., M. Schaefer, G. Schultz and T. Gudermann (2002). "Subunit composition of mammalian transient receptor potential channels in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(11): 7461-6.
- Hoth, M. and R. Penner (1992). "Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells." Nature **355**(6358): 353-6.
- Hoth, M. and R. Penner (1993). "Calcium release-activated calcium current in rat mast cells." J Physiol **465**: 359-86.
- Hu, H. Z., Q. Gu, C. Wang, C. K. Colton, J. Tang, M. Kinoshita-Kawada, L. Y. Lee, J. D. Wood and M. X. Zhu (2004). "2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3." J Biol Chem **279**(34): 35741-8.
- Huang, G. N., W. Zeng, J. Y. Kim, J. P. Yuan, L. Han, S. Muallem and P. F. Worley (2006). "STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels." Nat Cell Biol **8**(9): 1003-10.
- Hudmon, A. and H. Schulman (2002). "Neuronal CA²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function." Annu Rev Biochem **71**: 473-510.
- Hupe, D. J., R. Boltz, C. J. Cohen, J. Felix, E. Ham, D. Miller, D. Soderman and D. Van Skiver (1991). "The inhibition of receptor-mediated and voltage-dependent calcium entry by the antiproliferative L-651,582." J Biol Chem **266**(16): 10136-42.
- Hussain, M. M., H. Kotz, L. Minasian, A. Premkumar, G. Sarosy, E. Reed, S. Zhai, S. M. Steinberg, M. Raggio, V. K. Oliver, W. D. Figg and E. C. Kohn (2003). "Phase II trial of carboxyamidotriazole in patients with relapsed epithelial ovarian cancer." J Clin Oncol **21**(23): 4356-63.
- Inoue, R., L. J. Jensen, J. Shi, H. Morita, M. Nishida, A. Honda and Y. Ito (2006). "Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease." Circ Res **99**(2): 119-31.
- Inoue, R., T. Okada, H. Onoue, Y. Hara, S. Shimizu, S. Naitoh, Y. Ito and Y. Mori (2001). "The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of

- vascular $\alpha(1)$ -adrenoceptor-activated $\text{Ca}(2+)$ -permeable cation channel." *Circ Res* **88**(3): 325-32.
- Ishikawa, J., K. Ohga, T. Yoshino, R. Takezawa, A. Ichikawa, H. Kubota and T. Yamada (2003). "A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained $\text{Ca}2+$ influx and IL-2 production in T lymphocytes." *J Immunol* **170**(9): 4441-9.
- Isshiki, M. and R. G. Anderson (2003). "Function of caveolae in $\text{Ca}2+$ entry and $\text{Ca}2+$ -dependent signal transduction." *Traffic* **4**(11): 717-23.
- Jardin, I., L. J. Gomez, G. M. Salido and J. A. Rosado (2009). "Dynamic interaction of hTRPC6 with the Orai1/STIM1 complex or hTRPC3 mediates its role in capacitative or non-capacitative $\text{Ca}2+$ entry pathways." *Biochem J*.
- Jardin, I., J. J. Lopez, G. M. Salido and J. A. Rosado (2008). "Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming $\text{Ca}2+$ channels." *J Biol Chem* **283**(37): 25296-304.
- Jardin, I., G. M. Salido and J. A. Rosado (2008). "Role of lipid rafts in the interaction between hTRPC1, Orai1 and STIM1." *Channels (Austin)* **2**(6): 401-3.
- Jeffery, R., R. Poulson and M. R. Alison (2009). "Sources of adult hepatic stem cells: haematopoietic." *Methods Mol Biol* **481**: 1-14.
- Johnson, E. A., R. S. Marks, S. J. Mandrekar, S. L. Hillman, M. D. Hauge, M. D. Bauman, E. J. Wos, D. F. Moore, J. W. Kugler, H. E. Windschitl, D. L. Graham, A. M. Bernath, Jr., T. R. Fitch, G. S. Soori, J. R. Jett, A. A. Adjei and E. A. Perez (2008). "Phase III randomized, double-blind study of maintenance CAI or placebo in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) after completion of initial therapy (NCCTG 97-24-51)." *Lung Cancer* **60**(2): 200-7.
- Jung, S., R. Strotmann, G. Schultz and T. D. Plant (2002). "TRPC6 is a candidate channel involved in receptor-stimulated cation currents in A7r5 smooth muscle cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **282**(2): C347-59.
- Kahl, C. R. and A. R. Means (2003). "Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways." *Endocr Rev* **24**(6): 719-36.
- Kedei, N., T. Szabo, J. D. Lile, J. J. Treanor, Z. Olah, M. J. Iadarola and P. M. Blumberg (2001). "Analysis of the native quaternary structure of vanilloid receptor 1." *J Biol Chem* **276**(30): 28613-9.
- Khoury, M., V. Escriou, G. Courties, A. Galy, R. Yao, C. Largeau, D. Scherman, C. Jorgensen and F. Apparailly (2008). "Efficient suppression of murine arthritis by combined anticytokine small interfering RNA lipoplexes." *Arthritis Rheum* **58**(8): 2356-67.
- Khoury, M., P. Louis-Pence, V. Escriou, D. Noel, C. Largeau, C. Cantos, D. Scherman, C. Jorgensen and F. Apparailly (2006). "Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis." *Arthritis Rheum* **54**(6): 1867-77.
- Kim, J. Y. and D. Saffen (2005). "Activation of M1 muscarinic acetylcholine receptors stimulates the formation of a multiprotein complex centered on TRPC6 channels." *J Biol Chem* **280**(36): 32035-47.
- Kohn, E. C., W. D. Figg, G. A. Sarosy, K. S. Bauer, P. A. Davis, M. J. Soltis, A. Thompkins, L. A. Liotta and E. Reed (1997). "Phase I trial of micronized formulation carboxyamidotriazole in patients with refractory solid tumors: pharmacokinetics, clinical outcome, and comparison of formulations." *J Clin Oncol* **15**(5): 1985-93.
