

UNIVERSITE PARIS 13 NORD
UFR de SANTÉ, MÉDECINE et BIOLOGIE HUMAINE

ÉCOLE DOCTORALE GALILÉE

N° attribué par la bibliothèque

|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13

Discipline : Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Expression des pompes calcique de type SERCA dans l'épithélium du plexus
choroïde normal et tumoral et au cours de la différenciation précoce des
lymphocytes B**

Présentée et soutenue publiquement par

Lamia AIT GHEZALI

Le 13 janvier 2017

Directeur de thèse : Dr Bela PAPP

MEMBRES DU JURY :

Pr Olivier OUDAR

Pr Marc LE MAIRE

Dr Jean-Philippe ROSA

Dr Michele GOODHARDT

Dr Bela PAPP

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directeur de Thèse

Remerciements

Aux membres du jury

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Merci au Pr **Olivier OUDAR**. Vos cours ont éveillé ma curiosité pour la recherche. C'est pour moi un grand honneur que vous ayez accepté de juger mon travail et de présider ce jury. Veuillez accepter mes sincères remerciements.

Ma reconnaissance s'adresse également au Dr **Jean-Philippe ROSA** et le Pr **Marc LE MAIRE** qui ont bien voulu être rapporteurs de ce manuscrit ainsi qu'au Dr **Michelle GOODHARDT** d'avoir accepté de l'examiner.

Merci, pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit et pour votre présence lors de ma soutenance.

A ma directrice de laboratoire

Je remercie ma directrice de laboratoire le Dr **Nadine VARIN-BLANK** pour m'avoir accueilli dans son unité en master et en thèse. Merci pour tes conseils scientifique, ton soutien et ton aide.

A mon directeur de thèse

Je tiens particulièrement à remercier le Dr **Bela PAPP**. Merci de m'avoir fait confiance et d'avoir dirigé cette thèse. Merci de m'avoir initié à la recherche scientifique, tu m'as encadré depuis le master et tu m'as tout appris dans la recherche. Je ne te remercierai jamais assez pour tes conseils, pour ta disponibilité, pour ta rigueur, nos discussions scientifiques et nos bons moments passés ensemble.

Aux membres de l'unité U978

Je remercie tous les membres de l'unité U978, chercheurs, enseignant-chercheurs, techniciens et étudiants, pour votre aide, vos conseils que vous avez su me prodiguer. Une belle aventure humaine, merci !

A mes batatas

Dans les moments d'extrême désespoir vous avez su me comprendre, me reconforter, me soutenir et m'encourager à aller au bout de cette thèse. Nos fous rires, nos coups de gueule, nos déprimés. Pour tous les bons moments passés ensemble, nos soirées, nos sorties, les restos, les restos et encore les restos. Je ne trouve pas les mots pour exprimer ce que je ressens, alors tout simplement MERCI.

Anouchka, 3 ans d'une belle amitié mais j'ai l'impression de te connaître depuis toujours. Si je devais décrire l'amitié, je parlerai de toi. Ta gentillesse et ton sourire m'ont aidé à

retrouver la joie de vivre durant ces derniers mois difficiles. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites.

Maïssa, tu comprends les gens mieux que quiconque. Tu as toujours su quel comportement adopter en fonction de la situation et tu as toujours su trouver les mots justes pour me reconforter. Tu es la prochaine à passer cette épreuve, sache que tu auras tout mon soutien.

Vanessa, énergique, forte, tu es comme ce petit lapin dans la pub Duracell, qui dure, qui dure... Ton caractère trempé et ta franchise nous ont coûté des petites disputes parfois, mais ton amitié est si sincère et je sais que je peux compter sur toi. Je t'adore ma Vanessa.

Ranisha, ton dynamisme, ta joie de vivre, tu es tout simplement géniale et on s'attache très vite à toi. Toujours de bonne humeur, tu nous inondes d'ondes positives. Je ne pourrais plus me passer de toi tant tu as pris une place importante dans ma vie.

Sidney, certes tu n'es pas une batata mais tu te comportes comme tel. Tu sais répondre présent quand il le faut. Toujours souriant et à déconner, tu sais nous amuser et juste pour ça, merci.

Je remercie toutes les personnes qui ont partagé mon quotidien et que j'apprécie vraiment beaucoup : **Myriam, Stéphanie, Laure, Rym, Anne** ainsi que ceux qui sont déjà partis, **Hajer, Stephane, Hannan et Elodie**, merci pour les bons moments passés ensemble.

A mes amis...

Benjamin, toujours présent depuis le M2, j'ai à chaque fois trouvé du réconfort à parler avec toi. Je n'oublierai pas nos discussions dans le couloir entre deux manips, les bons moments passés ensemble. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, ton soutien et tes encouragements, tu as toujours été là pour moi.

Maude, merci pour ta gentillesse, tes lectures attentionnées de mes écrits et tes précieux conseils.

A mes amis qui ont toujours cru en moi et qui me soutiennent sans réserve : **Ghenima, Lynda, Katia, Nabila et Myma**. Merci d'avoir toujours été là pour moi.

A ma famille...

A ma belle-famille, je ne vous remercierai jamais assez pour m'avoir soutenu, encouragé et aidé à traverser bien des épreuves. Merci pour votre présence et pour tout ce que vous m'apportez au quotidien.

Merci à **mon chéri**, chaque jour tu as cru en moi. Tu m'as soutenue et aidée, tu as fait preuve d'une grande patience. Tu as supporté toutes mes angoisses, et surtout mon mauvais caractère. Sans tes encouragements, sans ton amour, sans toi tout simplement, je n'y serais jamais arrivé. On a dit oui pour le meilleur et pour le pire, alors maintenant place au meilleur !

Adam, mon ange, mon amour. Ton premier cri suivi de ton premier regard ont donné un sens à ma vie. Je m'émerveille quand tu me souris. Te voir grandir, apprendre et jouer... tu me combles de bonheur. Je sais que tu comptes sur moi, et je saurai faire les sacrifices nécessaires à ton épanouissement. Je t'aime mon fils.

A mes sœurs, **Nounou** et **Zahira**, vous êtes mes lumières, mes repères, je serai perdue sans vous. Merci pour vos encouragements, votre soutien, et votre amour. Je sais que je peux toujours compter sur vous, je vous aime tellement mes deux sœurs chéries.

Papa, tant de sacrifice et de peine pour me permettre d'en arriver là. Tu as consacré ta vie à répondre à mes besoins. J'aimerais tellement que tu me laisses à mon tour prendre soin de toi. Je t'aime du fond du cœur.

Ma maman, je ne sais comment te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu as toujours cru en moi et tu m'as soutenue dans n'importe quelles circonstances, dans les bons comme dans les mauvais moments. La vie n'est plus la même depuis que tu es parti, tu occupes toujours mes pensées, et tu ne quitteras jamais mon cœur. Je te dédie cette thèse. J'espère que de là où tu es, tu es fière de moi, je t'aime ma petite maman.

A la mémoire de ma mère

A mon père et mes sœurs

Pour tout ce que je vous dois, pour tout ce que je suis.

Table des matières

Table des Figures	7
Index des Tableaux	8
Liste des abréviations	9
Résumé	12
Abstract	13
INTRODUCTION	14
Chapitre I : Le calcium	15
I. Rôle du calcium	15
II. Les partenaires physiologiques et cibles moléculaires du calcium	16
1. La calmoduline	16
2. Les CaM-Kinases (Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase)	17
3. La calcineurine (Cn).....	17
4. Les protéines kinases C (PKC).....	17
5. Les facteurs de transcription régulés par le calcium	20
5.1. Le facteur de transcription CREB.....	20
5.2. Le facteur de transcription NF-κB.....	21
5.3. Le facteur de transcription NFAT.....	23
5.4. La protéine DREAM.....	23
III. Régulation du calcium	24
1. Lieu de stockage du calcium intracellulaire dans la cellule au repos	24
1.1. Le réticulum endoplasmique	24
1.2. L'appareil de Golgi	26
1.3. Le noyau	26
1.4. La mitochondrie.....	27
2. Homéostasie et signalisation calcique	28
2.1. Augmentation de la concentration de Ca ²⁺ intracellulaire	32
a Libération de Ca ²⁺ des réserves intracellulaires	32
i Les récepteurs à l'IP3.....	32
ii Les récepteurs à la ryanodine	34
b Entrée du calcium du milieu extracellulaire.....	35
i Les canaux calciques de type SOC (Store Operated Channels) :	35
ii STIM et Orai	35
2.2. Diminution de la concentration de Ca ²⁺ intracellulaire.....	38
a Echangeurs Na ⁺ /Ca ²⁺	39
3. Caractéristiques du signal calcique : localisation, cinétique, amplitude.....	39
3.1. Localisation	40
3.2. Cinétique	41
3.3. Amplitude.....	41
Chapitre II : Les Ca²⁺ ATPases	43
I. Les pompes calciques de type SERCA	43
1. Du gène à la protéine.....	44
2. Expression des SERCAs.....	44
2.1. SERCA1	44
2.2. SERCA2	45
2.3. SERCA3	45

3. Structure des SERCAs.....	46
4. Fonctionnement des SERCAs	48
4.1. Le cycle catalytique	48
4.2. Les changements conformationnels des SERCAs au cours du cycle de transport du Ca ²⁺ ...	49
4.3. Différences fonctionnelles entre les différentes isoformes SERCAs	51
5. Régulation de l'activité des SERCAs	53
II. Les pompes calciques de type PMCA	56
III. Les pompes calciques de type SPCA	58
Chapitre III : Régulation de l'expression des SERCAs en physiopathologie	59
I. Invalidation et mutations des gènes SERCA	59
II. Expression des SERCAs dans les cellules différenciées	61
III. L'expression des SERCAs dans les cellules cancéreuses.....	62
IV. SERCA et différenciation cellulaire	64
1. Leucémie aiguë promyélocytaire.....	64
2. Cancer du côlon.....	65
3. Adénocarcinomes bronchiques.....	65
V. Les objectifs	67
RESULTATS	69
Article I : Perte de l'expression de pompe calcique SERCA3 dans le plexus choroïde et ses tumeurs	70
Article II : Expression des enzymes de type SERCA dans les cellules de la leucémie aiguë lymphoblastique B.....	82
DISCUSSION.....	112
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	120
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125

Table des Figures

Figure 1 : Activation des PKCs classiques.....	19
Figure 2 : Activation des facteurs de transcription CREB par le calcium.....	21
Figure 3 : Activation des facteurs de transcription NF- κ B par le calcium.....	22
Figure 4 : Représentation schématique de la signalisation calcique dans une cellule non-excitabile.....	31
Figure 5 : Structure des récepteurs à l'IP3	33
Figure 6 : Représentation schématique de la structure moléculaire de STIM1.....	36
Figure 7 : Représentation schématique de la structure moléculaire d'Orai1.....	37
Figure 8 : Activation et couplage des STIM1 pour activer le canal Orai1.....	38
Figure 9 : Régulation spatio-temporelle de la signalisation calcique.....	40
Figure 10 : Epissage alternatif du gène ATP2A3	44
Figure 11 : Structure tertiaire de SERCA1a	47
Figure 12 : Cycle catalytique des pompes de type SERCA	49
Figure 13 : Les changements conformationnels majeurs de la structure de l'enzyme SERCA au cours du cycle de transport du calcium.....	51
Figure 14 : Site de fixation de la thapsigargine sur SERCA1a	54
Figure 15 : Schéma du modèle topologique des PMCAs.....	57
Figure 16 : Coupe histologique du ganglion	62
Figure 17 : Marquage immunohistologique de SERCA3 sur tissu colique normal et cancéreux.....	63
Figure 18 : Induction de l'expression de SERCA3 au cours de la différenciation de la lignée Calu-3 en culture post-confluente, suivi d'une stimulation par les acides gras à chaîne courte	66

Index des Tableaux

Tableau 1 : Comparaison de l'affinité des SERCAs pour le Ca^{2+}	52
Tableau 2 : Principaux inhibiteurs pharmacologiques des pompes SERCA.....	55

Liste des abréviations

A

ADNc	Acide Désoxyribonucléique
ADP	Adénosine Diphosphate
Ag	Antigène
AGCC	Acide Gras à Chaine Courte
APL	Leucémie promyélocytaire aiguë
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Asp	Acide aspartique
ATP	Adénosine Triphosphate
ATRA	All Trans-Retinoic Acid

B

BCR	B Cell Receptor
------------	-----------------

C

C-terminale	Extrémité carboxyterminale
CaM	Calmoduline
CaM-Ca	Calcium Calmoduline
CaMK	Calmoduline-dependent protein Kinase
CBP	CREB-Binding Protein
CCE	capacitative calcium entry
CD	Cluster of Differentiation
CH	Calponin Homology domain
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
Cn	Calcineurine
CnA	Calcineurine A
CnB	Calcineurine B
CPA	Acide cyclopiazonique
CREB	Cyclic AMP Responsive Element Binding Protein
CSH	Cellule souche hématopïque

D

Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DRE	Downstream Regulatory Element
DREAM	Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator

E

EBF	Early B cell factor
EGF	Epithelial Growth Factor
ERK	Extracellular signal Regulated kinases

F

FGF	Fibroblast Growth Factor
------------	--------------------------

H

HBV	Virus de l'hépatite B
------------	-----------------------

I

ICRAC	Calcium Release-Activated Calcium current
IICR	IP3-Induced Calcium Release
IKK	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IL-2	InterLeukine 7
IP3	Inositol 1,4,5 triPhosphate
IκB	Inhibitory κB

K

K_i	Constante d'inhibition
KO	Knockout

L

LAL-B	Leucémie aigue lymphoblastique B
LAM	Leucémie aigüe myéloïde
LB	Lymphocyte B
LCR	Liquide Céphalo Rachidien

M

MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
-------------	----------------------------------

N

N-terminale	Extrémité aminoterminal
NCA	Nuclear Calcium ATPases
NCX	Sodium calcium exchanger
NF-κB	Nuclear Factor kappa-B
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells

NFATc Nuclear Factor of Activated T cells cytosolique

O

OMS Organisation Mondiale de la Santé

P

PC Plexus Choroïde

PDGF Platelet-Derived-Growth-Factor

PIP2 Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKC Protéine Kinase C

PLC PhosphoLipase C

PMA phorbol 12-myristate 13-acetate

PMCA Plasma Membrane Calcium ATPase

Pre-B Précurseur des cellules B

Pro-B Progéniteur des cellules B

PSA Prostate Specific Antigen

R

RAG Recombination activating gene

RCPG Récepteur Couplé aux Protéines G

RE Réticulum Endoplasmique

RyR Ryanodine receptor

S

SERCA serca sarco endoplasmic reticulum calcium ATPase

SLC Surrogate Light Chain

SOC store operated calcium channel

SOCE Entrée capacitive du calcium

SPCA Secretory Pathway Ca⁺ ATPase

STIM1 Stromal interaction molecule 1

T

tBHQ 2,5-di-(*tert*-butyl)-1,4-benzohydroquinone

TdT Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TG Thapsigargin

Th T helper

Résumé

L'ion calcium est un second messager qui intervient dans de nombreux processus cellulaires dont la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Ainsi, l'homéostasie calcique constitue un point central de régulation de la signalisation cellulaire. En effet, la concentration calcique cytosolique de calcium subit des oscillations, qui suivant leur amplitude ou leur fréquence, vont être capables d'activer spécifiquement certains facteurs de transcription. La régulation de ces oscillations implique entre autres les ATPases de type SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) qui accumulent le calcium dans le réticulum endoplasmique. L'objectif de ce travail de thèse a été l'étude des SERCAs au cours de la différenciation lymphocytaire B et dans l'épithélium du plexus choroïde ; ceci, afin de mieux comprendre le profil d'expression de ces pompes et les mécanismes de régulation impliqués.

Au cours de la différenciation de lignées de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) nous avons observé que l'expression de l'isoforme SERCA2 restait stable ou augmentait légèrement alors que celle de l'isoforme SERCA3 était toujours fortement induite, pouvant atteindre des niveaux observés dans les cellules lymphoïdes matures. Nous avons également observé que l'inhibition de l'activité des SERCAs altère la différenciation cellulaire qui est dépendante de la voie des PKC. Ces données indiquent que SERCA3 pourrait être utilisée comme marqueur de la différenciation lymphocytaire B. Une régulation de l'expression des SERCAs a également été mise en évidence au cours de la différenciation de l'épithélium du plexus choroïde normal ou tumoral. SERCA3 est fortement exprimée dans l'épithélium normal, mais on retrouve une baisse ou une perte de son expression dans l'épithélium tumoral, cette baisse est corrélée à la perte de la différenciation selon le grade des tumeurs. L'étude de l'expression des SERCAs dans les cellules primaires du plexus choroïde traité par des agents cyto-différenciateurs (acides gras à chaîne courte), montre que la différenciation est associée à une surexpression de SERCA3. SERCA3 peut donc également être un marqueur de la différenciation de l'épithélium du plexus choroïde.

L'ensemble de ce travail a montré que la différenciation cellulaire est associée à la régulation de protéines impliquées dans la régulation de l'homéostasie calcique : les SERCAs. On peut ainsi proposer SERCA3 comme un nouveau marqueur phénotypique utile pour l'analyse de la différenciation du plexus choroïde normale et néoplasique, ainsi que pour celle de la différenciation lymphoïde pré-B leucémique.

Abstract

Cellular calcium is involved in a multitude of biological processes including the control of cell proliferation, differentiation and programmed cell death, and constitutes therefore a key element in cell signaling. Calcium levels vary in a dynamic manner depending on the state of activation of the cell, and can display oscillations the amplitude and frequency of which can convey specific signals to various transcription factors. Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases (SERCA enzymes) accumulate calcium from the cytosol into the endoplasmic reticulum (ER). By modulating the spatiotemporal characteristics of calcium signals and oscillations, SERCA pumps constitute an important and unique point of control of calcium-dependent cell activation. In this work we investigated SERCA expression during early B lymphoid differentiation and in normal, tumoral and hyperplastic choroid plexus epithelial cells.

We have shown that SERCA3 expression is markedly increased during the pharmacologically induced differentiation of immature B acute lymphoblastic leukemia cells, whereas the expression of the simultaneously expressed SERCA2 isoform is not modified significantly. SERCA3 expression during this differentiation process can reach levels observed in mature B lymphoid cells, and is dependent on the activation of protein kinase C. Moreover, the direct pharmacological inhibition of SERCA-dependent calcium transport interferes with the differentiation process.

Our investigations on the choroid plexus show, that whereas SERCA3 is highly expressed in normal choroid plexus epithelium, expression is strongly decreased in benign choroid plexus tumors and is lost in carcinoma, whereas expression is retained in hyperplasia. In addition, treatment of primary normal choroid plexus epithelial cells by short chain fatty acid-type cell differentiation-inducing agents *in vitro* leads to the induction of SERCA3 expression.

Our observations when taken together indicate that ER calcium homeostasis is remodeled during the differentiation of immature B lymphoid cells and in the choroid plexus due to the induction of SERCA3 expression. We show that a cross-talk exists between SERCA function and the control of differentiation in B cells, that SERCA3 constitutes a new phenotypic marker for the study of early B cell differentiation, and that the lack of SERCA3 expression may be useful for the identification of choroid plexus tumors.

INTRODUCTION

Chapitre I : Le calcium

I. Rôle du calcium

L'ion calcium (Ca^{2+}) est un facteur clé de la signalisation intracellulaire, et un second messenger universel qui grâce à une régulation très fine intervient dans plusieurs voies de signalisation, contrôlant ainsi de nombreuses fonctions physiologiques. Des variations de concentration en calcium cytosolique peuvent réguler l'évolution du phénotype cellulaire (différenciation, prolifération, apoptose ...) [1] [2] [3], l'activité cellulaire (contraction, sécrétion, libération de neurotransmetteurs...) ou encore l'excitabilité cellulaire [4].

En plus de son rôle de second messenger, le calcium a un rôle très important dans la maturation et le repliement correct des protéines cellulaires synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE), puisque de nombreuses protéines chaperonnes, tels que la calréticuline ou la calnexine requièrent des ions calcium pour leur fonctionnement [5].

L'homéostasie calcique est le résultat d'un équilibre entre influx et efflux du calcium à travers la membrane plasmique, mais aussi entre le stockage et la libération des ions calciques des réserves intracellulaires, permettant ainsi le maintien de la compartimentation cellulaire du calcium et donc la possibilité de créer un signal calcique. Ce signal calcique porte un message interprété par des effecteurs intracellulaires. Pour que ceci soit possible, la concentration de calcium libre intracellulaire doit être finement régulée. Celle-ci est le résultat de mécanismes qui augmentent, diminuent ou tamponnent cette concentration. Chaque type cellulaire exprime son propre répertoire moléculaire de composants de la signalisation, permettant d'avoir des systèmes de signalisation spécifiques, qui peuvent être combinés avec des profils spatiotemporels très différents donnant des réponses cellulaires diverses [6]. L'action concertée de mécanismes d'augmentation et de diminution de la concentration calcique cytosolique mène souvent à l'apparition dans la cellule d'oscillation de la concentration cytosolique. La durée, la fréquence et l'amplitude de ces oscillations peuvent moduler l'activité de protéines cibles de manière sélective.