- Kohn, E. C., E. Reed, G. A. Sarosy, L. Minasian, K. S. Bauer, F. Bostick-Bruton, V. Kulpa, E. Fuse, A. Tompkins, M. Noone, B. Goldspiel, J. Pluda, W. D. Figg and L. A. Liotta (2001). "A phase I trial of carboxyamido-triazole and paclitaxel for relapsed solid tumors: potential efficacy of the combination and demonstration of pharmacokinetic interaction." *Clin Cancer Res* **7**(6): 1600-9.

- Koi, M., L. A. Johnson, L. M. Kalikin, P. F. Little, Y. Nakamura and A. P. Feinberg (1993). "Tumor cell growth arrest caused by subchromosomal transferable DNA fragments from chromosome 11." *Science* **260**(5106): 361-4.
- Koufos, A., P. Grundy, K. Morgan, K. A. Aleck, T. Hadro, B. C. Lampkin, A. Kalbakji and W. K. Cavenee (1989). "Familial Wiedemann-Beckwith syndrome and a second Wilms tumor locus both map to 11p15.5." *Am J Hum Genet* **44**(5): 711-9.
- Kovac, J. R., T. Chrones and S. M. Sims (2008). "Temporal and spatial dynamics underlying capacitative calcium entry in human colonic smooth muscle." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**(1): G88-98.
- Kremer, B., C. E. Broelsch and D. Heme-Bruns (1994). "Atlas of liver, pancreas, and kidney transplantation." *Thieme*.
- Kumar, B., K. Dreja, S. S. Shah, A. Cheong, S. Z. Xu, P. Sukumar, J. Naylor, A. Forte, M. Cipollaro, D. McHugh, P. A. Kingston, A. M. Heagerty, C. M. Munsch, A. Bergdahl, A. Hultgardh-Nilsson, M. F. Gomez, K. E. Porter, P. Hellstrand and D. J. Beech (2006). "Upregulated TRPC1 channel in vascular injury in vivo and its role in human neointimal hyperplasia." *Circ Res* **98**(4): 557-63.
- Kunichika, N., J. W. Landsberg, Y. Yu, H. Kunichika, P. A. Thistlethwaite, L. J. Rubin and J. X. Yuan (2004). "Bosentan inhibits transient receptor potential channel expression in pulmonary vascular myocytes." *Am J Respir Crit Care Med* **170**(10): 1101-7.
- Leuner, K., V. Kazanski, M. Muller, K. Essin, B. Henke, M. Gollasch, C. Harteneck and W. E. Muller (2007). "Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels." *Faseb J* **21**(14): 4101-11.
- Leung, H. T., C. Geng and W. L. Pak (2000). "Phenotypes of trpl mutants and interactions between the transient receptor potential (TRP) and TRP-like channels in Drosophila." *J Neurosci* **20**(18): 6797-803.
- Liao, Y., C. Erxleben, J. Abramowitz, V. Flockerzi, M. X. Zhu, D. L. Armstrong and L. Birnbaumer (2008). "Functional interactions among Orai1, TRPCs, and STIM1 suggest a STIM-regulated heteromeric Orai/TRPC model for SOCE/Icrac channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 2895-900.
- Liao, Y., C. Erxleben, E. Yildirim, J. Abramowitz, D. L. Armstrong and L. Birnbaumer (2007). "Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11): 4682-7.
- Liao, Y., N. W. Plummer, M. D. George, J. Abramowitz, M. X. Zhu and L. Birnbaumer (2009). "A role for Orai in TRPC-mediated Ca²⁺ entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca²⁺ entry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(9): 3202-6.
- Liou, J., M. Fivaz, T. Inoue and T. Meyer (2007). "Live-cell imaging reveals sequential oligomerization and local plasma membrane targeting of stromal interaction molecule 1 after Ca²⁺ store depletion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(22): 9301-6.
- Liou, J., M. L. Kim, W. D. Heo, J. T. Jones, J. W. Myers, J. E. Ferrell, Jr. and T. Meyer (2005). "STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx." *Curr Biol* **15**(13): 1235-41.
- Lioudyno, M. I., J. A. Kozak, A. Penna, O. Safrina, S. L. Zhang, D. Sen, J. Roos, K. A. Stauderman and M. D. Cahalan (2008). "Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(6): 2011-6.
- Lipskaia, L., J. S. Hulot and A. M. Lompre (2009). "Role of sarco/endoplasmic reticulum calcium content and calcium ATPase activity in the control of cell growth and proliferation." *Pflugers Arch* **457**(3): 673-85.
- Lis, A., C. Peinelt, A. Beck, S. Parvez, M. Monteilh-Zoller, A. Fleig and R. Penner (2007). "CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties." *Curr Biol* **17**(9): 794-800.

- Liu, X., B. C. Bandyopadhyay, B. B. Singh, K. Groschner and I. S. Ambudkar (2005). "Molecular analysis of a store-operated and 2-acetyl-sn-glycerol-sensitive non-selective cation channel. Heteromeric assembly of TRPC1-TRPC3." J Biol Chem **280**(22): 21600-6.
- Liu, X., K. Groschner and I. S. Ambudkar (2004). "Distinct Ca(2+)-permeable cation currents are activated by internal Ca(2+)-store depletion in RBL-2H3 cells and human salivary gland cells, HSG and HSY." J Membr Biol **200**(2): 93-104.
- Liu, X., B. B. Singh and I. S. Ambudkar (2003). "TRPC1 is required for functional store-operated Ca²⁺ channels. Role of acidic amino acid residues in the S5-S6 region." J Biol Chem **278**(13): 11337-43.
- Liu, X., W. Wang, B. B. Singh, T. Lockwich, J. Jadlowiec, B. O'Connell, R. Wellner, M. X. Zhu and I. S. Ambudkar (2000). "Trp1, a candidate protein for the store-operated Ca(2+) influx mechanism in salivary gland cells." J Biol Chem **275**(5): 3403-11.
- Llinas, R., M. Sugimori and R. B. Silver (1992). "Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal." Science **256**(5057): 677-9.
- Locke, F. S. (1894). "Notiz uber den Einfluss, physiologischer Kochsalzlosung auf die Eregerbarkeit von Muscel and Nerve." Zentralbl. Physiol. **8**: 166-167.
- Lockwich, T. P., X. Liu, B. B. Singh, J. Jadlowiec, S. Weiland and I. S. Ambudkar (2000). "Assembly of Trp1 in a signaling complex associated with caveolin-scaffolding lipid raft domains." J Biol Chem **275**(16): 11934-42.
- Lompre, A. M., F. Lambert, E. G. Lakatta and K. Schwartz (1991). "Expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and calsequestrin genes in rat heart during ontogenic development and aging." Circ Res **69**(5): 1380-8.
- Lopez, J. J., G. M. Salido, J. A. Pariente and J. A. Rosado (2006). "Interaction of STIM1 with endogenously expressed human canonical TRP1 upon depletion of intracellular Ca²⁺ stores." J Biol Chem **281**(38): 28254-64.
- Lothe, R. A., N. Hastie, K. Heimdal, S. D. Fossa, A. E. Stenwig and A. L. Borresen (1993). "Frequent loss of 11p13 and 11p15 loci in male germ cell tumours." Genes Chromosomes Cancer **7**(2): 96-101.
- Louis, N., C. Eveleigh and F. L. Graham (1997). "Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line." Virology **233**(2): 423-9.
- Loyer, P., G. Ilyin, S. Cariou, D. Glaise, A. Corlu and C. Guguen-Guillouzo (1996). "Progression through G1 and S phases of adult rat hepatocytes." Prog Cell Cycle Res **2**: 37-47.
- Luik, R. M., B. Wang, M. Prakriya, M. M. Wu and R. S. Lewis (2008). "Oligomerization of STIM1 couples ER calcium depletion to CRAC channel activation." Nature **454**(7203): 538-42.
- Luik, R. M., M. M. Wu, J. Buchanan and R. S. Lewis (2006). "The elementary unit of store-operated Ca²⁺ entry: local activation of CRAC channels by STIM1 at ER-plasma membrane junctions." J Cell Biol **174**(6): 815-25.
- Mackenzie, L., M. D. Bootman, M. Laine, M. J. Berridge, J. Thuring, A. Holmes, W. H. Li and P. Lipp (2002). "The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca(2+) signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes." J Physiol **541**(Pt 2): 395-409.
- Manji, S. S., N. J. Parker, R. T. Williams, L. van Stekelenburg, R. B. Pearson, M. Dziadek and P. J. Smith (2000). "STIM1: a novel phosphoprotein located at the cell surface." Biochim Biophys Acta **1481**(1): 147-55.
- Martonosi, A. N. and S. Pikula (2003). "The structure of the Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum." Acta Biochim Pol **50**(2): 337-65.
- Maruyama, T., T. Kanaji, S. Nakade, T. Kanno and K. Mikoshiba (1997). "2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P₃-induced Ca²⁺ release." J Biochem **122**(3): 498-505.

- Means, A. R. (1988). "Molecular mechanisms of action of calmodulin." Recent Prog Horm Res **44**: 223-62.
- Meehan, S., A. J. Wu, E. C. Kang, T. Sakai and I. S. Ambudkar (1997). "Interferon-gamma induces a decrease in the intracellular calcium pump in a human salivary gland cell line." Am J Physiol **273**(6 Pt 1): C2030-6.
- Melman, Y. F., A. Krummerman and T. V. McDonald (2002). "KCNE regulation of KvLQT1 channels: structure-function correlates." Trends Cardiovasc Med **12**(4): 182-7.
- Mercer, J. C., W. I. Dehaven, J. T. Smyth, B. Wedel, R. R. Boyles, G. S. Bird and J. W. Putney, Jr. (2006). "Large store-operated calcium selective currents due to co-expression of Orai1 or Orai2 with the intracellular calcium sensor, Stim1." J Biol Chem **281**(34): 24979-90.
- Merritt, J. E., W. P. Armstrong, C. D. Benham, T. J. Hallam, R. Jacob, A. Jaxa-Chamiec, B. K. Leigh, S. A. McCarthy, K. E. Moores and T. J. Rink (1990). "SK&F 96365, a novel inhibitor of receptor-mediated calcium entry." Biochem J **271**(2): 515-22.
- Michalopoulos, G. K. and M. C. DeFrances (1997). "Liver regeneration." Science **276**(5309): 60-6.
- Mignen, O., C. Brink, A. Enfissi, A. Nadkarni, T. J. Shuttleworth, D. R. Giovannucci and T. Capiod (2005). "Carboxyamidotriazole-induced inhibition of mitochondrial calcium import blocks capacitative calcium entry and cell proliferation in HEK-293 cells." J Cell Sci **118**(Pt 23): 5615-23.
- Mignen, O., J. L. Thompson and T. J. Shuttleworth (2003). "Calcineurin directs the reciprocal regulation of calcium entry pathways in nonexcitable cells." J Biol Chem **278**(41): 40088-96.
- Mignen, O., J. L. Thompson and T. J. Shuttleworth (2008). "Orai1 subunit stoichiometry of the mammalian CRAC channel pore." J Physiol **586**(2): 419-25.
- Mikkelsen, T., R. Lush, S. A. Grossman, K. A. Carson, J. D. Fisher, J. B. Alavi and S. Rosenfeld (2007). "Phase II clinical and pharmacologic study of radiation therapy and carboxyamido-triazole (CAI) in adults with newly diagnosed glioblastoma multiforme." Invest New Drugs **25**(3): 259-63.
- Minke, B. (2006). "TRP channels and Ca²⁺ signaling." Cell Calcium **40**(3): 261-75.
- Minke, B. and Z. Selinger (1991). "Inositol lipid pathway in fly photoreceptors : excitation, calcium mobilization and retinal degeneration " Progress in Retinal Research, Pergamon Press(N.A. Osborne, G.J. Chader (Eds.),): 99-124.
- Minke, B., C. Wu and W. L. Pak (1975). "Induction of photoreceptor voltage noise in the dark in *Drosophila* mutant." Nature **258**(5530): 84-7.