Un organe jouant un rôle important dans l'homéostasie calcique est le réticulum endoplasmique, principal compartiment stockage dynamique de calcium. Le calcium stocké dans le RE peut être libéré dans le cytoplasme par des canaux ioniques tels que le récepteur

à l'IP3 (R-IP3) ou le récepteur à la ryanodine (RyR) suite à leur stimulation par des ligands spécifiques. Le stockage quant à lui, est assuré par pompage du calcium cytoplasmique libre vers la lumière du RE. Ce transport actif est assuré par les ATPases calciques du réticulum sarco/endoplasmique, les SERCAs (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPases). Ces pompes jouent donc un rôle majeur dans la régulation des niveaux de calcium cytosolique libre et intra-réticulaire. Ces pompes font l'objet du projet que j'ai développé au cours de ma thèse.

II. Les partenaires physiologiques et cibles moléculaires du calcium

1. La calmoduline

La calmoduline (CaM) est une petite protéine ubiquitaire des cellules eucaryotes. Senseur des ions calcium [7], elle a un rôle crucial dans de nombreuses voies de signalisation, et représente l'un des principaux médiateurs des effets moléculaires du Ca^{2+} . Elle est capable de fixer 4 ions calcium grâce à ses motifs de type « EF-hand » (motif structural contenant des acides aminés dans une structure hélice-boucle-hélice qui fixe réversiblement le calcium). Elle possède deux domaines : N-terminal et C-terminal, reliés par un linker central flexible [8]. Le lobe C-terminal présente une affinité plus élevée pour le Ca^{2+} que le lobe N-terminal. La fixation d'ions Ca^{2+} sur chacun des deux domaines induit une transition conformationnelle de l'état fermé (inactif) vers un état ouvert (actif), qui permet l'interaction du complexe CaM-Ca^{2+} avec différentes protéines cibles et leur activation. Par exemple, les pompes calciques de la membrane plasmique (les PMCAs) sont activées par le complexe CaM-Ca^{2+} , et ceci constitue un mécanisme important de la régulation de leur activité au cours d'un épisode d'activation calcique cellulaire. Alors que la calmoduline libre est inactive, le complexe CaM-Ca^{2+} interagit avec une région auto-inhibitrice de la protéine cible. La fixation de ce dernier sur cette région lève l'inhibition et mène ainsi à l'activation de la protéine cible. La formation du complexe CaM-Ca^{2+} est réversible, il se forme lors de l'augmentation de concentration calcique cytosolique, et sa dissociation au cours de la diminution de la concentration calcique cytosolique mène à son inactivation.

2. Les CaM-Kinases (Ca²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase)

Les CaM-Kinases (CaMK) sont une famille de sérine thréonine kinases activées par le complexe CaM-Ca²⁺, avec un domaine C-terminal régulateur qui inclut le domaine de liaison au complexe CaM-Ca²⁺. L'une de leurs cibles la mieux caractérisée est le facteur de transcription CREB (cyclic AMP Responsive Element Binding Protein) [9]. Elles sont aussi impliquées dans la translocation de NF-κB vers le noyau. Il existe également plusieurs phénomènes de couplage entre la cascade des CaMK et d'autres voies de signalisation. Notamment, certains récepteurs aux facteurs Wnt, au lieu d'utiliser la voie bien connue de la β-caténine, utilisent une voie impliquant le calcium probablement par l'intermédiaire d'une protéine G qui, en activant la phospholipase C, déclenche la production d'IP3 et une libération de calcium à partir des réserves internes, suffisante pour activer la CaMKII [10].

3. La calcineurine (Cn)

La calcineurine est une sérine-thréonine phosphatase exprimée dans un grand nombre de tissus. Dans les cellules au repos, la calcineurine est sous forme d'un hétérodimère inactif. La CnA constitue la sous-unité catalytique et la CnB une sous-unité régulatrice. Son activation dépend d'une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca²⁺ et de la présence de la calmoduline (CaM). L'élévation de la concentration de Ca²⁺ cytosolique active la CaM, et la fixation du complexe CaM-Ca²⁺ sur la calcineurine permet la libération de sa sous-unité catalytique CnA de la sous-unité inhibitrice CnB et ainsi une libération du site actif de l'enzyme. La calcineurine possède une plus forte affinité pour le Ca²⁺ que les kinases et par conséquent, elle peut être activée préférentiellement par des augmentations relativement faibles de la concentration de Ca²⁺ cytosolique.

Les substrats de cette phosphatase comprennent entre autres les facteurs de transcription NFAT (nuclear factor of activated T-cells). L'activation de NFAT par la calcineurine permet sa translocation dans le noyau [11] et l'activation de la transcription de gènes cibles.

4. Les protéines kinases C (PKC)

Les protéines kinases C constituent une famille de sérine-thréonine kinases. Elles sont exprimées de manière ubiquitaire et regroupent dans leur famille 11 isoenzymes calcium-dépendantes. Les PKCs possèdent un domaine catalytique C-terminal hautement conservé dans les différentes isoformes, et un domaine régulateur N-terminal responsable de l'activation de la protéine qui diffère selon les isoformes. On distingue ainsi trois groupes de

PKC selon leur capacité de réponse au Ca^{2+} et au diacylglycérol (DAG) : 1) les PKC conventionnelles constituées de quatre isoformes (α , βI , βII et γ), régulées par le Ca^{2+} et le DAG, 2) les PKC nouvelles, activées seulement par le DAG ? et 3) les atypiques qui ne sont régulées ni par le DAG ni par le Ca^{2+} [12].

L'activation de la PKC nécessite 1) sa translocation du cytoplasme vers la membrane plasmique où le DAG peut se lier à la protéine. La liaison au DAG permet de stabiliser la conformation active de la protéine ; 2) la liaison des ions calcium à la PKC, entraînant un changement de conformation de la protéine. Ces deux modifications permettent l'obtention d'une enzyme ayant une compétence catalytique et une stabilité de la conformation active.

L'activité des PKC peut être modulée pharmacologiquement. Ainsi, leur activation peut être induite par les esters de phorbol comme le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). Cette catégorie d'activateurs se fixe avec une forte affinité sur le site de liaison au DAG. D'autre part les PKCs peuvent être inhibées par des inhibiteurs pharmacologiques qui agissent au niveau de leur domaine régulateur ou catalytique, tels que le *Gö 6983* et le *GF 109203X* utilisés dans ce travail, qui sont des inhibiteurs sélectifs des PKCs de type conventionnelles et nouvelles.

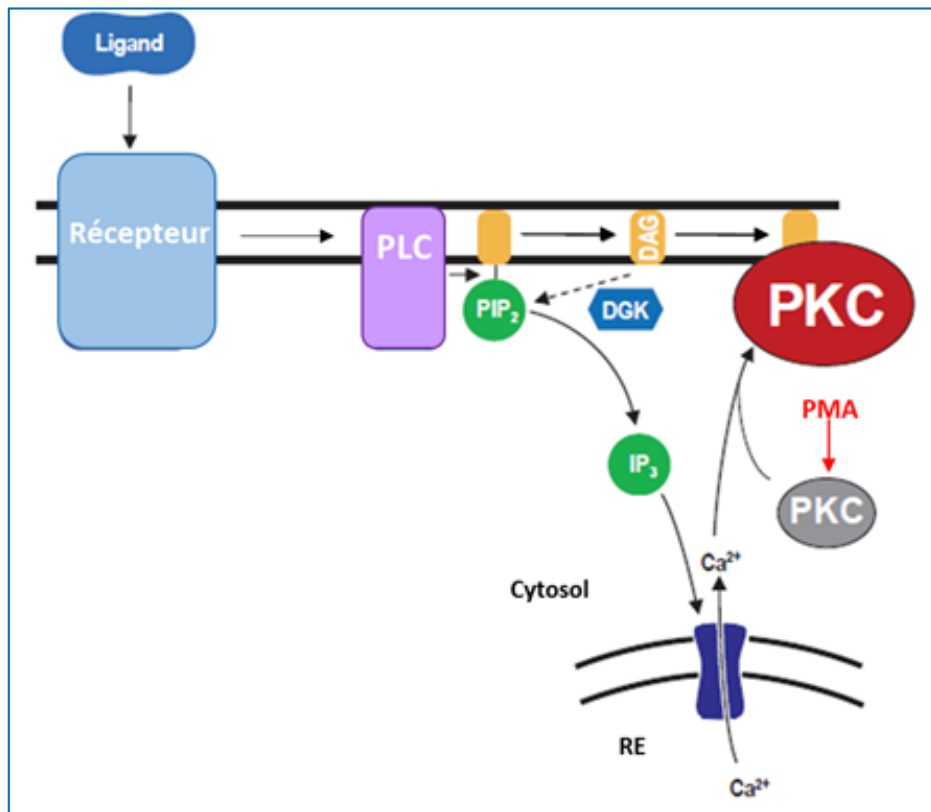


Figure 1 : Activation des PKCs classiques

L'interaction d'un ligand avec un récepteur couplé à une protéine G (RCPG) active la phospholipase C (PLC), qui clive à son tour le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃). L'IP₃ interagit avec les canaux calciques du réticulum endoplasmique (RE), pour libérer du Ca²⁺ des réserves. L'élévation du Ca²⁺ intracellulaire facilite ensuite la translocation de la PKC à la membrane cellulaire, où elle est activée par le DAG.

5. Les facteurs de transcription régulés par le calcium

Comme nous l'avons déjà vu, le calcium peut réguler l'expression génique agissant à différents niveaux sur la transcription des gènes. La modification de la concentration calcique cytosolique intervient dans l'activation et la translocation de certains facteurs de transcription. Le Ca^{2+} peut agir sur la localisation des facteurs de transcription par l'intermédiaire de la calcineurine, tel que NFAT, ou moduler leur expression transcriptionnelle comme c'est le cas de CREB. Les oscillations calciques activent différentes cascades moléculaires aboutissant à l'activation de nombreuses kinases ou aussi phosphatases. Celles-ci vont à leur tour induire l'activation de certains facteurs de transcription. Le calcium peut également agir directement sur les facteurs de transcription, comme le facteur DREAM : Downstream Regulatory Element Antagonist Modulator. Le Ca^{2+} peut agir sur la localisation des facteurs de transcription par l'intermédiaire de la calcineurine, par exemple NFAT ou moduler leur activité transcriptionnelle comme c'est le cas de CREB. Il a été montré que les variations de la concentration calcique nucléoplasmique donnent des signaux calciques dans le noyau, qui régulent directement l'expression de gènes cibles [13]. Parmi les facteurs de transcription régulés par le calcium on peut citer :

5.1. Le facteur de transcription CREB

Les protéines CREB sont présentes dans le noyau. Leur activation est dépendante de la concentration calcique nucléaire. Elles sont phosphorylées par des kinases, elles-mêmes activées par le Ca^{2+} telles que les CaMK. L'augmentation de Ca^{2+} nucléaire aboutit à l'activation de CaMKIV. Cette protéine va ensuite phosphoryler CREB, qui va interagir avec le co-facteur CBP (CRE Binding Protein) pour former un pont moléculaire entre CREB et le reste de la machinerie transcriptionnelle. Ensuite, CBP est lui-même activé par la CaMKIV; ce complexe activé permet alors la transcription de gènes-cibles. La signature calcique activant cette voie définit le niveau de la transcription de ces gènes cibles comme par exemple le gène c-fos qui appartient à la classe de gènes de la réponse précoce [14]. Cette voie est impliquée dans divers processus biologiques tels que le développement, la croissance, la formation de la mémoire, la différenciation, la neuroprotection.

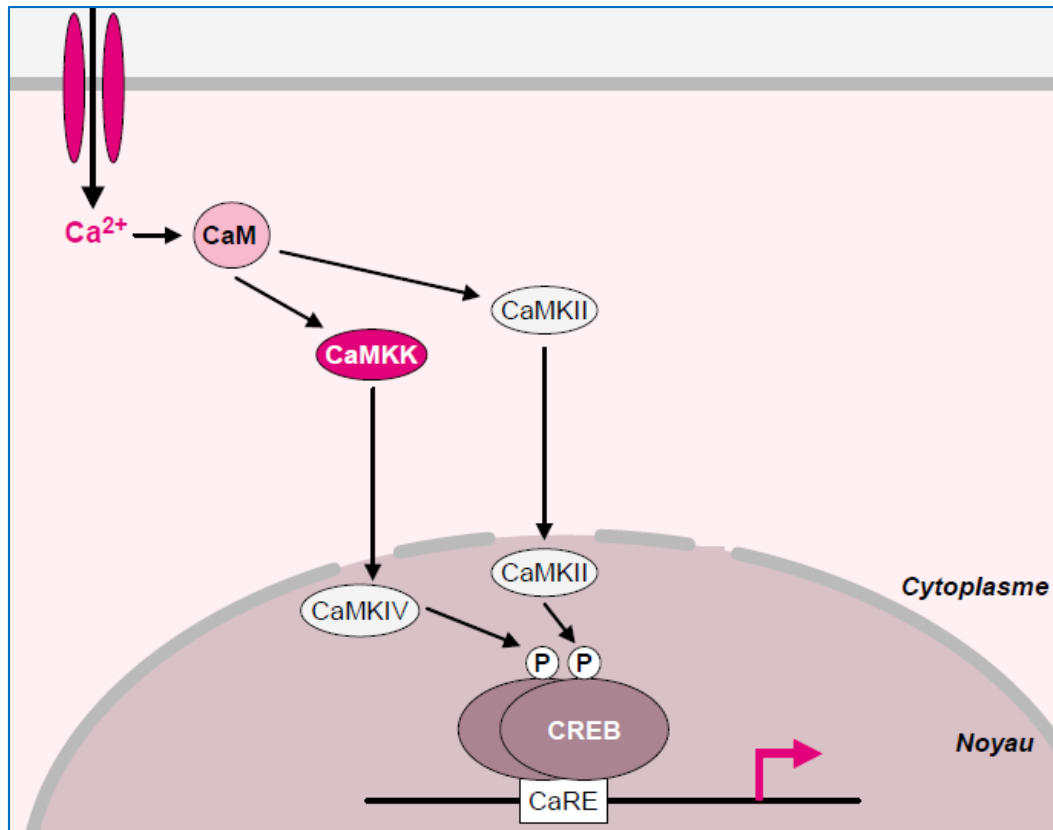


Figure 2 : Activation des facteurs de transcription CREB par le calcium

L'augmentation de la concentration de calcium cytosolique permet la formation du complexe calcium/calmoduline. Ce complexe peut activer la phosphorylation de CREB par les CaMK II et IV et induire la transcription des gènes cibles (Coulon, 2001).

5.2. Le facteur de transcription NF- κ B

Cette famille de facteurs de transcription est présente sous sa forme inactive, séquestré par des inhibiteurs, dans le cytosol des cellules non stimulées. Leur activation passe à la fois par des voies mettant en jeu la calmoduline, la calcineurine et des kinases dont la CaMKII et la PKC. L'activité de NF- κ B est régulée par une famille d'inhibiteurs spécifiques I κ B (inhibitory κ B) présents dans le cytosol. Lors d'une stimulation cellulaire accompagnée d'une augmentation de la concentration calcique cytosolique, I κ B est dégradé après phosphorylation par les IKK (IKB Kinases) ou par les PKC. Ceci permet la translocation de NF- κ B dans le noyau et la transcription de ses gènes cibles impliqués dans divers processus biologiques. Le facteur de transcription NF- κ B régule une batterie de gènes qui sont essentiels pour l'immunité innée et adaptative, la prolifération cellulaire et la survie,

l'inflammation, et le développement des tumeurs. Cette voie de signalisation est également associée à l'immortalisation des lymphocytes B primaires humains infectés par le virus d'Epstein-Barr [15]. Les facteurs NF- κ B ont un rôle important dans le développement des cellules B, où ils régulent la transcription des gènes kappa et interviennent également dans la production, le maintien et la fonction des lymphocytes B [16].

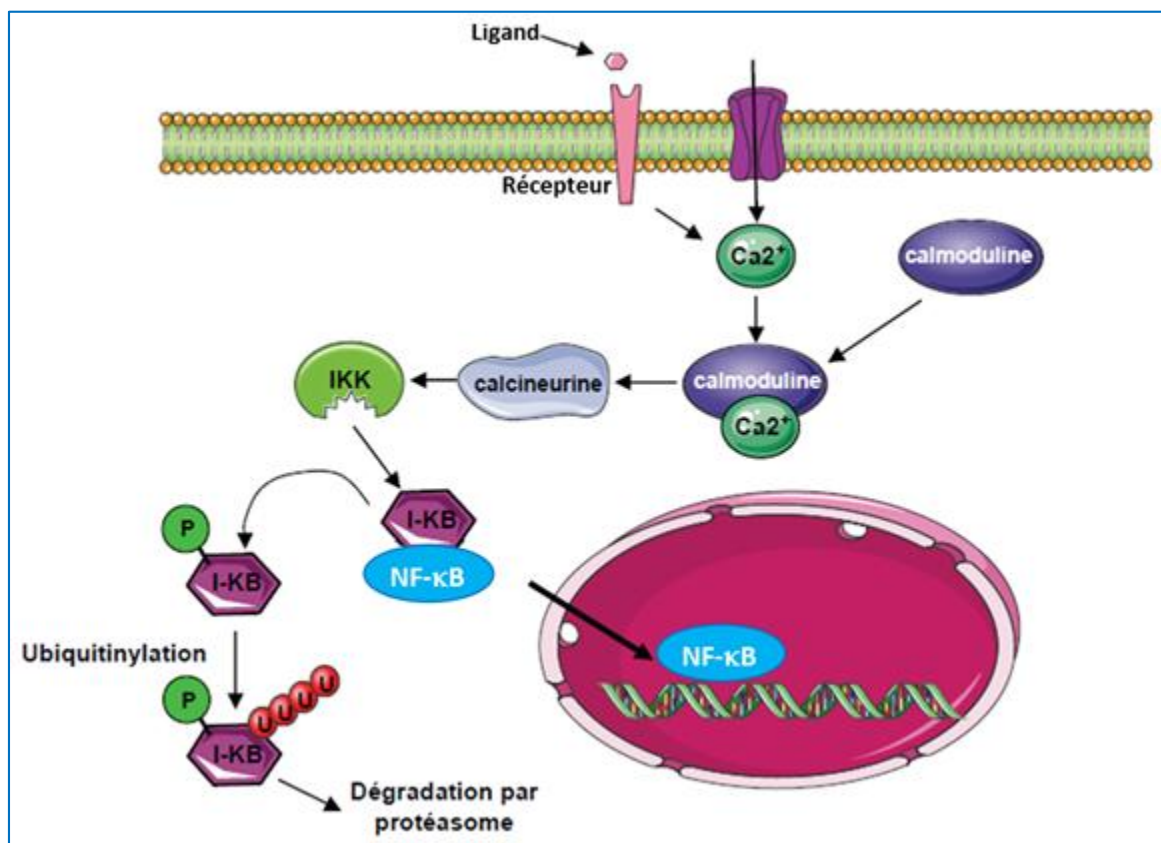


Figure 3 : Activation des facteurs de transcription NF- κ B par le calcium

L'augmentation du calcium cytosolique permet la formation du complexe calcium/calmoduline, qui va activer la calcineurine. Cette phosphatase va stimuler les kinases IKKs qui phosphorylent I- κ B, permettant sa dégradation et la libération de NF- κ B. NF- κ B va migrer dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles.

5.3. Le facteur de transcription NFAT

Les facteurs de transcription NFAT sont capables de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau. Dans le cytosol ils sont présents sous leurs formes inactives (formes phosphorylées). L'augmentation de la concentration calcique cytosolique va activer la calcineurine, entraînant la déphosphorylation de NFATc (NFAT cytosolique), sa translocation dans le noyau et la transcription des gènes cibles. Ce facteur de transcription est activé par des oscillations calciques de faible amplitude et de longue durée. La famille NFAT été principalement liée au développement, différenciation et l'activation des lymphocytes T. D'autres études ont montré que ces protéines interviennent dans de nombreux types cellulaires, ou elles sont impliquées dans la croissance tumorale, l'angiogenèse et l'invasivité, par exemple, dans les lymphocyte B, NFAT contrôle la transcription et l'expression de la cycline E et la prolifération cellulaire *in vivo* [17]. Au niveau cardiaque, la voie de signalisation calcineurine/NFAT joue un rôle essentiel dès la phase de développement embryonnaire du cœur [18].

5.4. La protéine DREAM

DREAM est une protéine capable de fixer le Ca^{2+} , grâce à ses quatre sites de fixation EF-hand. Son mode d'action représente un mécanisme direct de régulation d'expression génique par le calcium [19]. C'est un répresseur de la transcription de ses gènes cibles. Selon le type de cellule et les conditions physiologiques, DREAM présente plusieurs localisations subcellulaires, dans le noyau, le cytosol ou la membrane cellulaire. Dans le noyau l'augmentation de la concentration calcique et la fixation des ions calcium aux motifs EF-hand de DREAM, permet sa transition conformationnelle d'un état tétramérique à un état dimérique et sa dissociation du DRE [20] [21]. Ceci permet la transcription de certains gènes cibles dont le gène c-fos [22]. DREAM apparaît comme un facteur contrôlant la transcription et pour lequel l'augmentation de la concentration calcique dans le noyau s'avère un élément essentiel.

La mutation au sein de l'un de ses motifs EF-hand liant le calcium, donne des protéines mutantes qui conservent leur capacité à lier DRE et de réprimer l'expression des gènes cibles, cependant la répression ne peut plus être levée par le calcium.

De nombreux mécanismes d'activation cellulaire impliquent donc des protéines intracellulaires (CaM kinases, calcineurine, les PKC, NFAT, NF- κ B etc.) dont

l'activité/fonction est dépendante/réglée (directement ou indirectement) par la concentration de calcium cytosolique. Celle-ci est réglée par les pompes et canaux calciques. Le rôle de ces protéines dans ces processus homéostatiques et de signalisation est détaillé dans la partie suivante.

III. Régulation du calcium

1. Lieu de stockage du calcium intracellulaire dans la cellule au repos

La concentration de calcium dans une cellule au repos n'est pas homogène. Alors que le milieu extracellulaire contient du calcium de l'ordre de 1-2 mM, la concentration calcique du cytosol est de 20-50 nM. Ce gradient de concentration, de plus de 10 000 fois, est généré et activement maintenu par des pompes calciques de type PMCA et des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui éjectent les ions calcium depuis le cytosol vers le milieu extracellulaire. D'autre part le calcium est activement accumulé depuis le cytosol vers les organelles de stockage intracellulaire de cet ion. Ces organelles de stockage, aussi appelés « réserves calciques intracellulaires » sont principalement le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les mitochondries. Ces organelles contiennent une concentration calcique plus élevée que le cytosol, possèdent des pompes et des canaux calciques propres, et interviennent de manière spécifique dans l'homéostasie et la signalisation calciques des divers types cellulaires [23].

1.1. Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique est un réseau membranaire intra-cytoplasmique retrouvé dans tous les types cellulaires. La quantité, la morphologie et la fonction du RE peut varier selon le type cellulaire et son état de différenciation. C'est une organelle qui assure de nombreuses fonctions (synthèse de lipides, maturation de protéines nouvellement synthétisées, signalisation, interactions ER-Golgi et ER-mitochondrie, constitution de la membrane nucléaire, etc.). Le RE est une organelle structurellement et fonctionnellement dynamique, capable d'adaptation, et d'émettre et de recevoir des signaux dans la cellule.

Le RE peut stocker le Ca^{2+} en quantités très importantes, la concentration calcique de la lumière du RE avoisine 100 μM dans une cellule au repos. Il est le compartiment le plus impliqué dans l'homéostasie calcique, et joue un rôle majeur dans la régulation de la

concentration en Ca^{2+} libre dans le cytosol. Il existe deux fonctions distinctes : le Ca^{2+} stocké dans le RE est nécessaire aux modifications post-traductionnelles des protéines ayant lieu dans la lumière de l'organelle, et la libération de calcium stocké dans le RE vers le cytosol engendre les signaux calciques cytosoliques impliqués dans l'induction de l'activation cellulaire. L'échange du Ca^{2+} entre le RE et le cytosol s'effectue grâce à différents canaux et pompes calciques présents dans la membrane du réticulum. Les récepteurs à l'IP3 ainsi que les récepteurs à la ryanodine permettent, suite à leur activation, la libération de calcium contenu dans le RE vers le cytosol. Ensuite, des pompes calciques de type SERCA accumulent des ions calcium dans le RE et restaurent les réserves calciques intra-réticulaires. Le transport actif de calcium vers la lumière du RE par les enzymes de type SERCA est le seul système qui génère le gradient de calcium entre le cytosol et le RE, et de ce fait l'activité SERCA constitue un mécanisme unique du contrôle de l'homéostasie et de l'activation calciques de la cellule. Le Ca^{2+} contenu dans le RE n'est pas exclusivement sous forme libre puisqu'il peut être lié aux protéines réticulaires telles que la calréticuline ou la calnexine [5] [24]. Bien que l'affinité de ces protéines pour le Ca^{2+} est faible, de l'ordre de 1 mM, leur présence en quantités importantes dans le RE permet une grande capacité de stockage réversible d'ions calcium.

Le RE participe activement à la synthèse de lipides cellulaires et assure des fonctions essentielles dans la production de protéines sécrétées (maturation conformationnelle, glycosylation). Ces fonctions sont assurées par des protéines chaperonnes (calréticuline, calséquestrine, calnexine, etc) dont l'activité est dépendante du calcium. L'ensemble de ces fonctions requiert un système d'homéostasie complexe, dont la perturbation déclenche un phénomène appelé stress du RE, ayant pour but le rétablissement de l'équilibre entre la synthèse protéique et celle de la machinerie de la maturation des protéines nouvellement synthétisées, allant même jusqu'à déclencher la mort cellulaire par apoptose [25]. En effet, la déplétion en calcium du RE, par exemple par l'inhibition des pompes SERCAs, induit le stress de l'organelle ; ce qui met en évidence l'implication du calcium dans le stress du RE et montre que l'accumulation de Ca^{2+} par les SERCAs dans le RE est connectée à plusieurs phénomènes et systèmes de régulation cellulaire.

Le RE permet de réguler la concentration calcique cytoplasmique car c'est le principal compartiment contenant du Ca^{2+} mobilisable au cours de l'activation cellulaire, faisant partie de la dynamique du signal calcique.

1.2. L'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi a pour fonction, la régulation du transport de vésiculaire et la maturation des protéines provenant du RE. La maturation consiste en une série de transformations biochimiques. Il constitue une réserve de Ca^{2+} , représentant approximativement 5% des réserves intracellulaires [26]. Sa capacité de stockage peut être augmentée par des protéines spécifiques telles que calnuc/nucleobindin [27] et des membres de la famille CREC (protéines qui fixent le Ca^{2+}) [28]. L'appareil de Golgi possède ses propres pompes calciques qui sont les SPCAs (Secretory Pathway Calcium ATPase), mais les SERCAs et le récepteur à l'IP3 sont également exprimés dans la membrane golgienne [29]. Le Ca^{2+} stocké dans l'appareil de Golgi peut être partiellement libéré en réponse à des agonistes produisant de l'IP3, mais la quantité de calcium mobilisée reste minoritaire par rapport à celle mobilisée du RE [30] [31]. Les changements dans la concentration du calcium soit dans la lumière de Golgi, soit dans le cytosol adjacent, régule la fonction de Golgi.

1.3. Le noyau

L'enveloppe nucléaire se situe dans le prolongement direct du réticulum endoplasmique, elle est composée de deux membranes, une interne et une externe, ainsi que de pores qui permettent la communication entre le cytosol et le noyau. Cette enveloppe s'avère importante puisqu'elle délimite un espace particulièrement sensible aux variations de la concentration calcique. En effet, dans le nucléoplasme, siège de la transcription génique, la concentration calcique doit être finement régulée puisque de nombreux facteurs de régulation de la transcription se trouvent être des effecteurs directement ou indirectement contrôlés par les variations du calcium.

C'est un compartiment considéré comme une réserve de Ca^{2+} dont la concentration régule la perméabilité des pores nucléaires. Bien que le RE et l'enveloppe nucléaire ne forment qu'un seul compartiment, cela n'exclut pas l'existence de gradients de Ca^{2+} contenus dans leurs réserves.

Il est maintenant admis que le noyau possède son propre signal calcique, qui peut provenir de l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} initiée dans le cytosol proche du noyau, par une simple diffusion passive à travers les pores nucléaires. De plus, la membrane du noyau possède ses propres transporteurs calciques, les NCA (Nuclear Calcium ATPases) [32].

La signalisation calcique de la membrane nucléaire a peu de conséquences sur la concentration calcique cytosolique. Les transporteurs de Ca^{2+} du noyau permettent surtout d'isoler l'espace nucléaire du cytoplasme et ainsi réguler la concentration du Ca^{2+} nucléaire, qui intervient dans de nombreuses fonctions régulatrices de l'expression des gènes, de l'importation de protéine et de l'apoptose [32].

Des études montrent que le calcium nucléaire peut varier de façon indépendante par rapport au cytoplasme [33]. En effet, le noyau semble pouvoir produire de l'IP3 de façon indépendante du cytoplasme, et l'IP3 ainsi produit semble pouvoir activer des R-IP3 situés sur la membrane nucléaire permettant l'entrée de calcium stocké dans le réticulum endoplasmique dans le noyau [34], [35].

1.4. La mitochondrie

Les mitochondries sont de petits organites intracellulaires dont le rôle essentiel est de produire de l'ATP, forme d'énergie nécessaire à la cellule. Elles peuvent accumuler le Ca^{2+} dans la matrice jusqu'à atteindre des concentrations de 0,5 mM mais uniquement lorsque la concentration cytosolique augmente au-dessus de 0,5 μM . L'entrée du calcium cytosolique dans la mitochondrie se fait par un unipore de faible affinité présent dans la membrane interne. Elles peuvent aussi restituer dans le cytosol le calcium capté grâce à des échangeurs $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ [36][37]. Malgré l'importance des mitochondries dans le maintien de l'homéostasie calcique, elles ne fonctionnent pas en tant que réserves de calcium mobilisées lors de l'activation cellulaire.

Il a été montré qu'une partie des mitochondries se trouve en contact étroite avec l'ER ou la membrane plasmique. Ce contact est maintenu par un ensemble de protéines spécifiques qui ancrent les mitochondries à ces membranes. Suite à ce contact spatial étroit une partie du calcium relargué du RE sous l'effet d'IP3, ainsi qu'une partie du calcium entrant dans la cellule à travers la membrane plasmique peut être absorbé par ces mitochondries. Le captage de calcium par les mitochondries peut exercer un effet atténuateur sur l'activation calcique cellulaire, et en même temps stimuler la synthèse mitochondriale d'ATP [38] [39].

Le rôle de calcium dans la biologie mitochondriale peut ainsi être divisé schématiquement en deux parties. Dans un contexte physiologique, il s'agit de l'harmonisation de l'activité mitochondriale avec l'état d'activation calcique de la cellule, et dans un contexte pathologique, la surcharge des mitochondries en calcium constitue un mécanisme

d'induction d'apoptose [40]. En effet, le relargage du calcium du RE peut activer les calpaïnes, qui peuvent à leur tour activer par protéolyse les caspases, médiateurs de l'apoptose. L'influx de calcium dans la mitochondrie altère la perméabilité de la membrane mitochondriale conduisant au relargage du cytochrome c dans le cytosol, ce qui va aboutir à l'expression de protéines pro-apoptotiques et déclencher l'apoptose [41].

2. Homéostasie et signalisation calcique

L'homéostasie calcique cellulaire est un équilibre dynamique entre pompage actif et relargage passif de calcium entre divers compartiments, dans lesquels cet ion est stocké à des concentrations différentes. Elle est donc directement responsable du maintien de la compartimentation du Ca^{2+} dans la cellule et ainsi du maintien de la possibilité pour cet ion de jouer son rôle de second messenger.

La concentration de Ca^{2+} dans une cellule n'est pas homogène. Dans une cellule au repos, la concentration de calcium libre cytosolique est de l'ordre de 10-50 nM alors que dans les organelles de stockage, elle est de l'ordre de 0,1-1 mM. Les gradients de concentration de Ca^{2+} entre le cytosol, les organelles de stockage et le milieu extracellulaire (concentration de Ca^{2+} autour de 1 mM) sont générés par des mécanismes de transport actif faisant intervenir des pompes calciques. Ainsi, le gradient de concentration de cet ion est en faveur d'une entrée de calcium provenant du milieu extracellulaire ou d'une libération des stocks calciques intracellulaires vers le cytosol.

Dans un premier temps, nous discuterons les différents mécanismes conduisant à l'augmentation du calcium cytosolique, puis nous décrirons les mécanismes de pompage du Ca^{2+} , du cytoplasme vers le milieu extracellulaire ou encore vers la lumière du RE.

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux pompes calciques du RE, aux principales voies impliquées dans l'homéostasie et à la signalisation calcique dans les cellules dites non-excitables (non-neuronales ou musculaires).

La signalisation calcique dans une cellule non excitable

La signalisation calcique se déroule en quatre étapes successives :

- La signalisation est déclenchée par divers stimuli qui génèrent des signaux à l'origine de la mobilisation du Ca^{2+} .
- Ces signaux activent des mécanismes provoquant une augmentation de la quantité de calcium cytosolique (relargage du calcium du RE et influx capacitif).
- Le Ca^{2+} active des effecteurs cytoplasmiques qui sont sensibles à la modification de sa concentration.
- Enfin, les mécanismes de réduction, composés de pompes et d'échangeurs, diminuent la concentration du Ca^{2+} dans le cytosol et restaurent l'état de repos [6].

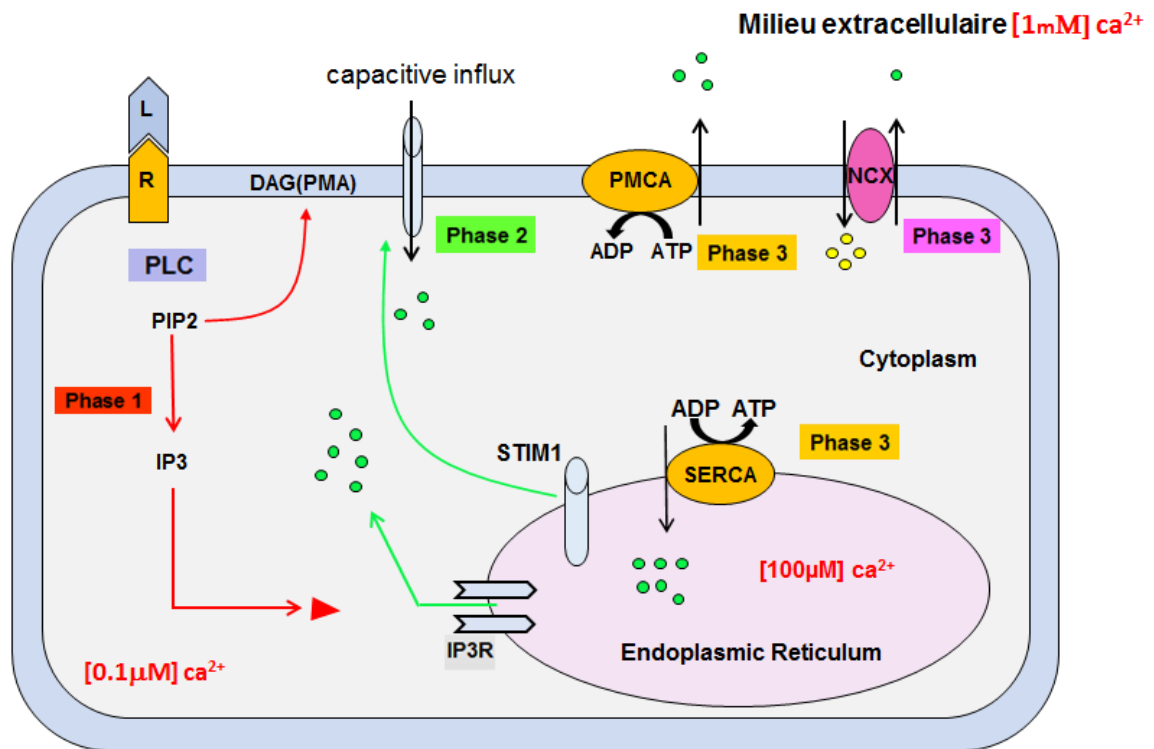
Dans de nombreux types cellulaires, la liaison de ligands à leurs récepteurs membranaires (tels que la thrombine, les facteurs de croissance de type PDGF, EGF, ou FGF, mais aussi l'acétyl-choline, différentes hormones peptidiques et chimiokines, ou les récepteurs immuns TCR et BCR) induit l'activation de différentes isoformes de la PLC associées aux signalosomes autour de la partie cytoplasmique des récepteurs. Cette activation génère, en hydrolysant le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), deux seconds messagers : le diacyl-glycérol (DAG) et l'IP₃. Le DAG reste associé à la membrane plasmique du fait de son caractère hydrophobe, et permet l'activation de plusieurs effecteurs. Il va contribuer au recrutement et à l'activation de diverses isoformes de la protéine kinase C (PKC). L'IP₃, une molécule hydrophile, diffusera dans le cytosol pour atteindre son récepteur (R-IP₃) situé dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE).

La fixation de l'IP₃ sur son récepteur déclenche l'ouverture du canal R-IP₃ et la libération de Ca^{2+} stocké dans la lumière du RE. La déplétion des réserves du RE déclenche l'activation de STIM1 (stromal interaction molecule 1) localisé au niveau de la membrane du RE permettant son interaction avec Orai1 localisé dans la membrane plasmique, menant à l'influx de calcium depuis le milieu extracellulaire vers le cytosol à travers Orai-1 (influx capacitif).

L'augmentation de la concentration cytosolique de calcium qui s'en suit entraîne l'activation d'enzymes dépendantes du calcium (protéine kinase C, calpaïnes, etc.) ou activées par le complexe calcium-calmoduline (CaM-kinases, calcinéurine, etc.), menant à l'activation cellulaire. Cependant, comme on l'a vu avant, une augmentation prolongée de la $[\text{Ca}^{2+}]$

cytosolique peut activer les voies apoptotiques dépendantes du calcium [42], et être délétère pour la cellule en activant les différentes cibles moléculaires du calcium de façon permanente. Pour un retour à l'état de repos de la cellule, d'une part le Ca^{2+} est expulsé vers le milieu extracellulaire à travers la membrane plasmique par les PMCA et les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. D'autre part, il est séquestré dans le RE par les enzymes de type SERCA, permettant ainsi à la cellule d'être activée par un nouveau signal extracellulaire ultérieur.

Dans un premier temps, je vais détailler les systèmes augmentant la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol, initiant ainsi la signalisation calcique, depuis la libération du Ca^{2+} du RE par les R-IP3, suivi d'influx depuis la membrane plasmique par les SOCs (Store-Operated Channels).



- Calcium

Figure 4 : Représentation schématique de la signalisation calcique dans une cellule non-excitable

La fixation d'un ligand sur son récepteur membranaire active des voies de signalisation qui favorisent la phosphorylation et l'activation de la PLC. La PLC activée génère de l'IP3 qui diffuse dans le cytosol, se lie à son récepteur à la membrane du RE et induit une libération du calcium (phase1). La déplétion des réserves calciques dans le RE conduit à l'activation du SOCE et à l'influx calcique (phase2). La diminution de la concentration calcique cytosolique se fait par un pompage actif du calcium vers la lumière du RE, et vers le milieu extracellulaire par les pompes calcique PMCA et les échangeurs NCX (phase3).

2.1. Augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire

a Libération de Ca^{2+} des réserves intracellulaires

Il existe deux types de canaux associés aux pools de Ca^{2+} présent dans le RE : les R-IP3 et les RyR (Ryanodine Receptor). Ils sont responsables de l'augmentation initiale de la concentration calcique cytosolique après stimulation de la cellule.

i Les récepteurs à l'IP3

Le mécanisme majeur de libération du Ca^{2+} décrit dans toutes les cellules non-excitables, est celui induit par la fixation de l'IP3 sur son récepteur (R-IP3) dont la structure est présentée dans la Figure 4. Ces récepteurs sont des canaux calciques situés dans la membrane du réticulum endoplasmique. Ils sont ubiquitaires mais la proportion et les taux d'expression des différentes isoformes peuvent varier selon le tissu. Ils sont localisés majoritairement au niveau du RE, mais une activité IICR (IP3-Induced Calcium Release) a été mise en évidence au niveau de l'enveloppe nucléaire et de l'appareil de Golgi [30], [43].