- Misquitta, C. M., D. P. Mack and A. K. Grover (1999). "Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ (SERCA)-pumps: link to heart beats and calcium waves." Cell Calcium **25**(4): 277-90.
- Miyazaki, S., M. Yuzaki, K. Nakada, H. Shirakawa, S. Nakanishi, S. Nakade and K. Mikoshiba (1992). "Block of Ca²⁺ wave and Ca²⁺ oscillation by antibody to the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs." Science **257**(5067): 251-5.
- Molas, M., A. G. Gomez-Valades, A. Vidal-Alabro, M. Miguel-Turu, J. Bermudez, R. Bartrons and J. C. Perales (2003). "Receptor-mediated gene transfer vectors: progress towards genetic pharmaceuticals." Curr Gene Ther **3**(5): 468-85.
- Montell, C. (1999). "Visual transduction in *Drosophila*." Annu Rev Cell Dev Biol **15**: 231-68.
- Montell, C. (2005). "The TRP superfamily of cation channels." Sci STKE **2005**(272): re3.
- Montell, C., L. Birnbaumer, V. Flockerzi, R. J. Bindels, E. A. Bruford, M. J. Caterina, D. E. Clapham, C. Harteneck, S. Heller, D. Julius, I. Kojima, Y. Mori, R. Penner, D. Prawitt, A. M. Scharenberg, G. Schultz, N. Shimizu and M. X. Zhu (2002). "A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels." Mol Cell **9**(2): 229-31.
- Montell, C. and G. M. Rubin (1989). "Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction." Neuron **2**(4): 1313-23.

- Muik, M., M. Fahrner, I. Derler, R. Schindl, J. Bergsmann, I. Frischauf, K. Groschner and C. Romanin (2009). "A cytosolic homomerization and a modulatory domain within STIM1 C-terminus determine coupling to ORAI1 channels." J Biol Chem.
- Muik, M., I. Frischauf, I. Derler, M. Fahrner, J. Bergsmann, P. Eder, R. Schindl, C. Hesch, B. Polzinger, R. Fritsch, H. Kahr, J. Madl, H. Gruber, K. Groschner and C. Romanin (2008). "Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation." J Biol Chem **283**(12): 8014-22.
- Muller, M., K. Essin, K. Hill, H. Beschmann, S. Rubant, C. M. Schempp, M. Gollasch, W. H. Boehncke, C. Harteneck, W. E. Muller and K. Leuner (2008). "Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation." J Biol Chem **283**(49): 33942-54.
- Mullhaupt, B., A. Feren, E. Fodor and A. Jones (1994). "Liver expression of epidermal growth factor RNA. Rapid increases in immediate-early phase of liver regeneration." J Biol Chem **269**(31): 19667-70.
- Munaron, L., S. Antoniotti and D. Lovisolo (2004). "Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms?" J Cell Mol Med **8**(2): 161-8.
- Murata, T., M. I. Lin, R. V. Stan, P. M. Bauer, J. Yu and W. C. Sessa (2007). "Genetic evidence supporting caveolae microdomain regulation of calcium entry in endothelial cells." J Biol Chem **282**(22): 16631-43.
- Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane and J. Sato (1982). "Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium." Cancer Res **42**(9): 3858-63.
- Nakagawa, T., H. Okano, T. Furuichi, J. Aruga and K. Mikoshiba (1991). "The subtypes of the mouse inositol 1,4,5-trisphosphate receptor are expressed in a tissue-specific and developmentally specific manner." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(14): 6244-8.
- Nakamura, M., H. Saito, H. Ebinuma, K. Wakabayashi, Y. Saito, T. Takagi, N. Nakamoto and H. Ishii (2001). "Reduction of telomerase activity in human liver cancer cells by a histone deacetylase inhibitor." J Cell Physiol **187**(3): 392-401.
- Nicolazzi, C., N. Mignet, N. de la Figuera, M. Cadet, R. T. Ibad, J. Seguin, D. Scherman and M. Bessodes (2003). "Anionic polyethyleneglycol lipids added to cationic lipoplexes increase their plasmatic circulation time." J Control Release **88**(3): 429-43.
- Nilius, B. (2007). "TRP channels in disease." Biochim Biophys Acta **1772**(8): 805-12.
- Oh-Hora, M., M. Yamashita, P. G. Hogan, S. Sharma, E. Lamperti, W. Chung, M. Prakriya, S. Feske and A. Rao (2008). "Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance." Nat Immunol **9**(4): 432-43.
- Okada, T., R. Inoue, K. Yamazaki, A. Maeda, T. Kurosaki, T. Yamakuni, I. Tanaka, S. Shimizu, K. Ikenaka, K. Imoto and Y. Mori (1999). "Molecular and functional characterization of a novel mouse transient receptor potential protein homologue TRP7. Ca(2+)-permeable cation channel that is constitutively activated and enhanced by stimulation of G protein-coupled receptor." J Biol Chem **274**(39): 27359-70.
- Ong, H. L., K. T. Cheng, X. Liu, B. C. Bandyopadhyay, B. C. Paria, J. Soboloff, B. Pani, Y. Gwack, S. Srikanth, B. B. Singh, D. L. Gill and I. S. Ambudkar (2007). "Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components." J Biol Chem **282**(12): 9105-16.
- Owsianik, G., K. Talavera, T. Voets and B. Nilius (2006). "Permeation and selectivity of TRP channels." Annu Rev Physiol **68**: 685-717.
- Ozil, J. P., S. Markoulaki, S. Toth, S. Matson, B. Banrezes, J. G. Knott, R. M. Schultz, D. Huneau and T. Ducibella (2005). "Egg activation events are regulated by the duration of a sustained [Ca²⁺]_{cyt} signal in the mouse." Dev Biol **282**(1): 39-54.

- Pani, B., H. L. Ong, X. Liu, K. Rauser, I. S. Ambudkar and B. B. Singh (2008). "Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca²⁺ entry (SOCE)." *J Biol Chem* **283**(25): 17333-40.