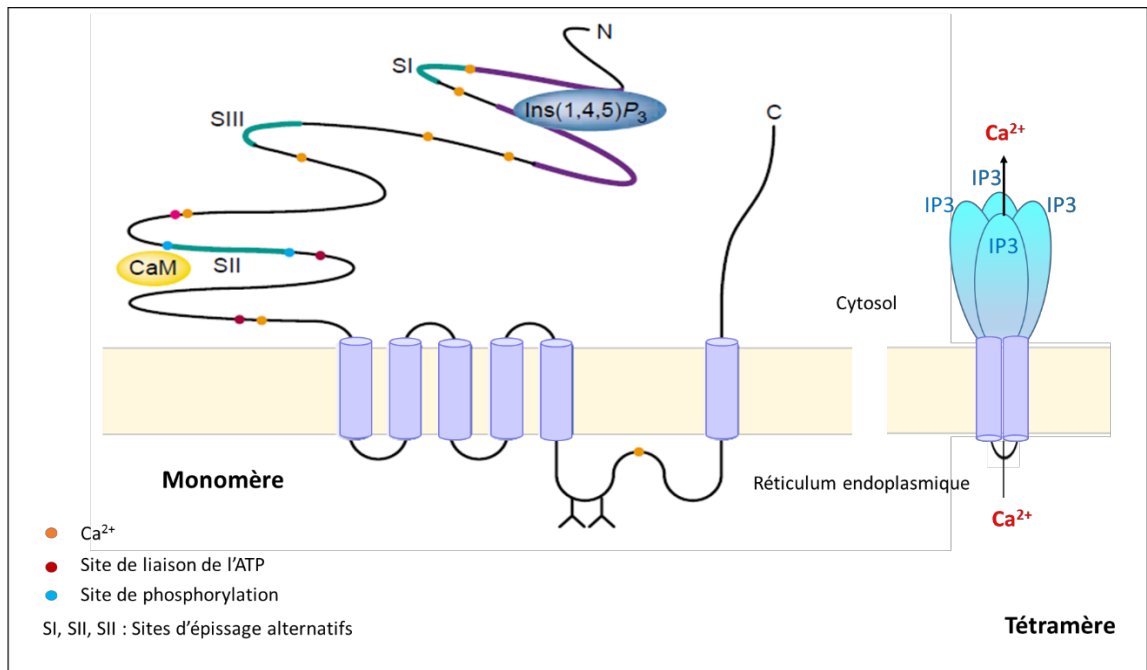


Figure 5 : Structure des récepteurs à l'IP3

Les récepteurs à l'IP3 sont des monomères de 250-300 kDa, qui présentent un grand domaine cytosolique N-terminal comprenant de nombreux sites de liaison pour différents ligands. Le domaine C-terminal est composé de six régions transmembranaires. Tétramère : domaines C-terminaux assemblés pour former le canal calcique. (D'après Thrower et al., 2001) [44].

Il existe trois types de récepteurs à l'IP3 (type I, II et III) codés par 3 gènes distincts chez les mammifères. Les transcrits de ces gènes peuvent subir un épissage alternatif donnant naissance à plusieurs isoformes [45]. Ces récepteurs se distinguent notamment par leurs affinités différentes vis-à-vis de l'IP3, affinité qui peut être modulée par la concentration de calcium cytosolique et lumenale [46].

La structure du R-IP3 (en particulier le récepteur de type 1 qui a été le mieux caractérisé) est généralement composée de trois domaines différents : le domaine N-terminal cytoplasmique correspondant au domaine de fixation à l'IP3, 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 composé de quatre sous-unités de R-IP3 qui forment un pore canal central [44], où chacune des sous-unités porte un site de fixation à l'IP3. Le domaine régulateur possède de nombreux sites de fixation à des petites molécules et protéines régulatrices comme l'ATP, l'ADP-ribose

cyclique, le Ca^{2+} , la calmoduline et des sites de phosphorylation par différentes kinases telles que les PKC, et la calcium calmoduline kinase II (CaMKII).

Les R-IP3 sont impliqués dans différents processus biologiques tels que la sécrétion d'hormones, la fertilisation, la contraction musculaire, l'expression de gènes ou encore la prolifération cellulaire et l'apoptose. Ceci par le biais de leur implication dans l'augmentation de la concentration calcique, l'activation de différentes protéines cibles du calcium, et grâce à leurs niveaux d'expression différents dans divers types cellulaires [47].

ii Les récepteurs à la ryanodine

Les RyRs sont des récepteurs canaux essentiels pour la contraction du muscle squelettique. Ils sont formés de quatre sous unités possédant des régions modulatrices pour l'activation du canal par le Ca^{2+} , l'ATP ou la caféine, par phosphorylation mais également par des inhibiteurs tels que la ryanodine. Il existe trois types de RyR, codés par trois gènes différents (RyR1, RyR2 et RyR3). Ces récepteurs sont exprimés dans de nombreux tissus avec toutefois une spécificité tissulaire.

Les RYRs présentent de fortes similitudes avec les RIP3s sans être activables par l'IP3. L'ouverture de ces canaux peut être déclenchée par plusieurs signaux. Dans le muscle squelettique, une interaction physique est nécessaire entre RyR1 et le DHPR (dihydropirimidine receptor). Au contraire, dans le muscle cardiaque, seule la proximité spatiale des deux canaux est nécessaire. En effet, le relargage de Ca^{2+} par le RyR2 est initié par un influx de calcium extracellulaire entrant par le DHPR, mécanisme appelé CICR (Calcium Induced Calcium Release) [48]. Dans les cellules de type non-musculaire (pancréas exocrine, épithélium prostatique, cellules neuronales) le mécanisme fait intervenir le second messenger cADPR (ADP-ribose cyclique). Similairement aux RIP3, l'ouverture du pore du canal est contrôlée dans la cellule simultanément par plusieurs mécanismes, ce qui permet une régulation complexe fine, et dynamique, en fonction du type cellulaire et de son état d'activation [49], [50].

Les sites de fixation de ses ligands : le calcium, l'ATP et la caféine ont été identifiés dans le domaine C-terminal. Le Ca^{2+} ou l'ATP seul induit un changement conformationnel dans la partie cytoplasmique du récepteur mais n'aboutit à l'ouverture du canal, en revanche en présence des trois ligands (calcium, ATP et caféine), les auteurs ont obtenu des structures à haute résolution de l'état fermé et ouvert du récepteur dans le même échantillon [51].

b **Entrée du calcium du milieu extracellulaire**

L'entrée de calcium issu du milieu extracellulaire dans les cellules non excitables se fait essentiellement par l'intermédiaire des canaux calciques de type SOC :

i **Les canaux calciques de type SOC (Store Operated Channels) :**

Les canaux SOCs (SOC channels: store operated calcium channels) regroupent l'ensemble des canaux calciques qui sont activés suite à la déplétion des stocks calciques réticulaires. Cette activation déclenche un influx de cet ion à travers la membrane plasmique vers le cytosol. Ce phénomène ubiquitaire, connu depuis longtemps, peut être induit par l'IP3 ou les inhibiteurs des enzymes de type SERCA (la thapsigargine (TG), le 2,5-di-(*tert*-butyl)-1,4-benzohydroquinone (tBHQ), l'acide cyclopiazonique (CPA) ou un ionophore calcique, l'ionomycine, qui vident les réserves de Ca^{2+}), est appelé « influx capacitatif ». Cette entrée est également appelée : entrée capacitive de Ca^{2+} (SOCE). Le courant calcique qui en résulte est nommé I_{CRAC} (calcium release-activated calcium current). Ces canaux situés au niveau de la membrane plasmique ne sont pas sensibles au voltage, et sont présents sur la plupart des cellules, excitables et non-excitables [52]. Les études cliniques ont montré que des mutations au niveau de ces canaux sont responsables de faiblesse musculaires, d'un déficit immunitaire sévère et de maladies de la peau [53], [54].

ii **STIM et Orai**

Les molécules impliquées dans l'influx capacitatif de calcium n'ont été découverts que récemment, et deux familles ont été identifiées ; les protéines STIM et les protéines Orai.

La famille STIM comprend deux isoformes chez les mammifères STIM1 et STIM2 [55]. Ce sont des protéines transmembranaires réticulaires avec une grande partie cytosolique qui interagit avec les canaux de types SOC. La structure moléculaire de ces protéines comprend différents domaines, le domaine N-terminal contenant deux motifs EF-hand (motif de liaison au calcium), situé dans la lumière du RE pouvant servir de senseurs de calcium. Le domaine C-terminal est cytosolique, contient un site de fixation à la calmoduline. STIM1 et STIM2 présentent 61% d'homologie, mais STIM2 à la différence de STIM1, ne possède pas de régions riches en résidus glutamate et sérines-thréonine. La protéine STIM1 est essentielle pour l'activation des canaux Orai, elle détecte la baisse de la concentration calcique réticulaire et fonctionnent comme senseur du Ca^{2+} au niveau de la lumière du RE [56], [57].

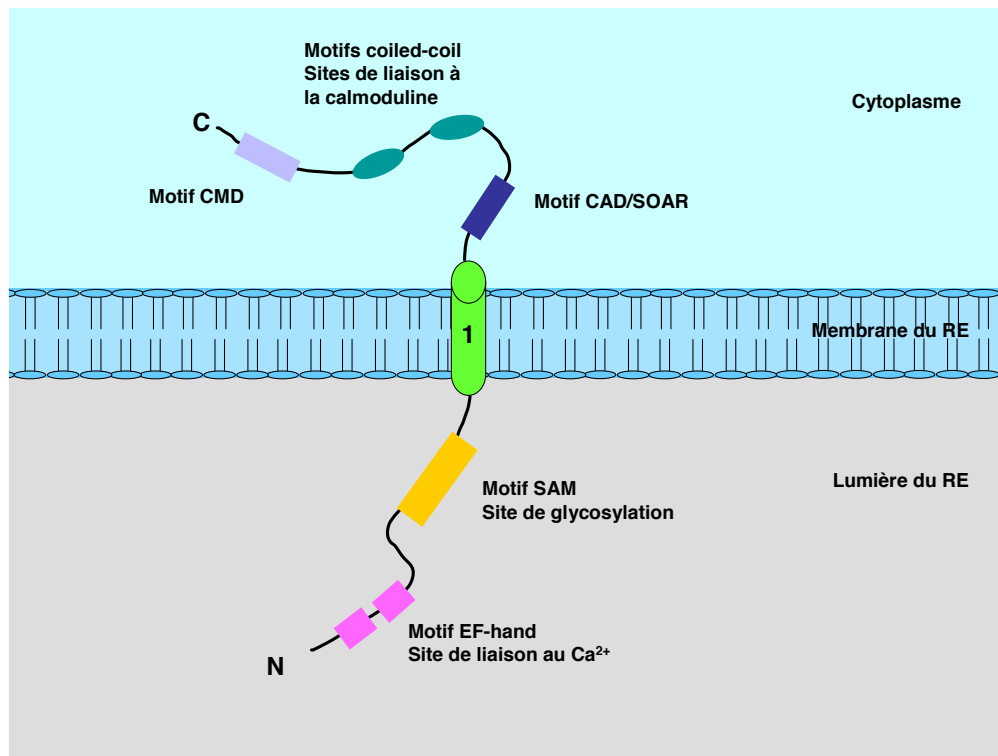


Figure 6 : Représentation schématique de la structure moléculaire de STIM1

La protéine STIM1 contient un domaine EF-hand en N-terminal (motif de liaison au calcium) et un domaine SAM « Sterile-alpha motif », un domaine transmembranaire avec une hélice. Un domaine présentant 2 motifs "coiled-coil" contenant un site de liaison à la calmoduline en C-terminal ; un domaine CMD (CRAC Modulatory Domain) impliqué dans l'inactivation rapide et calcium-dépendant de l'Orai1, et un domaine CAD/SOAR (CRAC Activation Domain/Stim1 Orai Activating Region) : c'est le domaine d'interaction avec la partie C-terminale de la protéine Orai1.

Une deuxième famille de protéines est mise en évidence, la famille Orai localisée à la membrane plasmique qui est constituée de 3 isoformes (Orai1, Orai2 et Orai3). Les trois protéines possèdent quatre domaines transmembranaires, leurs extrémités amino et carboxy-terminales sont tournées vers le cytoplasme. Elles forment un pore ionique à travers lequel entre, depuis le milieu extracellulaire, le Ca^{2+} après transmission du signal par la protéine STIM1. Il a été montré que la surexpression de Orai2 et Orai3 avec STIM1 induisait un influx SOCE, mais avec une amplitude plus faible que celui induit par la surexpression d'Orai1 et de STIM1.

Une interaction entre STIM1 et Orai a été mise en évidence. Au repos STIM1 est localisé au niveau du RE. Après la déplétion des réserves en Ca^{2+} , il y a dimérisation et oligomérisation des molécules de STIM1. Ces derniers migrent ensuite vers les jonctions de contact entre le

RE et la membrane plasmique où les protéines Orai sont recrutées. L'interaction entre STIM1 et Orai1 permet l'ouverture d'Orai1 au niveau de ces jonctions et un influx de Ca^{2+} vers le cytosol [56].

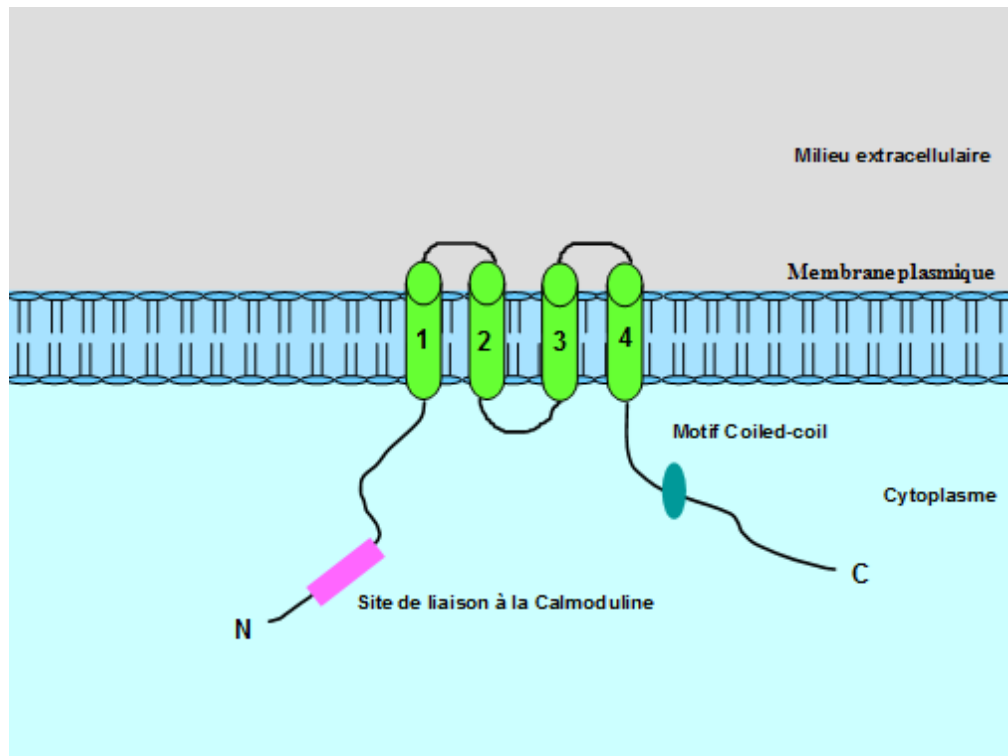


Figure 7 : Représentation schématique de la structure moléculaire d'Orai1

La structure moléculaire de la protéine Orai1 comprend différents domaines. Domaine de liaison à la calmoduline en N-terminal, et un domaine contenant une région riche en sérine-proline (présent uniquement chez Orai1). Domaine transmembranaire avec quatre hélices. Domaine « coiled-coil » en C-terminal.

Les protéines STIM1 et Orai1 sont impliquées dans différents cancers. Plusieurs équipes ont suggéré que la voie SOCE est souvent dérégulée dans divers cancers, et qu'elle est impliquée dans la migration, l'invasion, la formation de métastases et la croissance des cellules tumorales. La surexpression de STIM1 favorise la progression du cancer colorectal et la motilité cellulaire [58]. Dans le cancer du sein, STIM1 et Orai1 interviennent dans la migration des cellules tumorales mammaires, et l'inhibition de STIM1 ou Orai1 inhibe la migration de ces cellules [59]. Ces observations illustrent l'importance de l'influx capacitif et par conséquent, les mécanismes en amont, qui contrôlent les taux calciques intracellulaires dans la biologie tumorale.

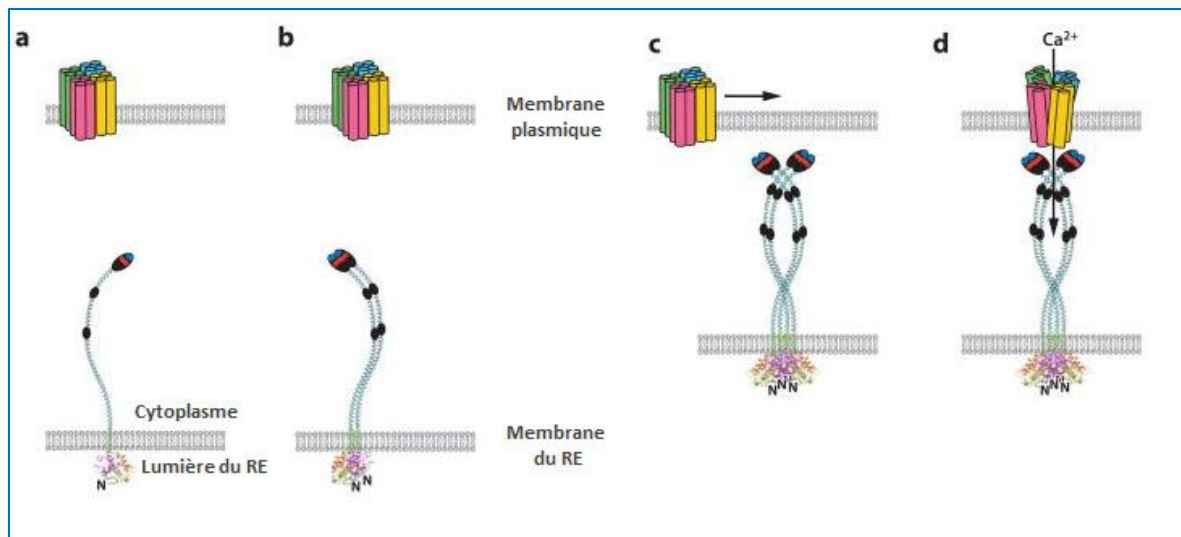


Figure 8 : Activation et couplage des STIM1 pour activer le canal Orai1.

a : Orai1 et STIM1 à l'état de repos. **b** : oligomérisation de STIM1 suite à une déplétion des réserves dans le RE. **c** : après leurs oligomérisation, les protéines STIM1 migrent vers les jonctions de contact entre le RE et la membrane plasmique où Orai1 est alors recruté. **d** : ouverture d'Orai1 et influx du Ca^{2+} (Hogan et al., 2010) [56].

2.2. Diminution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire

Le retour à l'état de repos de la cellule se fait par une diminution de la concentration calcique cytosolique. Cette diminution est possible grâce à la présence de systèmes permettant d'une part la séquestration du Ca^{2+} dans le RE et d'autre part, son expulsion vers le milieu extracellulaire. Ces systèmes sont les pompes (ATPases) calciques et les échangeurs. Les ATPases calciques regroupent les pompes calciques de la membrane plasmique : les PMCAs qui expulsent le Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire et les pompes de la membrane réticulaire, les SERCAs qui pompent le calcium vers la lumière du RE. Une troisième famille de pompes intracellulaires est également connue, localisée dans la membrane de l'appareil de Golgi. Ces enzymes appelées les SPCA assurent l'incorporation du Ca^{2+} dans l'appareil de Golgi. Ces protéines ont plusieurs caractéristiques communes bien que localisées différemment, elles feront l'objet du chapitre II.

a **Echangeurs Na⁺/Ca²⁺**

Les échangeurs Na⁺/Ca²⁺, exprimés au niveau de la membrane plasmique, permettent l'expulsion du Ca²⁺ de la cellule vers le milieu extracellulaire. L'éjection de calcium est alors couplée à un influx d'ions sodium. Les échangeurs Na⁺/Ca²⁺ permettent ainsi la diminution de la concentration de calcium cytosolique, et leur activité dépend du gradient de concentration de sodium généré par l'ATPase Na⁺/K⁺. Les NCX sont codés par 5 gènes (NCX1-5) avec différentes isoformes produites par épissage alternatif [60]. L'isoforme NCX1 a été retrouvée dans de nombreux tissus, et elle est impliquée, en association avec les enzymes de type PMCA, dans l'élimination vers le milieu extracellulaire, de calcium cytosolique après activation calcique de divers types cellulaires « non excitables ». Les NCX et PMCA sont considérés comme les deux mécanismes majeurs d'extrusion de Ca²⁺ à travers la membrane plasmique. L'importance relative de NCX par rapport à PMCA peut varier en fonction du type cellulaire et de son état d'activation [61]. Le transport de Ca²⁺ par les échangeurs peut être estimé sur cellules intactes par fluorimétrie calcique en remplaçant le Na⁺ extracellulaire par le Li⁺ par exemple. Dans une telle configuration l'activité NCX étant inhibée, l'efflux de Ca²⁺ est assuré uniquement par les enzymes de type PMCA.

3. Caractéristiques du signal calcique : localisation, cinétique, amplitude

Même si le calcium est à la base d'un grand nombre de fonctions physiologiques, son action envers chacune d'elle reste spécifique. Ceci est possible car le Ca²⁺ génère des signaux très finement régulés, à la fois dans le temps, dans l'espace et en amplitude [62]. La modulation des caractéristiques spatio-temporelles des oscillations calciques par l'interaction fonctionnelle des pompes et des canaux calciques, permet la mise en place d'une signalisation calcique complexe et ciblée dans la cellule.