- Parekh, A. B. and J. W. Putney, Jr. (2005). "Store-operated calcium channels." *Physiol Rev* **85**(2): 757-810.
- Parker, N. J., C. G. Begley, P. J. Smith and R. M. Fox (1996). "Molecular cloning of a novel human gene (D11S4896E) at chromosomal region 11p15.5." *Genomics* **37**(2): 253-6.
- Parvez, S., A. Beck, C. Peinelt, J. Soboloff, A. Lis, M. Monteilh-Zoller, D. L. Gill, A. Fleig and R. Penner (2008). "STIM2 protein mediates distinct store-dependent and store-independent modes of CRAC channel activation." *Faseb J* **22**(3): 752-61.
- Patapoutian, A., S. Tate and C. J. Woolf (2009). "Transient receptor potential channels: targeting pain at the source." *Nat Rev Drug Discov* **8**(1): 55-68.
- Patel, R., M. Holt, R. Philipova, S. Moss, H. Schulman, H. Hidaka and M. Whitaker (1999). "Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells." *J Biol Chem* **274**(12): 7958-68.
- Peinelt, C., M. Vig, D. L. Koomoa, A. Beck, M. J. Nadler, M. Koblan-Huberson, A. Lis, A. Fleig, R. Penner and J. P. Kinet (2006). "Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1)." *Nat Cell Biol* **8**(7): 771-3.
- Penna, A., A. Demuro, A. V. Yeromin, S. L. Zhang, O. Safrina, I. Parker and M. D. Cahalan (2008). "The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers." *Nature* **456**(7218): 116-20.
- Petrovic, M. M., K. Vales, B. Putnikovic, V. Djulejic and D. M. Mitrovic (2008). "Ryanodine receptors, voltage-gated calcium channels and their relationship with protein kinase A in the myocardium." *Physiol Res* **57**(2): 141-9.
- Philipp, S., C. Trost, J. Warnat, J. Rautmann, N. Himmerkus, G. Schroth, O. Kretz, W. Nastainczyk, A. Cavalie, M. Hoth and V. Flockerzi (2000). "TRP4 (CCE1) protein is part of native calcium release-activated Ca²⁺-like channels in adrenal cells." *J Biol Chem* **275**(31): 23965-72.
- Phillips, A. M., A. Bull and L. E. Kelly (1992). "Identification of a Drosophila gene encoding a calmodulin-binding protein with homology to the trp phototransduction gene." *Neuron* **8**(4): 631-42.
- Popescu, L. M. (1974). "Conceptual model of the excitation-contraction coupling in smooth muscle: the possible role of the surface micro-vesicles." *Studia Biophysica* **44**: 141-153.
- Popescu, L. M., I. Diculescu, U. Zelck and N. Ionescu (1974). "Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study." *Cell Tissue Res* **154**(3): 357-78.
- Potier, M., J. C. Gonzalez, R. K. Motiani, I. F. Abdullaev, J. M. Bisailon, H. A. Singer and M. Trebak (2009). "Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration." *Faseb J*.
- Pozzan, T., R. Rizzuto, P. Volpe and J. Meldolesi (1994). "Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores." *Physiol Rev* **74**(3): 595-636.
- Prakriya, M., S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao and P. G. Hogan (2006). "Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel." *Nature* **443**(7108): 230-3.
- Putney, J. W. (2005). "Physiological mechanisms of TRPC activation." *Pflugers Arch* **451**(1): 29-34.
- Putney, J. W., Jr. (1986). "A model for receptor-regulated calcium entry." *Cell Calcium* **7**(1): 1-12.
- Putney, J. W., Jr., D. L. Aub, C. W. Taylor and J. E. Merritt (1986). "Formation and biological action of inositol 1,4,5-trisphosphate." *Fed Proc* **45**(11): 2634-8.
- Rao, J. N., O. Platoshyn, V. A. Golovina, L. Liu, T. Zou, B. S. Marasa, D. J. Turner, J. X. Yuan and J. Y. Wang (2006). "TRPC1 functions as a store-operated Ca²⁺ channel in intestinal

- epithelial cells and regulates early mucosal restitution after wounding." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(4): G782-92.
- Reeve, A. E., S. A. Sih, A. M. Raizis and A. P. Feinberg (1989). "Loss of allelic heterozygosity at a second locus on chromosome 11 in sporadic Wilms' tumor cells." Mol Cell Biol **9**(4): 1799-803.
- Reiser, J., K. R. Polu, C. C. Moller, P. Kenlan, M. M. Altintas, C. Wei, C. Faul, S. Herbert, I. Villegas, C. Avila-Casado, M. McGee, H. Sugimoto, D. Brown, R. Kalluri, P. Mundel, P. L. Smith, D. E. Clapham and M. R. Pollak (2005). "TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function." Nat Genet **37**(7): 739-44.
- Ringer, S. (1882). "Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle." J Physiol **3**(5-6): 380-93.
- Rojas, P., A. Surroca, A. Orellana and D. Wolff (2000). "Kinetic characterization of calcium uptake by the rat liver Golgi apparatus." Cell Biol Int **24**(4): 229-33.
- Roos, J., P. J. DiGregorio, A. V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J. A. Kozak, S. L. Wagner, M. D. Cahalan, G. Velicelebi and K. A. Stauderman (2005). "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function." J Cell Biol **169**(3): 435-45.
- Ruano, Y., M. Mollejo, T. Ribalta, C. Fiano, F. I. Camacho, E. Gomez, A. R. de Lope, J. L. Hernandez-Moneo, P. Martinez and B. Melendez (2006). "Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling." Mol Cancer **5**: 39.
- Sabbioni, S., G. Barbanti-Brodano, C. M. Croce and M. Negrini (1997). "GOK: a gene at 11p15 involved in rhabdomyosarcoma and rhabdoid tumor development." Cancer Res **57**(20): 4493-7.
- Sabbioni, S., A. Veronese, M. Trubia, R. Taramelli, G. Barbanti-Brodano, C. M. Croce and M. Negrini (1999). "Exon structure and promoter identification of STIM1 (alias GOK), a human gene causing growth arrest of the human tumor cell lines G401 and RD." Cytogenet Cell Genet **86**(3-4): 214-8.
- Saleh, S. N., A. P. Albert, C. M. Peppiatt-Wildman and W. A. Large (2008). "Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in vascular myocytes." J Physiol **586**(10): 2463-76.
- Sampieri, A., A. Zepeda, C. Saldana, A. Salgado and L. Vaca (2008). "STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts." Cell Calcium **44**(5): 479-91.
- Santella, L., E. Ercolano and G. A. Nusco (2005). "The cell cycle: a new entry in the field of Ca²⁺ signaling." Cell Mol Life Sci **62**(21): 2405-13.
- Schuh, K., E. J. Cartwright, E. Jankevics, K. Bundschu, J. Liebermann, J. C. Williams, A. L. Armesilla, M. Emerson, D. Oceandy, K. P. Knobloch and L. Neyses (2004). "Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility." J Biol Chem **279**(27): 28220-6.
- Sell, S., K. Osborn and H. L. Leffert (1981). "Autoradiography of "oval cells" appearing rapidly in the livers of rats fed N-2-fluorenylacetamide in a choline devoid diet." Carcinogenesis **2**(1): 7-14.
- Serysheva, II, S. L. Hamilton, W. Chiu and S. J. Ludtke (2005). "Structure of Ca²⁺ release channel at 14 Å resolution." J Mol Biol **345**(3): 427-31.
- Shaw, M. E. and M. A. Knowles (1995). "Deletion mapping of chromosome 11 in carcinoma of the bladder." Genes Chromosomes Cancer **13**(1): 1-8.
- Shi, J., E. Mori, Y. Mori, M. Mori, J. Li, Y. Ito and R. Inoue (2004). "Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells." J Physiol **561**(Pt 2): 415-32.

- Shimizu, Y. and L. M. Hendershot (2007). "Organization of the functions and components of the endoplasmic reticulum." Adv Exp Med Biol **594**: 37-46.
- Shiojiri, N., J. M. Lemire and N. Fausto (1991). "Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development." Cancer Res **51**(10): 2611-20.
- Shuttleworth, T. J. (2009). "Arachidonic acid, ARC channels, and Orai proteins." Cell Calcium.
- Shuttleworth, T. J., J. L. Thompson and O. Mignen (2004). "ARC channels: a novel pathway for receptor-activated calcium entry." Physiology (Bethesda) **19**: 355-61.
- Simon, S. M. and G. Blobel (1991). "A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum." Cell **65**(3): 371-80.
- Skryma, R., P. Mariot, X. L. Bourhis, F. V. Coppenolle, Y. Shuba, F. Vanden Abeele, G. Legrand, S. Humez, B. Boilly and N. Prevarskaya (2000). "Store depletion and store-operated Ca²⁺ current in human prostate cancer LNCaP cells: involvement in apoptosis." J Physiol **527 Pt 1**: 71-83.
- Smyth, J. T., W. I. Dehaven, B. F. Jones, J. C. Mercer, M. Trebak, G. Vazquez and J. W. Putney, Jr. (2006). "Emerging perspectives in store-operated Ca²⁺ entry: roles of Orai, Stim and TRP." Biochim Biophys Acta **1763**(11): 1147-60.
- Soboloff, J., M. A. Spassova, T. Hewavitharana, L. P. He, W. Xu, L. S. Johnstone, M. A. Dziadek and D. L. Gill (2006). "STIM2 is an inhibitor of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ Entry." Curr Biol **16**(14): 1465-70.
- Soboloff, J., M. A. Spassova, X. D. Tang, T. Hewavitharana, W. Xu and D. L. Gill (2006). "Orai1 and STIM reconstitute store-operated calcium channel function." J Biol Chem **281**(30): 20661-5.
- Song, E., S. K. Lee, J. Wang, N. Ince, N. Ouyang, J. Min, J. Chen, P. Shankar and J. Lieberman (2003). "RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis." Nat Med **9**(3): 347-51.
- Sorrentino, V. (2003). "Ryanodine receptor type 3: why another ryanodine receptor isoform?" Front Biosci **8**: d176-82.
- Starzl, T. E., T. L. Marchioro, K. N. Vonkaulla, G. Hermann, R. S. Brittain and W. R. Waddell (1963). "Homotransplantation of the Liver in Humans." Surg Gynecol Obstet **117**: 659-76.
- Stathopoulos, P. B., L. Zheng and M. Ikura (2009). "Stromal interaction molecule (STIM) 1 and STIM2 calcium sensing regions exhibit distinct unfolding and oligomerization kinetics." J Biol Chem **284**(2): 728-32.
- Strubing, C., G. Krapivinsky, L. Krapivinsky and D. E. Clapham (2003). "Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain." J Biol Chem **278**(40): 39014-9.
- Sweeney, M., Y. Yu, O. Platoshyn, S. Zhang, S. S. McDaniel and J. X. Yuan (2002). "Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**(1): L144-55.
- Takuwa, N., A. Iwamoto, M. Kumada, K. Yamashita and Y. Takuwa (1991). "Role of Ca²⁺ influx in bombesin-induced mitogenesis in Swiss 3T3 fibroblasts." J Biol Chem **266**(3): 1403-9.
- Takuwa, N., W. Zhou, M. Kumada and Y. Takuwa (1993). "Ca(2+)-dependent stimulation of retinoblastoma gene product phosphorylation and p34cdc2 kinase activation in serum-stimulated human fibroblasts." J Biol Chem **268**(1): 138-45.
- Takuwa, N., W. Zhou and Y. Takuwa (1995). "Calcium, calmodulin and cell cycle progression." Cell Signal **7**(2): 93-104.
- Tani, D., M. K. Monteilh-Zoller, A. Fleig and R. Penner (2007). "Cell cycle-dependent regulation of store-operated I(CRAC) and Mg²⁺-nucleotide-regulated MagNum (TRPM7) currents." Cell Calcium **41**(3): 249-60.