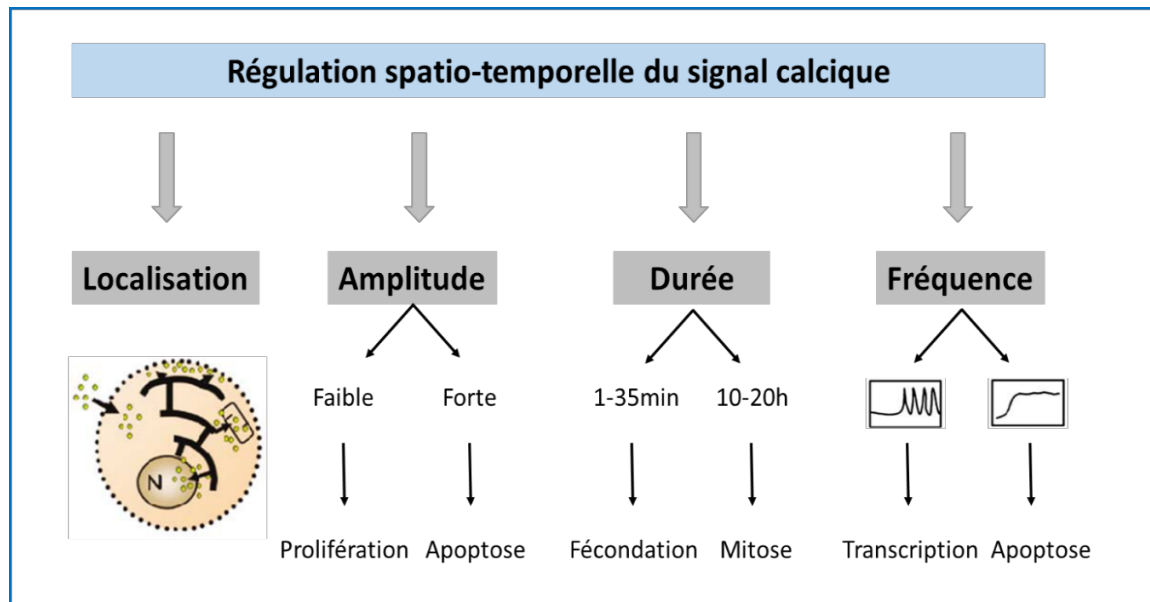


Figure 9 : Régulation spatio-temporelle de la signalisation calcique

Le signal calcique est caractérisé par une «signature calcique» particulière qui reflète sa cinétique (durée et fréquence), la localisation subcellulaire et l'amplitude des signaux calciques (Prevarskaya et al., 2007) [63].

3.1. Localisation

Les signaux calciques peuvent provenir du milieu extracellulaire ou des stocks intracellulaires. Ils peuvent être la conséquence d'une activation de canaux au niveau de la membrane plasmique ou correspondre à une vidange des stocks intracellulaires. La provenance des signaux calciques peut jouer sur leur localisation qui peut être limitée à une petite région sous membranaire ou étendue à la globalité de la cellule. Ceci change l'étendue du signal dans la cellule, définit directement la spécificité des mécanismes induits et déclenche des réponses physiologiques différentes. Grâce à cette localisation du signal, un stimulus arrivant sur un côté de la cellule peut générer une vague calcique qui va balayer l'ensemble de la cellule et ainsi polariser un événement cellulaire. C'est ce qui se passe dans l'ovule au cours de la fécondation définissant ainsi la polarité de l'œuf grâce à la vague calcique générée par cet événement.

Il peut y avoir aussi des signaux calciques limités à une petite région péri-membranaire, c'est le cas lors la sécrétion de neurotransmetteurs dans les neurones [64]. Lorsque les signaux calciques se propagent dans la totalité de l'espace cytosolique, ils régulent de

grandes fonctions telles que la contraction musculaire [65], l'activation immunitaire et la sécrétion. De plus, si les cellules sont jointives, la vague calcique peut se propager dans les cellules voisines, formant ainsi des vagues intercellulaires coordonnant tout un tissu. Ce phénomène a été observé dans les hépatocytes [66], ou les cellules épithéliales alvéolaires pulmonaires [67].

3.2. Cinétique

Les oscillations calciques sont produites par la dynamique des mécanismes d'augmentation (canaux) et diminution (pompes et échangeurs) de la concentration calcique cytosolique. Le temps est un élément important lors de la signalisation calcique, une augmentation prolongée de la concentration calcique cytosolique peut conduire à l'apoptose. La cinétique des signaux calciques peut également agir sur l'expression des gènes *via* l'activation de facteurs de transcription. En effet, deux facteurs de transcription sensibles au calcium NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) et NF- κ B (Nuclear Factor-kappa B), permettent la transcription de différentes interleukines dans les lymphocytes de manière dépendante de la fréquence des signaux calciques. Ainsi, les oscillations calciques longues activent le facteur de transcription NF- κ B tandis qu'une période plus courte active NFAT [68].

Il est également important de noter que la cinétique de l'activation, et de l'inactivation des divers enzymes cibles du complexe calcium-calmoduline, peut varier selon la protéine cible. Ceci peut mener à l'apparition de décalages d'activation et d'inactivation de ces enzymes par rapport à l'évolution de la concentration de calcium cytosolique. Puisque de nombreuses enzymes de l'homéostasie calcique peuvent être régulées ainsi, la signalisation calcique est particulièrement bien adaptée à la génération, la modulation et l'utilisation de signaux calciques oscillatoires.

3.3. Amplitude

Un signal calcique est un ensemble d'évènements calciques élémentaires. La somme de ces événements représente l'amplitude ou l'intensité du signal calcique. Dans la cellule même au repos, il peut y avoir une petite libération localisée de Ca^{2+} induite par de faibles concentrations d'IP3. Bien que ces petits changements au-dessus de la concentration basale de calcium dans la cellule soient difficilement détectables, il a été montré que les cellules peuvent interpréter les petits changements de la concentration de Ca^{2+} en activant

sélectivement la transcription de certains gènes [68]. L'ensemble de ces petits changements peut former un signal d'intensité supérieure au seuil d'activation de certains effecteurs. Chaque protéine sensible au Ca^{2+} possède une affinité spécifique pour cet ion, ce qui détermine à quel seuil elle sera activée pour induire une fonction cellulaire. D'où l'importance de l'intensité du signal calcique, car en fonction de ce seuil certaines protéines effectrices seront activées et pas d'autres. A titre d'exemple, la Ca^{2+} -calmoduline possède deux sites senseurs avec des affinités différentes pour le Ca^{2+} , seul un site ou les deux seront activés en fonction de l'intensité atteinte par le signal, ce qui aura un impact différentiel sur l'activation des protéines cibles [69].

Chapitre II : Les Ca²⁺ ATPases

Ces pompes calciques appartiennent à la famille des ATPases de type P. Au cours de leur cycle catalytique ces pompes forment un intermédiaire phosphorylé. Ce sont des enzymes membranaires qui utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour le transport vectoriel d'ions calcium à travers une membrane lipidique. Ainsi ces ATPases créent des gradients de concentration du Ca²⁺ entre les différents compartiments cellulaires, entre le milieu extracellulaire et le cytosol, ou les organelles de stockage et le cytosol. Ces gradients de Ca²⁺ sont ensuite utilisés dans de nombreux processus biologiques.

Ce sont les études réalisées majoritairement sur SERCA1a qui ont permis de mieux connaître la structure et le fonctionnement de ces pompes. L'abondance de cette protéine dans la membrane du réticulum sarcoplasmique du muscle squelettique a permis de mener des études cristallographiques et structurales des différentes conformations par exemple en présence ou en absence de Ca²⁺, d'ATP ou d'inhibiteurs. Ces études ont permis de caractériser aussi bien son fonctionnement ainsi que les changements conformationnels au cours du cycle de transport du Ca²⁺. Les résultats ont ensuite été extrapolés sur les autres ATPases calciques.

I. Les pompes calciques de type SERCA

Les SERCAs sont des enzymes ubiquitaires, localisées au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique. Elles assurent le transport actif du Ca²⁺ du cytosol vers la lumière du RE. Les SERCAs forment une famille multigénique et présentent également différentes isoformes. Ces isoformes ont une expression tissulaire spécifique, ainsi qu'une variabilité selon le stade de développement [70]. Les isoformes SERCA ont aussi des caractéristiques biochimiques distinctes notamment dans leur affinité pour le Ca²⁺ [71]. Toutes ces particularités propres aux différentes isoformes, permettent une régulation fine de l'homéostasie calcique de la cellule selon son état de différenciation et ses fonctions spécialisées [72].

1. Du gène à la protéine

Les protéines de type SERCA sont codées par trois gènes chez l'homme : SERCA1 (*ATP2A1*), SERCA2 (*ATP2A2*), SERCA3 (*ATP2A3*). Ces trois gènes produisent par épissage alternatif 11 isoformes des SERCAs. Le gène *ATP2A1* (localisé sur le chromosome 16) donne deux isoformes résultant de l'épissage impliquant la partie C-terminale de la protéine : SERCA1a et b. Le gène *ATP2A2* (localisé sur le chromosome 12) produit trois isoformes SERCA2a, b et c. Le gène *ATP2A3* (localisé sur le chromosome 17) SERCA3 est à l'origine de six isoformes SERCA3a, b, c, d, e, et f [73](Figure10).

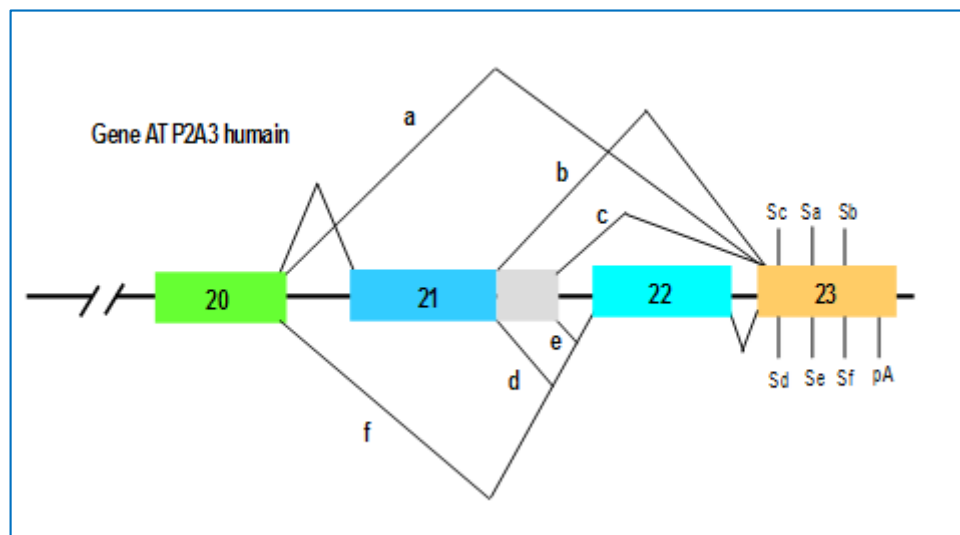


Figure 10 : Epissage alternatif du gène ATP2A3

Séquence exon/intron partielle de la partie 3'-terminale du gène *ATP2A3* humain. Les positions des épissages donnant les différentes isoformes sont indiquées, ainsi que les codons stops sur l'exon 23 et un site putatif de phosphorylation (pA).

2. Expression des SERCAs

2.1. SERCA1

L'isoforme SERCA1a est exprimée dans les fibres musculaires rapides chez l'adulte. Quant à la forme SERCA1b, elle est retrouvée dans les fibres des muscles striés néonatales [70]. Chez l'adulte l'ATPase SERCA1a est très abondante dans le réticulum sarcoplasmique, elle représente 70 à 80 % des protéines membranaires. De ce fait elle est devenue une protéine membranaire modèle, qui a permis d'étudier la famille des ATPases de type P. C'est

aussi la première ATPase de type P à avoir été clonée [70], et dont la structure tridimensionnelle à haute résolution a été obtenue [74].

2.2. SERCA2

En 1986, Brandl et ses collaborateurs ont montré l'existence d'un deuxième gène codant une Ca^{2+} ATPase du RE [75]. Ce gène code les trois isoformes SERCA2a, b, et c. SERCA2a est la forme préférentielle des fibres musculaires cardiaques, mais elle est aussi retrouvée dans d'autres tissus, tels que les cellules musculaires lisses et dans les cellules épithéliales pancréatiques [76]. L'isoforme SERCA2b a été retrouvée dans toutes les cellules testées à ce jour, y compris les cellules musculaires lisses, dans lesquelles elle est abondamment exprimée.

Une autre isoforme, SERCA2c, est présente dans les cellules non musculaires, elle est retrouvée dans les cellules épithéliales, mésenchymateuses ou hématopoïétiques. Dans ces dernières l'ARNm a été détecté dans les monocytes, avec une régulation de leur expression au cours de la différenciation [76].

2.3. SERCA3

Une troisième ATPase calcique du RE a été mise en évidence chez le rat en 1989 [77], puis chez l'homme en 1991 [78], [79], [80]. La distribution tissulaire de SERCA3 varie, et différentes propriétés biochimiques spécifiques à SERCA3 ont été mises en évidence. Des expériences d'hybridation *in situ* chez le rat, ont montré que son ARNm est détecté dès les stades précoces du développement du tube cardiaque, puis il disparaît pour ne rester exprimé que dans l'aorte puis l'endothélium artériel chez les embryons de 14 à 16 jours [81].

SERCA3 est aussi exprimée dans les cellules non musculaires, telles que les cellules épithéliales et endothéliales, les cellules β pancréatiques, et les cellules hématopoïétiques chez l'adulte [82]. Dans ces lignages l'expression de SERCA3 peut varier selon l'état de différenciation de la cellule.

Il a également été montré que l'expression des protéines SERCA3 varie selon le type cellulaire et l'état de différenciation. Par exemple, SERCA3 est abondamment exprimée dans les cellules épithéliales coliques normales alors que son expression est fortement diminuée ou nulle dans les cancers colique [83].

Une particularité de SERCA3, est l'existence d'isoformes spécifiques d'espèce. Ainsi, les isoformes SERCA3 humaines n'ont pas d'homologues chez la souris ou le rat à l'exception de l'isoforme SERCA3a.

3. Structure des SERCAs

Les SERCAs sont des ATPases d'environ 110 kDa, qui comprennent entre 994 et 1043 acides aminés. Les travaux de cristallographie et de modélisation *in silico* de l'équipe de Toyoshima, ont permis d'élucider la structure tridimensionnelle de l'ATPase SERCA1a musculaire [74]. Les SERCAs ont une structure asymétrique avec 3 domaines distincts : un domaine transmembranaire contenant les sites de haute affinité pour le calcium, un grand domaine cytoplasmique contenant les sites de fixation de l'ATP et de phosphorylation, ainsi qu'un petit domaine luminal.

Le domaine cytoplasmique

Ce domaine est divisé en trois régions. Un petit domaine appelé A pour « Actuator », est constitué des 40 acides aminés N-terminaux de la protéine. Il contient la séquence TGES très conservée dans l'ensemble des ATPases de type P. Ce domaine joue un rôle dans le contrôle de l'accessibilité des ions Ca^{2+} à leurs sites de fixation, ainsi que dans la déphosphorylation de l'enzyme. Un deuxième domaine, le domaine P, est constitué de sept feuillets beta et huit hélices alpha. Il contient le site d'autophosphorylation. Le troisième domaine, le domaine N, est impliqué dans la liaison des nucléotides ATP/ADP.

Le domaine transmembranaire

Ce domaine est composé de dix hélices alpha qui participent à la formation du pore calcique [74], permettant la translocation du calcium du cytoplasme vers la lumière du réticulum. Les hélices 4, 5, 6 et 8 sont impliquées dans la fixation du calcium. L'hélice M5, qui va de la face luminale au centre du domaine P, est un élément structural déterminant pour le fonctionnement de l'enzyme car elle connecte le domaine transmembranaire au domaine cytoplasmique et au domaine luminal.

Le domaine luminal

C'est le plus petit domaine (3% de la molécule), il est au contact de la lumière du réticulum. Seule la boucle L78 reliant les segments M7 et M8, se distingue par sa plus grande taille. Des mutations au niveau de cette boucle (cystéines 876 et 888) induisent une perte complète de l'activité de transport du Ca^{2+} .

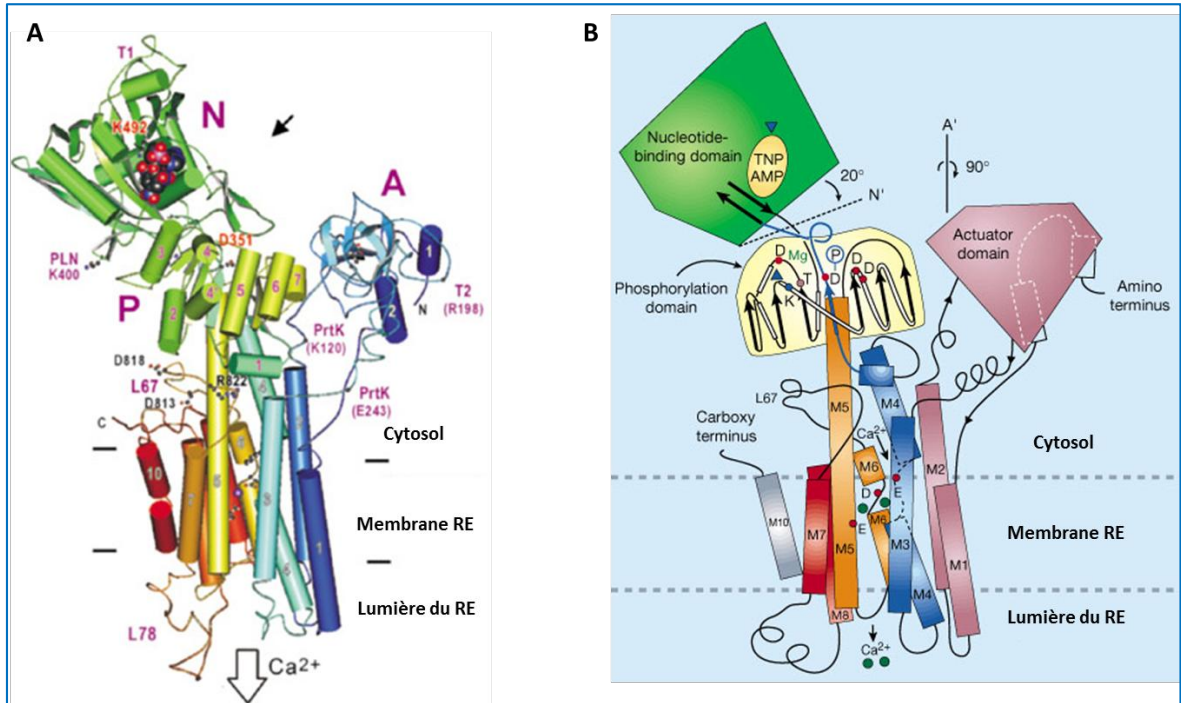


Figure 11 : Structure tertiaire de SERCA1a

A : Structure tertiaire proposée par Toyoshima et al., 2000 [74]. **B** : Vue d'ensemble de la structure tridimensionnelle, N « nucleotide binding domain » : domaine de liaison du nucléotide. A « actuator domain » : domaine de transduction. P « phosphorylation domain » : domaine de phosphorylation. (MacLennan et Green, 2000) [84].

4. Fonctionnement des SERCAs

4.1. Le cycle catalytique

La compréhension du mécanisme de transport actif du Ca^{2+} par les SERCAs est essentiellement due aux études sur SERCA1a. Le transport actifs d'ions Ca^{2+} radioactifs ($^{45}\text{Ca}^{2+}$) catalysé par l'ATP, à l'intérieur de vésicules du réticulum sarcoplasmique a été mis en évidence, dès les années 1960 [85]. Depuis, le mécanisme de transport de calcium a fait l'objet de plusieurs études. Dans les années 70, un premier modèle toujours actuel décrivant le transport de Ca^{2+} a été proposé par Makinose et al. [86].

Le cycle de transport du calcium s'appuie sur la formation d'une liaison covalente entre un groupement aspartyl de l'enzyme et le groupement phosphate terminal de l'ATP, menant à la formation d'un complexe aspartyl-phosphate de haute énergie. Ce complexe assure le transfert de l'énergie de l'ATP qui est requise pour le transport actif de calcium. Deux ions calcium sont transportés pour une molécule d'ATP hydrolysée, du cytoplasme vers la lumière du RE par les enzymes de type SERCA.

Le transport du Ca^{2+} par les SERCAs se fait selon le modèle de transition conformationnelle E1-E2. L'état E1 représente la conformation de haute affinité pour le Ca^{2+} , dans cette conformation, la molécule peut lier l'ion Ca^{2+} à partir du cytosol. Cette liaison entraîne une transition conformationnelle de la pompe permettant la fixation d'une molécule d'ATP suivi de l'autophosphorylation de l'enzyme. Cette nouvelle conformation E2 est de faible affinité pour le Ca^{2+} et les deux ions calcium sont libérés du côté de la lumière du RE. Le retour à l'état E1 est réalisé par le contre transport de 1 ou 2 protons à la place d'ions Ca^{2+} et à leur libération dans le cytoplasme [87].