- Teramoto, K., K. Asahina, Y. Kumashiro, S. Kakinuma, R. Chinzei, K. Shimizu-Saito, Y. Tanaka, H. Teraoka and S. Arii (2005). "Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells." J Hepatobiliary Pancreat Surg **12**(3): 196-202.
- Thebault, S., M. Flourakis, K. Vanoverberghe, F. Vandermoere, M. Roudbaraki, V. Lehen'kyi, C. Slomianny, B. Beck, P. Mariot, J. L. Bonnal, B. Mauroy, Y. Shuba, T. Capiod, R. Skryma and N. Prevarskaya (2006). "Differential role of transient receptor potential channels in Ca²⁺ entry and proliferation of prostate cancer epithelial cells." Cancer Res **66**(4): 2038-47.
- Tomono, M., K. Toyoshima, M. Ito, H. Amano and Z. Kiss (1998). "Inhibitors of calcineurin block expression of cyclins A and E induced by fibroblast growth factor in Swiss 3T3 fibroblasts." Arch Biochem Biophys **353**(2): 374-8.
- Torihashi, S., T. Fujimoto, C. Trost and S. Nakayama (2002). "Calcium oscillation linked to pacemaking of interstitial cells of Cajal: requirement of calcium influx and localization of TRP4 in caveolae." J Biol Chem **277**(21): 19191-7.
- Trebak, M., L. Lemonnier, J. T. Smyth, G. Vazquez and J. W. Putney, Jr. (2007). "Phospholipase C-coupled receptors and activation of TRPC channels." Handb Exp Pharmacol(179): 593-614.
- Trebak, M., G. Vazquez, G. S. Bird and J. W. Putney, Jr. (2003). "The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels." Cell Calcium **33**(5-6): 451-61.
- Trevino, C. L., C. J. Serrano, C. Beltran, R. Felix and A. Darszon (2001). "Identification of mouse trp homologs and lipid rafts from spermatogenic cells and sperm." FEBS Lett **509**(1): 119-25.
- Van Coppenolle, F., F. Vanden Abeele, C. Slomianny, M. Flourakis, J. Hesketh, E. Dewayilly and N. Prevarskaya (2004). "Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores." J Cell Sci **117**(Pt 18): 4135-42.
- Vanden Abeele, F., G. Bidaux, D. Gordienko, B. Beck, Y. V. Panchin, A. V. Baranova, D. V. Ivanov, R. Skryma and N. Prevarskaya (2006). "Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1." J Cell Biol **174**(4): 535-46.
- Vannier, B., M. Peyton, G. Boulay, D. Brown, N. Qin, M. Jiang, X. Zhu and L. Birnbaumer (1999). "Mouse trp2, the homologue of the human trpc2 pseudogene, encodes mTrp2, a store depletion-activated capacitative Ca²⁺ entry channel." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2060-4.
- Vanoverberghe, K., P. Mariot, F. Vanden Abeele, P. Delcourt, J. B. Parys and N. Prevarskaya (2003). "Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells." Cell Calcium **34**(1): 75-85.
- Varga-Szabo, D., K. S. Authi, A. Braun, M. Bender, A. Ambily, S. R. Hassock, T. Gudermann, A. Dietrich and B. Nieswandt (2008). "Store-operated Ca(2+) entry in platelets occurs independently of transient receptor potential (TRP) C1." Pflugers Arch **457**(2): 377-87.
- Vassilev, L. T., C. Tovar, S. Chen, D. Knezevic, X. Zhao, H. Sun, D. C. Heimbrook and L. Chen (2006). "Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(28): 10660-5.
- Vassort, G. and J. Fauconnier (2008). "[Transient receptor potential, TRP channels: a new family of channels broadly expressed]." Med Sci (Paris) **24**(2): 163-8.
- Vazquez, G., B. J. Wedel, O. Aziz, M. Trebak and J. W. Putney, Jr. (2004). "The mammalian TRPC cation channels." Biochim Biophys Acta **1742**(1-3): 21-36.
- Venkatachalam, K. and C. Montell (2007). "TRP channels." Annu Rev Biochem **76**: 387-417.
- Verbert, L., B. Lee, S. L. Kocks, Z. Assefa, J. B. Parys, L. Missiaen, G. Callewaert, R. A. Fissore, H. De Smedt and G. Bultynck (2008). "Caspase-3-truncated type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor enhances intracellular Ca²⁺ leak and disturbs Ca²⁺ signalling." Biol Cell **100**(1): 39-49.

- Vig, M., A. Beck, J. M. Billingsley, A. Lis, S. Parvez, C. Peinelt, D. L. Koomoa, J. Soboloff, D. L. Gill, A. Fleig, J. P. Kinet and R. Penner (2006). "CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel." *Curr Biol* **16**(20): 2073-9.
- Wang, J. H. and D. M. Waisman (1979). "Calmodulin and its role in the second-messenger system." *Curr Top Cell Regul* **15**: 47-107.
- Wang, X., J. L. Pluznick, P. Wei, B. J. Padanilam and S. C. Sansom (2004). "TRPC4 forms store-operated Ca²⁺ channels in mouse mesangial cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **287**(2): C357-64.
- Wang, Y., X. Deng, Y. Zhou, E. Hendron, S. Mancarella, M. F. Ritchie, X. D. Tang, Y. Baba, T. Kurosaki, Y. Mori, J. Soboloff and D. L. Gill (2009). "STIM protein coupling in the activation of Orai channels." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Weitzel, J. N., J. Patel, D. M. Smith, A. Goodman, H. Safaii and H. G. Ball (1994). "Molecular genetic changes associated with ovarian cancer." *Gynecol Oncol* **55**(2): 245-52.
- Wes, P. D., J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten and C. Montell (1995). "TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9652-6.
- Whitaker, M. and R. Patel (1990). "Calcium and cell cycle control." *Development* **108**(4): 525-42.
- Williams, R. T., S. S. Manji, N. J. Parker, M. S. Hancock, L. Van Stekelenburg, J. P. Eid, P. V. Senior, J. S. Kazenwadel, T. Shandala, R. Saint, P. J. Smith and M. A. Dziadek (2001). "Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: coding for a novel class of transmembrane proteins." *Biochem J* **357**(Pt 3): 673-85.
- Winn, M. P., P. J. Conlon, K. L. Lynn, M. K. Farrington, T. Creazzo, A. F. Hawkins, N. Daskalakis, S. Y. Kwan, S. Ebersviller, J. L. Burchette, M. A. Pericak-Vance, D. N. Howell, J. M. Vance and P. B. Rosenberg (2005). "A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis." *Science* **308**(5729): 1801-4.
- Winqvist, R., G. M. Hampton, A. Mannermaa, G. Blanco, M. Alavaikko, H. Kiviniemi, P. J. Taskinen, G. A. Evans, F. A. Wright, I. Newsham and et al. (1995). "Loss of heterozygosity for chromosome 11 in primary human breast tumors is associated with poor survival after metastasis." *Cancer Res* **55**(12): 2660-4.
- Xu, S. Z., G. Boulay, R. Flemming and D. J. Beech (2006). "E3-targeted anti-TRPC5 antibody inhibits store-operated calcium entry in freshly isolated pial arterioles." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**(6): H2653-9.
- Xu, X. Z., F. Chien, A. Butler, L. Salkoff and C. Montell (2000). "TRPgamma, a drosophila TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL." *Neuron* **26**(3): 647-57.
- Yang, H., S. Mergler, X. Sun, Z. Wang, L. Lu, J. A. Bonanno, U. Pleyer and P. S. Reinach (2005). "TRPC4 knockdown suppresses epidermal growth factor-induced store-operated channel activation and growth in human corneal epithelial cells." *J Biol Chem* **280**(37): 32230-7.
- Yang, H., X. Sun, Z. Wang, G. Ning, F. Zhang, J. Kong, L. Lu and P. S. Reinach (2003). "EGF stimulates growth by enhancing capacitative calcium entry in corneal epithelial cells." *J Membr Biol* **194**(1): 47-58.
- Yang, J., J. A. Williams, D. I. Yule and C. D. Logsdon (1995). "Mutation of carboxyl-terminal threonine residues in human m3 muscarinic acetylcholine receptor modulates the extent of sequestration and desensitization." *Mol Pharmacol* **48**(3): 477-85.
- Yang, S., J. J. Zhang and X. Y. Huang (2009). "Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis." *Cancer Cell* **15**(2): 124-34.
- Yang, S. L., Q. Cao, K. C. Zhou, Y. J. Feng and Y. Z. Wang (2009). "Transient receptor potential channel C3 contributes to the progression of human ovarian cancer." *Oncogene*.

- Yeromin, A. V., S. L. Zhang, W. Jiang, Y. Yu, O. Safrina and M. D. Cahalan (2006). "Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai." Nature **443**(7108): 226-9.
- Yu, Y., I. Fantozzi, C. V. Remillard, J. W. Landsberg, N. Kunichika, O. Platoshyn, D. D. Tigno, P. A. Thistlethwaite, L. J. Rubin and J. X. Yuan (2004). "Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(38): 13861-6.
- Yu, Y., M. Sweeney, S. Zhang, O. Platoshyn, J. Landsberg, A. Rothman and J. X. Yuan (2003). "PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression." Am J Physiol Cell Physiol **284**(2): C316-30.
- Yuan, J. P., W. Zeng, G. N. Huang, P. F. Worley and S. Muallem (2007). "STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels." Nat Cell Biol **9**(6): 636-45.
- Zagranichnaya, T. K., X. Wu and M. L. Villereal (2005). "Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells." J Biol Chem **280**(33): 29559-69.
- Zeng, W., J. P. Yuan, M. S. Kim, Y. J. Choi, G. N. Huang, P. F. Worley and S. Muallem (2008). "STIM1 gates TRPC channels, but not Orai1, by electrostatic interaction." Mol Cell **32**(3): 439-48.
- Zhang, L. and D. Saffen (2001). "Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization." J Biol Chem **276**(16): 13331-9.
- Zhang, S., C. V. Remillard, I. Fantozzi and J. X. Yuan (2004). "ATP-induced mitogenesis is mediated by cyclic AMP response element-binding protein-enhanced TRPC4 expression and activity in human pulmonary artery smooth muscle cells." Am J Physiol Cell Physiol **287**(5): C1192-201.
- Zhang, S. L., A. V. Yeromin, X. H. Zhang, Y. Yu, O. Safrina, A. Penna, J. Roos, K. A. Stauderman and M. D. Cahalan (2006). "Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(24): 9357-62.
- Zhang, S. L., Y. Yu, J. Roos, J. A. Kozak, T. J. Deerinck, M. H. Ellisman, K. A. Stauderman and M. D. Cahalan (2005). "STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane." Nature **437**(7060): 902-5.
- Zhang, Z., J. Tang, S. Tikunova, J. D. Johnson, Z. Chen, N. Qin, A. Dietrich, E. Stefani, L. Birnbaumer and M. X. Zhu (2001). "Activation of Trp3 by inositol 1,4,5-trisphosphate receptors through displacement of inhibitory calmodulin from a common binding domain." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3168-73.
- Zhou, H., H. Iwasaki, T. Nakamura, K. Nakamura, T. Maruyama, S. Hamano, S. Ozaki, A. Mizutani and K. Mikoshiba (2007). "2-Aminoethyl diphenylborinate analogues: selective inhibition for store-operated Ca²⁺ entry." Biochem Biophys Res Commun **352**(2): 277-82.
- Zhu, X. and L. Birnbaumer (1998). "Calcium Channels Formed by Mammalian Trp Homologues." News Physiol Sci **13**: 211-217.
- Zhu, X., P. B. Chu, M. Peyton and L. Birnbaumer (1995). "Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene." FEBS Lett **373**(3): 193-8.
- Zimmermann, A. (2002). "Liver regeneration: the emergence of new pathways." Med Sci Monit **8**(3): RA53-63.
- Zweifach, A. and R. S. Lewis (1993). "Mitogen-regulated Ca²⁺ current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(13): 6295-9.