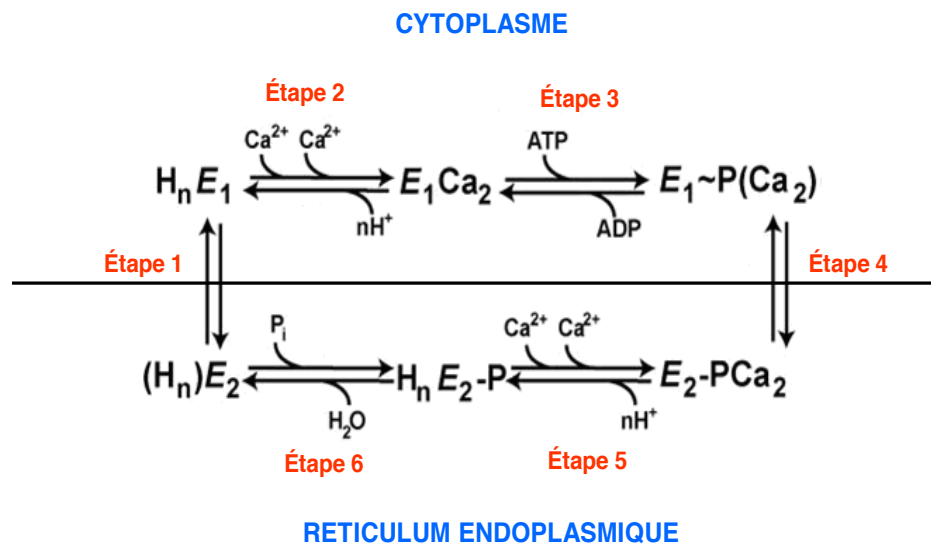


Figure 12 : Cycle catalytique des pompes de type SERCA

Ce schéma montre que deux ions Ca^{2+} sont transportés vers la lumière du réticulum endoplasmique, grâce à l'énergie produite par l'hydrolyse d'ATP. Il y a formation d'un intermédiaire phosphorylé.

E1 : conformation avec des sites de haute affinité pour le calcium ; E2, conformation avec faible affinité pour le calcium (Dode et al., 2003) [71].

4.2. Les changements conformationnels des SERCAs au cours du cycle de transport du Ca^{2+}

Les SERCAs passent par plusieurs conformations au cours du transport de Ca^{2+} . Les travaux de cristallographie et de modélisation *in silico* de l'équipe de Toyoshima, ont permis d'élucider ces changements conformationnels de la molécule.

Étape 1 : état E2

Cet état est considéré comme l'état basal de l'enzyme. La liaison de deux ions Ca^{2+} redresse l'hélice transmembranaire M5, qui abolit la configuration fermée des trois domaines cytoplasmiques A, N et P de l'enzyme. Cela permet ensuite l'accès de l'ATP au site de phosphorylation et rendra le site catalytique accessible.

Les deux ions Ca^{2+} vont alors se lier aux sites de haute affinité formés par les quatre hélices transmembranaires (M4, M5, M6 et M8) qui forment un pore vers le côté cytoplasmique. L'hélice M1

est profondément ancrée dans la bicouche lipidique, et elle est indirectement stabilisée par les deux ions Ca^{2+} liés.

Étape 2 : état E1.2Ca²⁺

Le γ -phosphate de l'ATP et un ion Mg^{2+} se lient au domaine P, le transfert du groupement phosphate terminal de l'ATP se fait sur le résidu aspartate (Asp351) du domaine P. Ceci provoque le repliement de ce domaine et le contact direct entre les deux domaines N et P. Dans le même temps, l'hélice M1 est tirée vers le côté cytoplasmique, afin que la partie supérieure de l'hélice bloque l'accès au pore ouvert dans ce compartiment.

Étape 3 : état E1.ATP~ E1P

Le transfert d'un groupement phosphate sur le résidu aspartate 351 permet la dissociation de l'ADP de l'enzyme. Cette dissociation déclenche la séparation des deux domaines N et P et permet la rotation du domaine A, afin que la séquence TGES puisse interagir avec le site de phosphorylation. Ceci engendre d'importants réarrangements des hélices transmembranaires (M1-M6). Le mouvement vers le côté luminal de l'hélice M4 poussée par les parties inférieures des hélices M1 et M2, la recourbure de l'hélice M5 et la rotation de l'hélice M6. Ces modifications masquent les sites de liaison au Ca^{2+} et induisent le déplacement de l'hélice M4L qui déclenche l'ouverture d'un pore du côté luminal par lequel les ions Ca^{2+} sont relâchés dans la lumière du RE.

Étape 4 : état E2P

La séquence TGES du domaine A fixe une molécule d'eau et catalyse son attaque sur l'aspartyl-phosphate, vraisemblablement en retirant un proton de la molécule d'eau, provoquant ainsi la libération du groupement phosphate et du Mg^{2+} attachés au domaine P. Ceci provoque des mouvements au niveau des hélices M1 et M2 afin que l'hélice M4L ferme complètement le pore luminal, et que la partie supérieure de l'hélice M1 permette la formation d'un pore qui donne l'accès au site de liaison au Ca^{2+} .

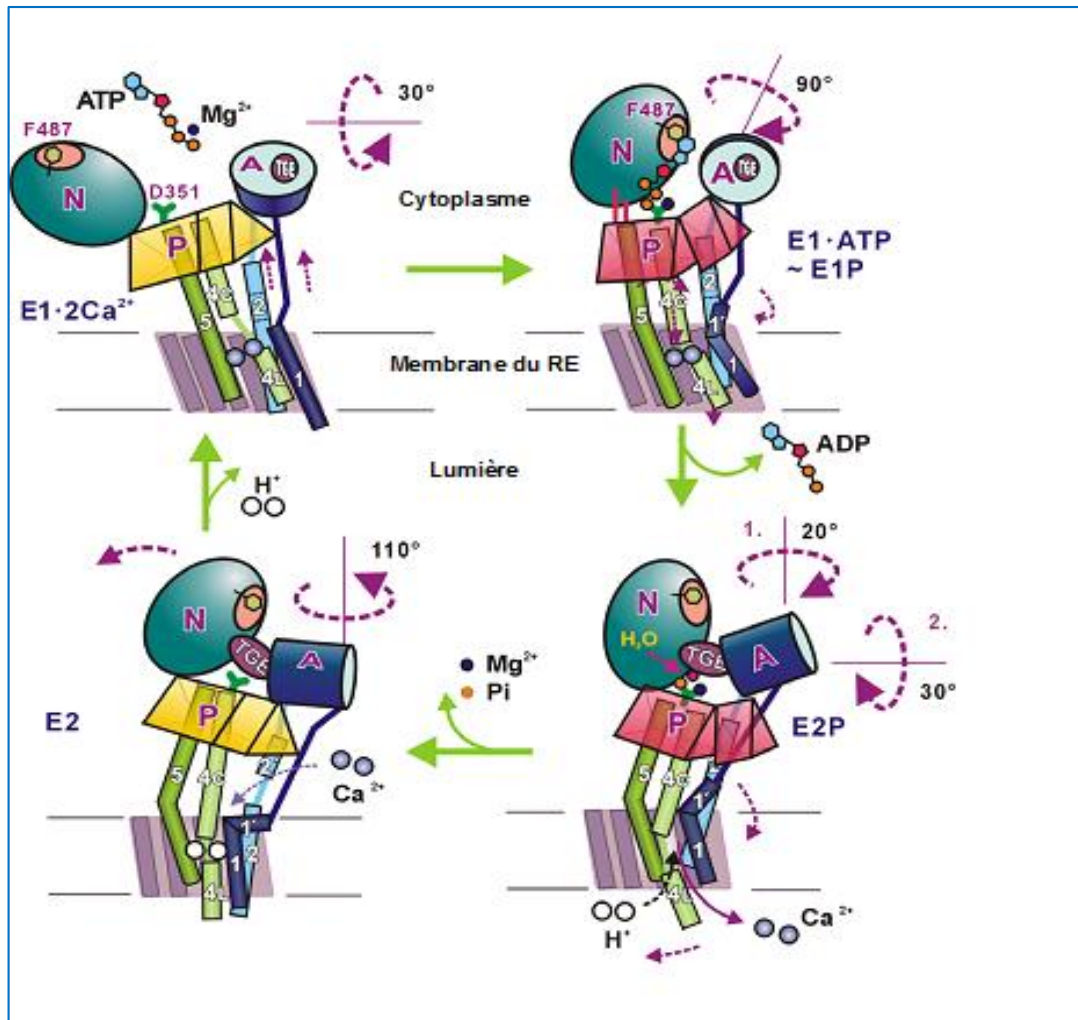


Figure 13 : Les changements conformationnels majeurs de la structure de l'enzyme SERCA au cours du cycle de transport du calcium

(Toyoshima 2008) [88]

4.3. Différences fonctionnelles entre les différentes isoformes SERCAs

Bien que le cycle catalytique présenté ci-dessus s'applique à toutes les isoformes SERCA, ces enzymes présentent des propriétés biochimiques distinctes. Celles-ci ont été établies et comparées après transfection de leur ADNc dans les cellules COS-1 ou HEK-293, ainsi que sur protéines endogènes dans la lignée Jurkat et des lymphocytes primaires fraîchement isolés [89], en mesurant l'activité ATPase et le transport du Ca^{2+} . Ces expériences ont permis d'établir une comparaison fonctionnelle.

Les deux isoformes SERCA1 ont la même affinité pour le Ca^{2+} contrairement à celle de SERCA2 où, SERCA2b est environ deux fois plus forte que celle de SERCA2a. Tandis que, l'activité de transport de Ca^{2+} par SERCA2a est supérieure à celle de SERCA2b. SERCA3

présente des différences importantes par rapport aux autres isoformes. L'affinité pour le Ca^{2+} du SERCA3a chez le rat est réduite par rapport à celle de SERCA1 ou SERCA2, mais pas son affinité pour l'ATP. Quant au pH optimal de transport, celui de SERCA3a est plus basique que celui des autres isoformes SERCA1 et 2 [72]. Ces différences observées chez le rat ont été retrouvées chez l'homme pour l'isoforme SERCA3a, b et c [90]. Des études comparatives ont établi que l'affinité vis-à-vis du calcium de SERCA3 ($\sim 1,2 \mu\text{M}$; Tableau 1) est considérablement inférieure à celle de SERCA2b ($\sim 0,2 \mu\text{M}$). Cette différence d'affinité vis-à-vis du calcium rend SERCA3 une pompe moins « stricte » que SERCA2b avec laquelle elle peut être co-exprimée. Au cours d'un épisode d'activation calcique cellulaire, SERCA3, grâce à son affinité plus faible pour le calcium, peut tolérer des pics calciques plus élevés que SERCA2b. La modulation par la cellule, des taux d'expression de SERCA2b/SERCA3, constitue ainsi un mécanisme biochimique unique pour la régulation du recaptage de calcium par le RE qui peut avoir des conséquences fonctionnelles importantes sur l'homéostasie calcique.

Tableau 1 : Comparaison de l'affinité des SERCAs pour le Ca^{2+}

[72] [90]

Isoformes	Affinité pour le Ca^{2+} (μM)	Espèce
SERCA1a SERCA1b	0,6	Rat
SERCA2a SERCA2b	0,4 0,27	Lapin Homme
SERCA3a	2,2 1,47	Souris Homme
SERCA3b	1,27	Homme
SERCA3c	1,57	Homme

5. Régulation de l'activité des SERCAs

Deux protéines sont connues pour moduler l'activité des SERCAs, le phospholamban et la sarcopoline. Le phospholamban non phosphorylé peut se lier de façon réversible aux isoformes SERCA1 et SERCA2 et modifier leur cycle catalytique. Une des séquences d'interaction avec le phospholamban est absente dans SERCA3.

Les isoformes SERCA peuvent être régulés par la calmoduline Kinase II par phosphorylation sur le résidu sérine 38 (Sér38). La phosphorylation a pour but d'augmenter la vitesse de pompage de SERCA2a sans modifier son affinité pour le Ca^{2+} [91]. Les isoformes SERCA1 et SERCA3 ne possédant pas la Sér38.

Les SERCAs peuvent aussi être modulées par oxydation. Des études de l'activité de SERCA2b et SERCA3 surexprimées dans les cellules HEK-293T ont ainsi montré que SERCA3 est plus résistante au stress oxydatif que SERCA2b [92]. Il semble donc que les tissus ou cellules principalement exposés au stress oxydatif (épithélium trachéal, endothélium vasculaire, mastocytes, lymphocytes, plaquettes) expriment majoritairement l'isoforme SERCA3.

Inhibiteurs pharmacologiques des SERCAs

Les SERCAs peuvent également être inhibées par des inhibiteurs pharmacologiques. L'inhibition des SERCAs conduit au relargage de Ca^{2+} stocké dans le RE vers le cytosol. En effet, lorsque le système permettant l'entrée du Ca^{2+} dans le RE est inhibé, seule la sortie du Ca^{2+} est assurée entraînant un relargage massif de Ca^{2+} dans le cytosol.

Les enzymes de type SERCA partagent la caractéristique d'être inhibées de façon sélective et irréversible par la thapsigargine (TG). C'est un inhibiteur non compétitif et spécifique de ces pompes. La constante d'inhibition K_i est de l'ordre du picomolaire. Cette molécule naturelle d'origine végétale fait partie de la famille des sesquiterpènes lactones. Elle empêche la fixation d'ATP et stabilise l'enzyme dans une conformation qui ne peut plus fixer le calcium. La thapsigargine interagit avec la partie transmembranaire de la pompe. Cette molécule est très utilisée dans les études fonctionnelles et structurales des SERCAs, ainsi que dans celles axées sur les mécanismes d'action et les voies de signalisation du calcium dans la cellule.

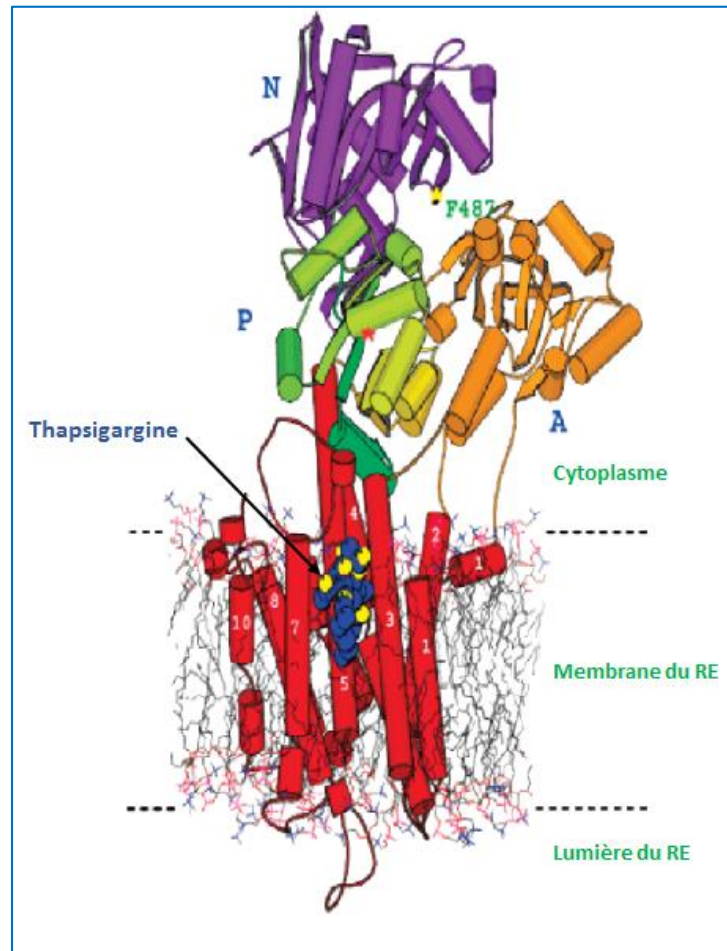


Figure 14 : Site de fixation de la thapsigargine sur SERCA1a

La molécule de thapsigargine (présentée dans les sphères bleues et jaunes) se lie à SERCA dans une cavité formée par des résidus sur les hélices transmembranaires 3, 5 et 7. Le site de liaison d'ATP est situé près du résidu F487 (astérisque jaune) dans le domaine nucléotidique (N) en violet. Le résidu phosphorylant (Asp351) est marqué par un astérisque orange dans le domaine de la phosphorylation (P), qui est représenté en vert (Singh et al., 2005) [93].

La thapsigargine a un grand intérêt thérapeutique, par exemple dans le cancer le blocage du fonctionnement des SERCAs par cet inhibiteur entraîne une élévation importante du calcium libre dans la cellule cancéreuse, induisant l'apoptose cellulaire. Cette propriété fait de la thapsigargine un bon candidat pour l'industrie pharmaceutique, à condition toutefois de pouvoir cibler spécifiquement l'action de cet inhibiteur vers les cellules cancéreuses [94].

Un autre inhibiteur des ATPases calciques SERCAs est l'acide cyclopiazonique (CPA), c'est une mycotoxine qui inhibe spécifiquement les SERCAs, et comme la TG elle bloque l'enzyme dans un état E₂ en se fixant à l'interface entre le domaine membranaire et le cytosol. Le CPA interagit essentiellement avec les hélices M1 et M2, reliées au domaine cytoplasmique via des boucles souples qui ont un rôle dans la communication entre le domaine membranaire et la tête cytosolique de l'ATPase [88].

Le 2,5-di-(*tert*-butyl)-1,4-benzohydroquinone (tBHQ) est un antioxydant qui inhibe lui aussi les SERCAs. Cet inhibiteur se fixe au domaine membranaire de l'enzyme, en se plaçant entre les hélices transmembranaires M3 et M4, par des liaisons hydrogènes, au niveau de l'interface membrane cytosol. L'utilisation du tBHQ a permis l'obtention d'une structure de SERCA, qui présente un repliement identique à celui publié en présence de la thapsigargine [95].

Enfin l'ionomycine, est un ionophore calcique sélectif, qui se fixe préférentiellement sur les membranes intracellulaires, il a un effet similaire aux inhibiteurs des SERCAs en mobilisant le calcium stocké dans le RE.

Le tableau ci-dessous résume les principaux inhibiteurs des pompes calciques.

Tableau 2 : Principaux inhibiteurs pharmacologiques des pompes SERCA

Inhibiteurs	Pompes	Inhibition	Conformation
Thapsigargine (TG)	SERCAs	Pas de formation de l'intermédiaire phosphorylé	E ₂
2,5-di-(<i>tert</i> -butyl)-1,4-benzohydroquinone (tBHQ)	SERCAs	Déplacement de l'équilibre E ₁ -E ₂ vers E ₂ , inhibe la formation de l'intermédiaire phosphorylé	E ₂
Acide cyclopiazonique (CPA)	SERCAs	Stabilisation de l'état E ₂ , diminution de l'affinité pour l'ATP, inhibe la formation de l'intermédiaire phosphorylé	E ₂

II. Les pompes calciques de type PMCA

Les PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase) sont des pompes calciques dont la structure présente une forte homologie avec les SERCA. Elles sont localisées au niveau de la membrane plasmique où, elles assurent le transport actif de calcium depuis le cytosol vers le milieu extracellulaire permettant ainsi la diminution de la concentration calcique cytosolique.

La masse moléculaire des PMCA varie entre 125 et 140 kDa. Dix segments transmembranaires ont été identifiés. Trois domaines structurés, très importants pour le fonctionnement de l'enzyme, sont situés du côté intracellulaire (Figure 11). Le premier est constitué de 40 acides aminés basiques et permet la liaison de phospholipides. Ces derniers stimulent l'enzyme en modifiant la vitesse maximale d'hydrolyse (V_{max}) et l'affinité (K_m). Le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) est l'un des stimulateurs les plus efficaces des PMCA. Le deuxième domaine contient l'aspartate catalytique situé dans le domaine de phosphorylation. Enfin, le troisième domaine, qui correspond à la partie carboxy-terminale auto-inhibitrice, comporte le site de fixation de la calmoduline. Dans les conditions où la concentration en calcium intracellulaire est faible, le complexe CaM-Ca²⁺ n'est pas fixé et l'ATPase est moins active (pompage à une vitesse et affinité moindre) [96]. Ce domaine régulateur comporte aussi des sites d'interactions avec les protéines kinases A et C (phosphorylations activatrices), ainsi que des sites allostériques de fixation du calcium. La principale différence entre les isoformes se situe au niveau de la région carboxy-terminale autoinhibitrice. Les PMCA transportent un ion calcium pour un équivalent ATP hydrolysé. À l'état non stimulé, les PMCA possèdent une faible affinité pour le calcium. L'enzyme est donc moins active pour des concentrations en calcium physiologiques observées au repos. Si la concentration calcique augmente, la fixation de la calmoduline ou de phospholipides augmentent son affinité et son activité de transport.

Ces pompes ont été retrouvées dans toutes les cellules de mammifères. Les protéines PMCA sont codées par 4 gènes différents qui donnent par épissage alternatif plus de 20 isoformes chez l'homme [97]. Les structures primaires des différentes isoformes présentent entre 85 et 90 % d'homologie. Ces isoformes ont une distribution tissulaire très variée, chez l'homme les PMCA2 et PMCA3 sont principalement exprimées dans les tissus neuronaux : PMCA2 est exprimée préférentiellement dans le cervelet et PMCA3 est détectée en grande quantité

dans le plexus choroïde [98]. L'isoforme PMCA1 est exprimée de façon ubiquitaire, elle est souvent co-exprimée avec PMCA4b [99].

Il est intéressant à noter que la cinétique de fixation et de dissociation de la calmoduline à PMCA4 est plus lente que celle des autres isoformes. Ainsi, l'activation du transport, par le PMCA4, de calcium sera retardée pendant l'augmentation de la concentration calcique cytosolique, et restera active plus longtemps au cours de sa diminution. Ce mécanisme illustre bien la capacité des pompes calciques d'influencer, et ceci en fonction de l'isoforme, les caractéristiques spatio-temporelles des signaux calciques cellulaires [100].

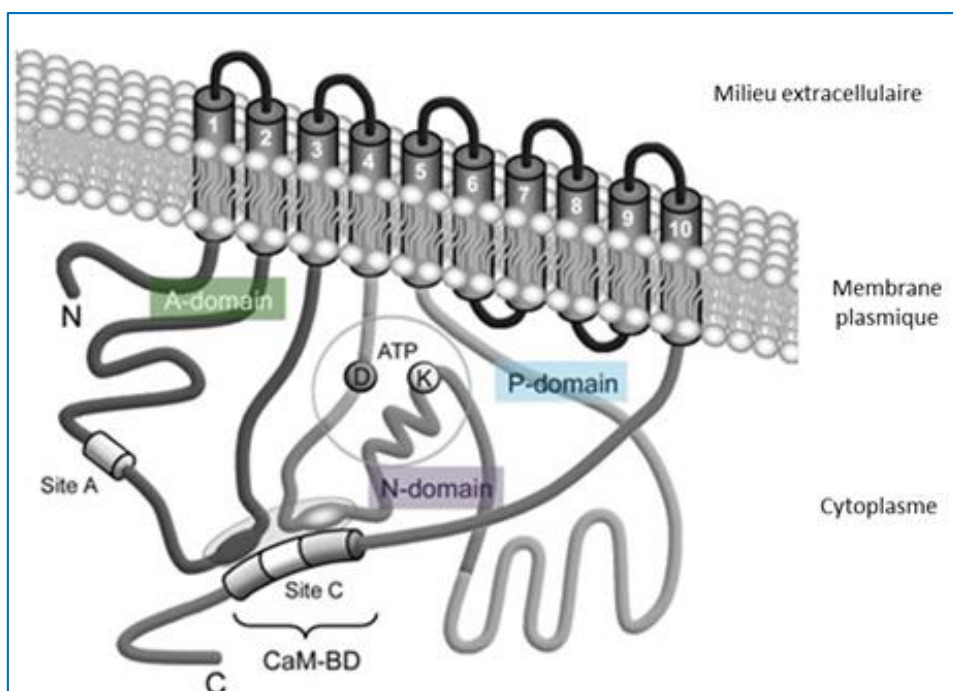


Figure 15 : Schéma du modèle topologique des PMCAs

Les segments transmembranaires (TM) sont illustrés par des cylindres numérotés de 1 à 10. Les trois domaines définis par homologie avec la structure 3D de la pompe SERCA sont indiqués par des couleurs différentes (Di Leva et al., 2008) [98].

PMCA et pathologie

L'inactivation des gènes PMCA1 est létale chez la souris à l'état homozygote, suggérant que cette isoforme assure des fonctions de type « housekeeping ». La forme PMCA4, dont les souris invalidées sont viables, assurerait des fonctions plus spécialisées,

propres au type cellulaire. Les mutations touchant le gène *PMCA2* chez la souris ont pour conséquence une surdité et une perte de l'équilibre. Ce phénomène est lié à la perturbation de l'homéostasie calcique dans les cellules ciliées de l'oreille interne dans lesquelles *PMCA2* est fortement exprimée.

III. Les pompes calciques de type SPCA

Les pompes calciques de type SPCAs (Secretory Pathway Calcium ATPase) sont localisées au niveau du complexe de Golgi. Elles ont une structure proche des SERCAs. L'analyse des séquences d'acides aminés indique que SPCA1 contient tous les domaines hautement conservés caractérisant les ATPases de type P [29].

Il existe deux gènes SPCA humain connus, *ATP2C1* et *ATP2C2* codant les protéines SPCA1 et SPCA2, respectivement. SPCA1 est fortement exprimé dans les kératinocytes, et à des niveaux variables dans tous les autres tissus humains testés, indiquant que c'est une isoforme ubiquitaire. Des mutations du gène *ATP2C1* ont été décrites dans la maladie de Hailey-Hailey, maladie dermatologique caractérisée par une perte de l'adhésion des kératinocytes de l'épiderme. L'expression du gène *ATP2C2* est plus limitée, son ARNm étant présent, dans les cellules épithéliales de l'intestin, et de l'estomac au rectum, à l'exception de l'œsophage, ainsi que dans la prostate, la moelle osseuse, le poumon et la trachée [29].

La fonction des pompes SPCA est d'assurer l'accumulation des ions calcium dans le complexe de Golgi. Cette pompe est également connue d'être capable de transporter les ions manganèse (Mn^{2+}), co-facteur nécessaire au fonctionnement d'un certain nombre d'enzymes golgiennes. Son rôle dans la régulation du Ca^{2+} dans l'appareil de Golgi a été élucidé au cours de la recherche clinique des mécanismes pathologiques de la maladie de Hailey-Hailey et d'autres maladies en induisant la mort cellulaire [101].

Chapitre III : Régulation de l'expression des SERCAs en physiopathologie

I. Invalidation et mutations des gènes SERCA

L'invalidation du gène *ATP2A1* chez la souris permet l'obtention de souris homozygotes [102]. Toutefois, des difficultés respiratoires accompagnées d'une cyanose progressive à la naissance semblent être la cause de la mort rapide des jeunes souris. Aucune anomalie n'est relevée chez l'embryon. Toutefois après analyses des tissus, on constate au niveau des poumons une congestion diffuse et au niveau du diaphragme des régions hypercontractiles caractérisées par une vitesse maximale de transport calcique réduite de 80%. Aucun phénomène compensatoire n'est observé en termes d'expression des SERCAs. Ces anomalies semblent être responsables de la mort des souris par insuffisance respiratoire.

Chez l'homme des mutations du gène *ATP2A1* et modifications de la protéine SERCA1a sont à l'origine d'une maladie héréditaire : le syndrome de Brody. Cette pathologie se caractérise par un dysfonctionnement des muscles squelettiques qui donne des contractures musculaires [103]. Il s'explique par le ralentissement de la relaxation musculaire dû à la diminution de l'activité de transport de SERCA1a [104]. Certaines mutations du gène *ATP2A1* conduisent à une perte de l'expression de cette protéine. Cependant, malgré l'abondance de SERCA1a dans le muscle sain et son rôle majeur, les signes cliniques du syndrome de Brody sont souvent bénins, du fait de l'expression compensatoire d'autres pompes.

SERCA1 est aussi impliquée dans la cancérogénèse. L'infection par le virus de l'hépatite B (HBV) qui permet le développement de carcinomes hépatocellulaires est parfois liée à l'insertion du génome viral dans le gène *ATP2A1*. Ceci conduit à l'expression de protéines chimères qui formeraient un canal calcique dans la membrane du RE. Ces protéines chimères sont impliquées dans la prolifération des cellules cancéreuses *in vivo* et dans la viabilité cellulaire *in vitro* [105].

L'invalidation du gène *ATP2A2* chez la souris a montré son rôle vital puisqu'il est impossible d'obtenir des souris homozygotes (*SERCA2^{-/-}*) [106]. Les souris hétérozygotes montrent une diminution de la pression artérielle ventriculaire ainsi qu'une diminution de la

séquestration de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique cardiaque. La conséquence en est une modification de l'homéostasie calcique et des taux de Ca^{2+} disponibles pour le phénomène de contraction/relaxation cardiaque [107]. Toutefois le déficit en protéine SERCA2 peut être partiellement compensé par une augmentation de l'expression des NCX [108].

Le taux de survie à 80 semaines de ces souris hétérozygotes est de 12% contre 80% pour les souris sauvages. Cette mortalité résulte du développement de tumeurs multiples au niveau de l'épithélium pavimenteux stratifié (peau, œsophage...) [109].

D'autres pathologies humaines sont associées à des défauts de fonctionnement de SERCA2, notamment dans le cancer de la prostate, où il existe une corrélation entre les taux d'expression de SERCA2b et la croissance des cellules tumorales [110]. De même, plusieurs mutations du gène *ATP2A2* sont responsables d'une maladie génétique de la peau, la maladie de Darier qui est caractérisée par une hyperkératose [111].

L'invalidation du gène *ATP2A3* permet l'obtention de souris homozygotes viables, fertiles, mais avec un défaut de relaxation des muscles lisses de la trachée ou de l'endothélium. Ce défaut impliquerait la voie NO suggérant l'implication de SERCA3 dans cette voie de signalisation [112], [113]. L'analyse de cellules endothéliales isolées indique une perturbation dans la signalisation calcique induisant l'activation de la NOS3. Cette enzyme est localisée dans les cavéoles et son activation par le Ca^{2+} dépend des réserves associées à SERCA3. D'ailleurs un compartiment calcique sous-membranaire a été décrit dans les cellules endothéliales artérielles, et une étude montre qu'il peut être responsable de l'activation de NOS3 [114]. Ces résultats indiqueraient une localisation de SERCA3 dans le RE sous-jacent à la membrane plasmique dans ce type cellulaire.

Des mutations du gène *ATP2A3* chez l'homme ont été retrouvées chez 6% des patients souffrant de diabète de type II, suggérant que le gène *ATP2A3* contribue à la susceptibilité à développer un diabète de type II [115]. Ces personnes ne souffrent pas d'obésité, ne présentent pas d'hyperglycémie marquée mais seulement un dysfonctionnement des cellules β -pancréatiques. Ces mutations participent probablement aux dérèglements cellulaires observés dans le diabète. Une diminution d'expression de SERCA3 est également retrouvée dans les cellules β -pancréatiques dans le diabète de type-II, cela modifie les caractéristiques spatio-temporelles des oscillations nécessaires pour la sécrétion d'insuline [116].

II. Expression des SERCAs dans les cellules différenciées

SERCA3 est abondamment exprimée dans les cellules les plus différenciées de certains types tissulaires, telles que les cellules épithéliales de l'estomac, de l'intestin grêle et du colon. Dans ce dernier, la muqueuse normale exprime abondamment SERCA3. Cependant un gradient d'expression de la base des cryptes coliques vers la surface, est observé ; l'expression la plus importante étant localisée dans les cellules les plus superficielles, donc les plus matures et différenciées. Ceci indique que l'expression de SERCA3 est induite à un stade relativement précoce de la maturation des cellules épithéliales du tube digestif, et que cette expression augmente au cours de la différenciation [83].

Une forte expression de SERCA3 a également été retrouvée dans l'épithélium bronchique cilié normal, différencié, in situ [117], ainsi que dans le tissu mammaire, avec les taux d'expression les plus élevés dans les cellules épithéliales lobulaires normales. L'expression de SERCA3 a également été observée, bien qu'à un niveau inférieur, dans les cellules canalaire luminales, tandis que les cellules myoépithéliales étaient constamment négatives. Cela indique que SERCA3 constitue un nouveau marqueur phénotypique qui affiche un motif d'expression spécifique dans la glande mammaire normale [118].

Dans les cellules d'origine hématopoïétique, il y a une forte expression de SERCA3 dans les plaquettes sanguines et les granulocytes. Une étude par immunohistochimie réalisée sur des ganglions lymphatiques normaux a montré que les lymphocytes B de la région du manteau expriment SERCA3 de façon abondante, alors que cette expression diminue dans les centres germinatifs (Figure 16). Cette observation montre que les petits lymphocytes B matures, non activés, expriment SERCA3 abondamment, et que l'expression de SERCA3 peut ensuite diminuer au cours de leur activation dépendante de l'antigène [119]. Il est intéressant de noter qu'il y a également une forte expression de SERCA3 dans les lymphocytes T, qui diminue au cours de leur activation [120]. Ainsi, l'ensemble de ces résultats indique que la régulation de l'expression de SERCA3 est liée à l'activation lymphoïde T et B, avec des taux d'expression forts dans les cellules matures, qui n'ont pas encore été activées par l'antigène.

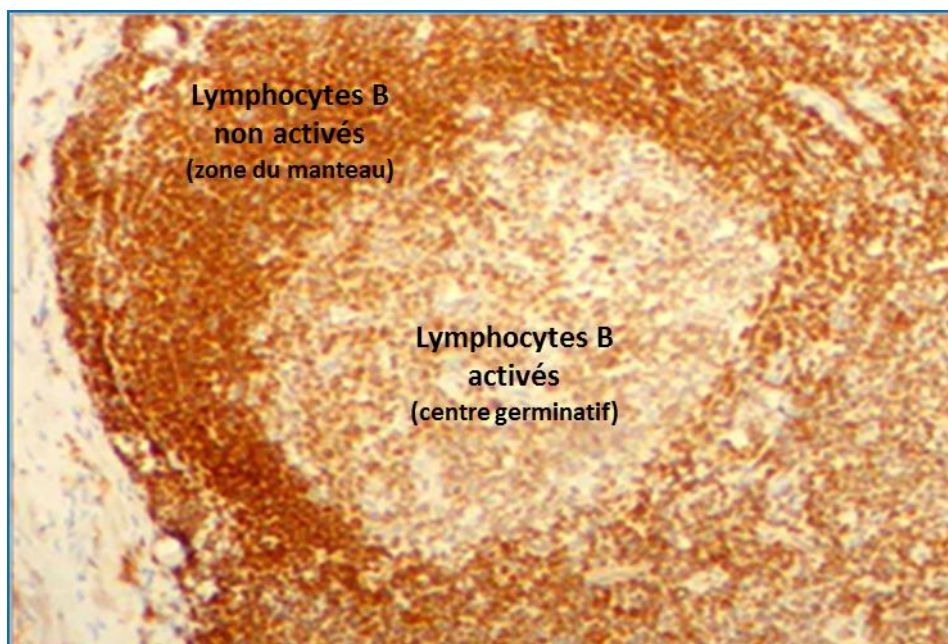


Figure 16 : Coupe histologique du ganglion

Marquage immuno-histochimique sur ganglion lymphatique humain pour SERCA3 réalisé avec l'anticorps PL/IM430. Les lymphocytes B non activés localisés dans le manteau sont fortement positifs pour SERCA3, alors que l'expression de SERCA3 dans les cellules B activées du centre germinatif est diminuée.

III. L'expression des SERCAs dans les cellules cancéreuses

Les niveaux d'expression des SERCAs sont altérés dans de nombreux cancers. L'expression de SERCA3 diminue dans les cellules cancéreuses telles que le cancer du côlon, du sein, du poumon et les leucémies myéloïdes [121]. Dans ces différents modèles, l'expression de SERCA3 diminue considérablement et devient même indétectable dans les stades les plus avancés de la cancérogénèse. Par exemple, des marquages immuno-chimiques de SERCA3 dans des échantillons de tissus coliques ont montré une diminution de l'expression de l'isoforme SERCA3 durant la progression tumorale. En effet, l'expression de SERCA3 est hétérogène, mais globalement diminuée dans les adénomes, à peine détectable dans les adénocarcinomes coliques bien différenciés et indétectable dans les adénocarcinomes peu différenciés. Cependant, similairement à l'épithélium normal, il y a une forte expression de SERCA3 dans l'hyperplasie colique [83]. L'ensemble de ces

observations montre que la perte progressive de l'expression de SERCA3 est étroitement liée à la séquence de progression tumorale, néoplasie bénigne pré-cancéreuse (adénome), carcinomes bien, moyennement et peu différencié.

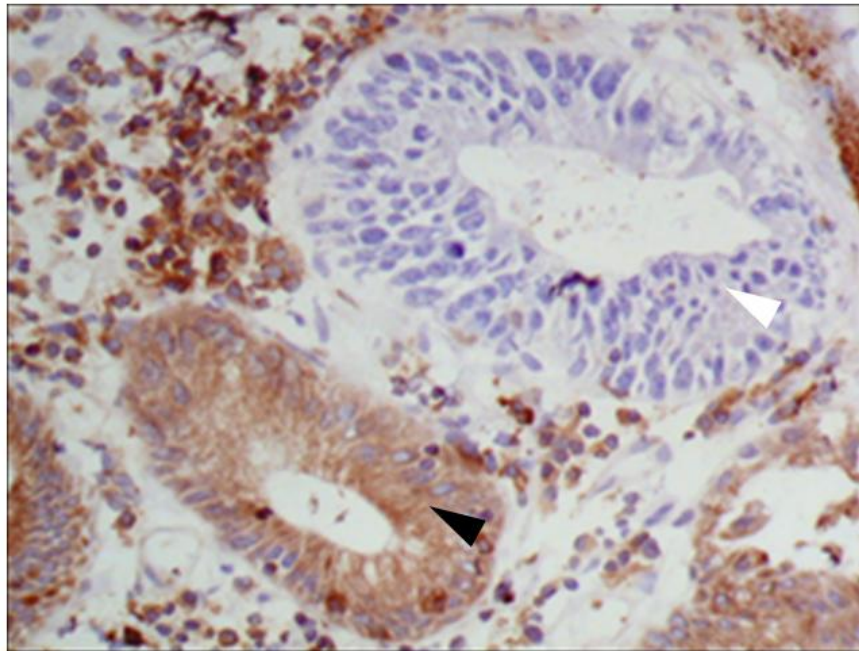


Figure 17 : Marquage immunohistologique de SERCA3 sur tissu colique normal et cancéreux

Marquage immuno-histochimique réalisé avec l'anticorps PL/IM430. Les cellules épithéliales normales sont fortement positives pour SERCA3 (flèche noire), alors que les cellules cancéreuses présentent une absence de marquage (flèche blanche). Les noyaux sont contre colorés à l'hématoxyne (couleur bleu) [122].

Dans une autre étude, les auteurs ont montré que lors de la progression du cancer du poumon, il y a une perturbation de l'homéostasie calcique du RE due aux variations d'expression de SERCA3 [117]. Dans le cas du cancer du sein, il a été montré une forte diminution de l'expression de SERCA3 aux niveaux des lésions épithéliales lobulaires bénignes bien que très précoces comme à l'état d'adénome. L'expression de SERCA3 reste faible dans les carcinomes lobulaires [118]. La diminution de l'expression de SERCA3 a été observée aussi dans les lésions tumorales invasives de type canalaire et dans ces lésions, la perte d'expression de SERCA3 a été proportionnelle au grade histologique de malignité des tumeurs.

IV. SERCA et différenciation cellulaire

1. Leucémie aiguë promyélocytaire

La leucémie promyélocytaire aiguë (APL) est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation de cellules bloquées au stade promyélocytaire de la différenciation granulocytaire neutrophile, due à une protéine de fusion qui interfère par un mécanisme de dominant négatif avec la signalisation de l'acide rétinoïque. Le traitement par des doses pharmacologiques d'ATRA (acide rétinoïque tout-trans) lève le blocage dû à cette protéine de fusion [123].

La différenciation de cellules issues de leucémies aiguës promyélocytaires vers la lignée granulocytaire neutrophile est corrélée avec l'augmentation de l'expression de SERCA3. Le traitement *in vitro* des lignées cellulaires promyélocytaires ou myéloblastiques (lignées NB4 et HL-60, respectivement) par l'ATRA, mène à une différenciation terminale granulocytaire accompagnée d'une induction de l'expression de SERCA3 et d'une diminution de l'expression de SERCA2. Cette régulation positive de l'expression de SERCA3 suit une évolution identique à celle d'autres marqueurs de différenciation tels que le NADPH-oxydase ou le CD11b [124]. Le traitement *ex vivo* par l'ATRA des cellules leucémiques issues de patients atteints d'APL a permis de montrer que l'expression de SERCA3 est remodelée aussi dans ces cellules. En plus, cette étude a également révélé que dans les cellules résistantes à l'effet de l'ATRA, l'expression de SERCA3 n'est pas modifiée.

Les auteurs ont également exploré les effets de la différenciation, vers le phénotype monocytaire/macrophagique, sur l'expression des enzymes de type SERCA. Les cellules HL-60 possèdent un double potentiel de différenciation. L'ATRA induit leur différenciation granulocytaire, tandis que l'ester de phorbol (PMA) déclenche leur différenciation vers la voie monocytaire/macrophage. Lors du traitement au PMA de ces cellules, l'expression de SERCA3 et SERCA2 est simultanément augmentée.

Des traitements cytodifférenciateurs en présence ou en absence d'inhibiteurs spécifiques des pompes de type SERCA ont été effectués dans les lignées NB4 et HL-60. Ainsi, il a été montré que la thapsigargine, le CPA et le tBHQ, trois inhibiteurs des enzymes de type SERCA, augmentent de façon significative l'effet cytodifférenciateur de l'ATRA [125]. De plus, le double traitement par l'ATRA et les inhibiteurs des SERCAs de plusieurs lignées

dérivées de NB4 résistantes à l'effet cytodifférenciateur de l'ATRA (en traitement seul) a aboli cette résistance et a conduit à l'induction de la différenciation des cellules [125]. La potentialisation de l'effet de l'ATRA par l'inhibition des enzymes de type SERCA, montre qu'il existe une interconnexion fonctionnelle entre la signalisation de l'ATRA et la séquestration de calcium dans le RE, dans les cellules myéloïdes malignes.

2. Cancer du côlon

La différenciation des cellules de cancer du côlon peut être induite *in vitro* par un traitement avec des acides gras à chaîne courte tel que le butyrate. Après ce traitement, la prolifération cellulaire est inhibée. Notre équipe a préalablement montré que le traitement des lignées cellulaires issues de cancers du côlon, ou de l'estomac, par le butyrate et d'autres acides gras à chaîne courte (propionate, valérate, valproate, phénylbutyrate, etc.) induit l'expression de SERCA3. Cette induction est observée dans les lignées dépourvues de cette enzyme avant traitement, mais également dans des lignées exprimant SERCA3 à l'état non traité. Ces résultats montrent qu'il y a un changement dans le rapport d'expression SERCA2/SERCA3 au cours de la différenciation. Ces résultats ont pu être obtenus également dans des cellules de cancer de colon fraîchement isolées directement de tumeurs reséquées.

La lignée Caco-2 est une lignée de cancer colique qui peut se différencier en post-confluence (5-10 jours de culture post-confluence.) ; cette différenciation est détectable avec des marqueurs (DPP-IV, CEA, ZO-1) et des fonctions typiques de l'épithélium normal différencié, transport trans-cellulaire, et morphologiques (bordure en brosse, jonctions serrées, mucosécrétion). Avant différenciation (pré-confluence), ces cellules exprimaient seulement SERCA2. Après différenciation, il y a apparition de SERCA3 à la même cinétique que les autres marqueurs de différenciation.

3. Adénocarcinomes bronchiques

L'expression de SERCA3 augmente au cours de la différenciation induite par les acides gras à chaîne courte dans toutes les lignées d'adénocarcinomes bronchiques étudiées. L'induction sélective de l'expression de SERCA3 a été également retrouvée par notre équipe au cours de la différenciation spontanée des cellules de la lignée Calu-3 en culture post-confluente, et cette induction a pu être stimulée encore plus fortement par des traitements par des acides gras à chaîne courte sur cultures post-confluentes (figure 21).

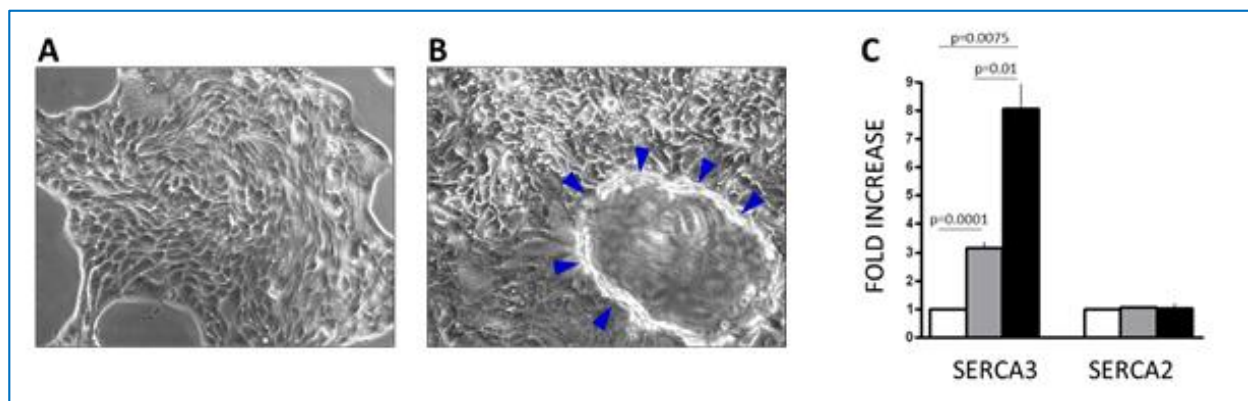


Figure 18 : Induction de l'expression de SERCA3 au cours de la différenciation de la lignée Calu-3 en culture post-confluente, suivi d'une stimulation par les acides gras à chaîne courte

Barres blanches : cellules non traitées pré-confluentes ; barres grises : cellules non traitées post-confluentes ; barres noires : post-confluentes, les cellules sont traitées au phénylbutyrate.

L'étude de l'expression des SERCAs dans tous ces modèles a montré que : 1) il y a perte de l'expression de SERCA3 dans les tumeurs, alors que les tissus normaux l'expriment abondamment, 2) il existe une interconnexion fonctionnelle entre l'activité des SERCAs et l'induction de la différenciation cellulaire, et 3) SERCA3 est ré-exprimée au cours de la différenciation pharmaco-induite dans les cellules tumorales.

En conclusion, l'ensemble des travaux réalisés sur différents types cellulaires et différents cancers ont mis en évidence que :

- Certains types d'épithéliums expriment SERCA3 à l'état différencié, suggérant que SERCA3 est requise pour les fonctions effectrices de ces cellules matures (absorption, sécrétion, réponses aux régulateurs extracellulaires...).
- Une perte d'expression de SERCA3 dans les tumeurs (*in vitro* et aussi *in situ*), probablement à cause de la perte des fonctions spécialisées.
- SERCA3 est de nouveau exprimé au cours de la différenciation « forcée » des cellules tumorales.

V. Les objectifs

L'importance des enzymes de type SERCA dans le fonctionnement cellulaire a été montrée par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques. En effet, plusieurs études ont montré que les inhibiteurs des pompes SERCA sont capables, en fonction du type cellulaire étudié, de déclencher la différenciation, l'arrêt de la prolifération cellulaire ou l'apoptose.

Les travaux antérieurs de notre équipe ont démontré une altération de l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique, dans les cellules de leucémie promyélocytaire aigüe, le cancer du côlon, ainsi que, le cancer du poumon. Dans ces différents cancers il y a un défaut d'expression des pompes de type SERCA3. Notre équipe a également mis en évidence la modification de l'expression des pompes SERCAs et notamment l'augmentation de l'expression de SERCA3 au cours de l'induction de la différenciation par des traitements pharmacologiques dans ces modèles.

Compte tenu de l'expression finement régulée des SERCAs au cours de la différenciation cellulaire et de ses fonctions différentielles dans l'homéostasie calcique, au cours de ce travail de thèse nous avons recherché le profil d'expression des SERCAs dans deux pathologies néoplasiques dans lesquelles les enzymes de type SERCA n'ont pas encore été étudiées : les tumeurs du plexus choroïde et la leucémie aigüe lymphoblastique (LAL).

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'expression des SERCAs dans l'épithélium du plexus choroïde normal et dans ses lésions néoplasiques bénignes et malignes (Article I). Les tumeurs du plexus choroïde (PC) sont rares et il n'existe pas beaucoup de données pour les différencier de l'hyperplasie, notre étude devrait permettre d'avoir un élément diagnostique pour reconnaître ces différentes lésions.

Nous avons ensuite poursuivi notre travail par l'étude de la différenciation précoce des cellules leucémiques du lignage lymphoïde B (Article II). Le blocage de ces blastes à un stade très précoce de la différenciation a fait de cette leucémie un bon modèle pour étudier, les mécanismes de différenciation pharmaco-induite des cellules B immatures et les effets sur les modifications phénotypiques associées, ainsi que les changements de l'homéostasie calcique qui peuvent avoir lieu au cours de la différenciation B.

Les objectifs de ce travail ont été de :

- Déterminer le profil d'expression des pompes calciques de type SERCAs dans l'épithélium du plexus choroïde normal, hyperplasie et tumoral, ainsi que dans les lymphocytes B leucémiques, afin de proposer SERCA comme marqueur de différenciation dont l'expression est défectueuse dans les cancers.
- Caractériser la régulation de l'expression des SERCAs au cours de la différenciation cellulaire.
- Etudier les possibilités de l'induction pharmacologique de la différenciation comme approche thérapeutique potentiel pour LAL du lignage B et ses interconnexions avec l'homéostasie calcique.

RESULTATS

Article I : Perte de l'expression de pompe calcique SERCA3 dans le plexus choroïde et ses tumeurs

Dans cette première partie de mon travail de thèse, j'ai étudié l'expression de SERCA3 dans l'épithélium du plexus choroïde humain normal, hyperplasique et tumoral. Les plexus choroïdes sont des structures localisées au niveau des ventricules cérébraux [126]. Ils sont recouverts d'une monocouche de cellules épithéliales. L'épithélium choroïdien est hautement spécialisé avec un ensemble important de protéines de transport. Bien que les phénomènes de transports transcellulaire ont été étudié (transport trans-cellulaire d'ions, eau, nutriments, vitamines et autres), le transport intracellulaire de calcium et son stockage dans les organelles étaient très peu connu avant nos travaux.

Le PC a pour principale fonction la sécrétion du liquide céphalo-rachidien (LCR), dans lequel baignent le cerveau et la moelle épinière. Il a un rôle important dans l'homéostasie cérébrale puisque la circulation du LCR permet non seulement l'apport de nutriments mais également le filtrage des déchets métaboliques [127]. Le système PC/LCR offre au cerveau une protection physique et un support mécanique essentiels et indispensables.

Les tumeurs du plexus choroïde font partie des tumeurs cérébrales rares. Elles sont essentiellement retrouvées chez l'enfant, avec une fréquence élevée dans les deux premières années de la vie. Ce sont des tumeurs intraventriculaires développées aux dépens du plexus choroïde. Selon la classification de l'OMS des tumeurs du système nerveux, elles sont classées en trois catégories : les papillomes de grade I (tumeurs bénignes avec une activité mitotique très basse) ; les papillomes atypiques de grade II (tumeurs de malignité incertaine avec une activité mitotique plus élevée) ; et les carcinomes de grade III (tumeurs malignes) [128]. Ces tumeurs entraînent un blocage de l'écoulement du LCR et se manifestent par une hypertension intracrânienne, hydrocéphalie ou augmentation du périmètre crânien chez le jeune enfant [129]. De plus, les lésions malignes présentent une croissance invasive et peuvent former des métastases. Des lésions hyperplasiques peuvent également survenir dans le plexus choroïde. Elles se caractérisent par un élargissement symétrique de l'ensemble du plexus choroïde et une surabondance d'épithélium, ce qui induit une hyperproduction du LCR et une hydrocéphalie [128].

La distinction entre papillome de grade I et l'hyperplasie est souvent problématique, puisque ces lésions se ressemblent histologiquement. Cependant, leur distinction est essentielle puisqu'elle détermine l'approche chirurgicale (exérèse complète pour les adénomes et ablation partielle pour l'hyperplasie). Actuellement, l'histologie est le facteur de pronostic le plus important [129].

Pour réaliser cette étude nous avons obtenu des échantillons du plexus choroïde normal, tumoral ou hyperplasique et nous avons réalisé des marquages immunohistochimiques pour SERCA3. Nos résultats montrent que SERCA3 est abondamment exprimée dans l'épithélium du plexus choroïde normal, et que son expression est fortement diminuée dans ses tumeurs, alors que son expression dans l'hyperplasiques est similaire à celle observée dans le tissu normal. Ces résultats indiquent que l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique subit des changements importants au cours de la tumorigenèse dans ce tissu. De plus, nous avons montré que l'expression de SERCA3 est fortement augmentée au cours de la différenciation des cellules primaires épithéliales normales du PC, induite pharmacologiquement *in vitro*.

L'ensemble de ces observations montre que SERCA3 pourrait être un nouveau marqueur immunophénotypique « par défaut d'expression » pour les tumeurs du plexus choroïde, pouvant également permettre de distinguer les lésions hyperplasiques des papillomes.

Loss of endoplasmic reticulum calcium pump expression in choroid plexus tumours

L. Ait-Ghezali*†, A. Arbabian‡, A. Jeibmann§, M. Hasselblatt§, G. G. Hallaert¶, C. Van den Broecke**, F. Gray††, J. P. Brouland††, N. Varin-Blank*† and B. Papp*†

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR U978, Bobigny, †Université Paris-13, PRES Sorbonne Paris-Cité, Bobigny, ‡UMR 168 CNRS, Institut Curie, Paris, ††AP-HP, Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Lariboisière, Paris, France, §Institute of Neuropathology, University Hospital Münster, Münster, Germany, ¶Department of Neurosurgery, Ghent University Hospital, Ghent, and **Department of Pathology, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium

L. Ait-Ghezali, A. Arbabian, A. Jeibmann, M. Hasselblatt, G. G. Hallaert, C. Van den Broecke, F. Gray, J. P. Brouland, N. Varin-Blank and B. Papp (2014) *Neuropathology and Applied Neurobiology* 40, 726–735

Loss of endoplasmic reticulum calcium pump expression in choroid plexus tumours

Aims: Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase-type calcium pumps (SERCA enzymes) control cell activation by sequestering calcium ions from the cytosol into the endoplasmic reticulum. Although endoplasmic reticulum calcium signalling plays an important role in the regulation of choroid plexus epithelial function, SERCA expression in the choroid plexus has not been investigated so far.

Methods: In this work we investigated the expression of the SERCA3-type calcium pump in choroid plexus epithelial cells grown *in vitro*, and in normal and hyperplastic choroid plexus tissue, in choroid plexus papillomas displaying various degrees of atypia, and in choroid plexus carcinoma by immunohistochemistry *in situ*. **Results:** Whereas normal choroid plexus epithelial cells express SERCA3 abundantly, SERCA3 expression is strongly decreased in

papillomas, and is absent in choroid plexus carcinoma, while expression in hyperplastic epithelium is high, similarly to normal epithelium. SERCA3 expression was detected also in normal primary choroid plexus epithelial cells grown *in vitro*, and expression was markedly enhanced by short-chain fatty acid-type cell differentiation inducing agents, including valproate. **Conclusion:** These observations show that SERCA3 is a new phenotypic marker of normal choroid plexus epithelial differentiation, and that SERCA3 constitutes an early tumour marker 'by loss of expression' in the choroid plexus that may be useful to distinguish hyperplastic processes from papillomas. Endoplasmic reticulum calcium homeostasis becomes anomalous, due to loss of SERCA3 expression, already in benign neoplastic lesions of the choroid plexus epithelium.

Keywords: calcium, carcinoma, choroid plexus, endoplasmic reticulum, hyperplasia, papilloma, SERCA

Introduction

The choroid plexus accomplishes highly regulated homeostatic transport functions involved in the elaboration of cerebrospinal fluid. Water, ions, selected small molecules

and micronutrients are transported by the choroid plexus epithelium towards the ventricular space by a complex set of channel, transport ATPase, cotransporter and exchanger proteins expressed by choroid plexus epithelial cells, and these cells also synthesize and release growth factors, neurotrophins and other proteins into the cerebrospinal fluid [1,2]. In addition, metabolites or xenobiotics are actively taken up by the choroid plexus epithelium from the central nervous system and transported towards the

Correspondence: Bela Papp, UMR U978 Inserm, SMBH, Université Paris-13, 74, rue Marcel Cachin, Bobigny, 93017 France. Tel: +33(0)6 8608 8309; Fax: +33(0)1 4838 7369; E-mail: belapapp2@yahoo.fr

bloodstream [3]. Transport mechanisms of the choroid plexus are essential for normal brain homeostasis, metabolism and function.

The normal choroid epithelium consists of a monolayer of simple cuboidal epithelial cells of uniform size with a centrally located round nucleus [1–4]. Cells in adults often display a perinuclear vacuole. Ultrastructurally, the cells contain abundant mitochondria, Golgi apparatus and endoplasmic reticulum (ER), as well as apical microvilli and basolateral plasma membrane convolutions involved in solute uptake, secretion and active vectorial transport [1–3].

Neoplastic lesions of the choroid plexus epithelium can display various degrees of malignancy [5]. Choroid plexus papillomas are WHO grade I benign papillary lesions with a low proliferation rate. Similar to normal choroid epithelium, fine fibrovascular fronds are covered by a single layer of cuboidal epithelial cells. However, compared with normal tissue, the papillary structure tends to be complex and denser than normal epithelium, often with more elongated cells in a crowded configuration. Focal blurring of the papillary growth pattern, higher cellularity and nuclear pleomorphism may be rarely present [5]. Atypical choroid papillomas, defined by increased mitotic rate, are tumours of intermediate malignancy (WHO grade II) [6,7]. Choroid plexus carcinomas are frankly malignant, WHO grade III invasive tumours with frequent mitoses, nuclear pleomorphism, increased cell density, blurring or loss of the papillary pattern and necrotic areas [5,8].

Choroid plexus hyperplasia, a rare, non-neoplastic process in newborns or infants is characterized by the symmetrical enlargement of the entire choroid plexus without a localized mass, leading to enhanced cerebrospinal fluid production and hydrocephalus [9]. The choroid plexus cells in hyperplasia appear histologically normal without mitoses or atypical cells, and there is no regrowth upon long-term follow-up after partial surgical ablation of the lesion [9].

Cellular calcium homeostasis and signalling play important roles in the control of various cellular effector functions such as neuronal activation, or various types of epithelial fluid secretion and transcellular solute transport [10,11]. In addition, calcium signalling is also involved in the regulation, via protein kinase C (PKC), calcineurin or CaM-kinases, of transcription factors such as nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), nuclear factor of activated T cells (NFAT), activator protein 1 (AP1) or cAMP response-element binding

protein (CREB), that play essential roles in the control of cell growth and differentiation [12–14].

Calcium-dependent cell activation is initiated by inositol-1,4,5-trisphosphate-induced release of calcium ions from the ER into the cytosol [15,16]. This is followed by calcium influx from the extracellular medium, induced by ER calcium depletion (capacitative calcium influx) [17,18]. Active calcium accumulation into the ER is performed by Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases (SERCA enzymes) [19]. By using the energy of ATP hydrolysis these enzymes actively sequester calcium from the cytosol into the ER lumen [20]. Because calcium release from the ER, as well as capacitative calcium influx are critically dependent on ER calcium content, SERCA activity constitutes a unique control mechanism of cell activation [21,22]. In addition, intra-ER calcium is involved also in the maturation of newly synthesized proteins transiting through the organelle, because ER chaperones such as calreticulin or calnexin require calcium ions for function [23,24]. Proper calcium homeostasis in the ER is therefore indispensable not only for calcium-dependent cell activation, but also for protein secretion and for the synthesis and targeting of proteins located in the plasma membrane [16,25,26].

SERCA proteins are coded by three genes (ATP2A1, 2 and 3) that by alternative splicing give rise to several isoforms [19,27,28]. SERCA expression is tissue-specific and developmentally regulated. Whereas SERCA1a and 1b isoenzymes are expressed in adult and neonatal skeletal muscle, respectively, the SERCA2a isoform is found in cardiac muscle [28]. Whereas SERCA2c, a minor isoform has been found in various cell types [29], the SERCA2b isoform is expressed ubiquitously, and is considered a 'housekeeping' enzyme [30].

Interestingly, SERCA2b is coexpressed with SERCA3 in a selected set of cell types such as platelets and other cells of haematopoietic origin, vascular endothelial cells, gastrointestinal and bronchial epithelium, β -cells of islets of Langerhans, or Purkinje neurones of cerebellum [31–40]. As the biochemical characteristics, such as calcium affinity, of SERCA2b and SERCA3 isoenzymes are distinct [41–43], coexpression of SERCA2b and SERCA3 is believed to be important for the fine-tuning of ER calcium homeostasis of various fully differentiated cell types that accomplish specific, highly specialized function [21,22,44–46].

Investigation of SERCA expression in tumours indicates that SERCA3 expression is often decreased or lost in

tumours when compared with the corresponding normal tissue [47–49]. This has been observed in gastric and colon tumours [40,50], breast acinar epithelium [51], as well as myeloid leukaemia [52,53]. Moreover SERCA3 expression in various colon [40,50], lung [36] and gastric [40] carcinoma, myeloid leukaemia cell lines [38,52,53] and primary tumour cells [38,40] can be selectively induced *in vitro* by the experimental induction of cell differentiation by various agents such as short-chain fatty acid-type histone deacetylase inhibitors, phorbol esters or retinoids.

The choroid plexus epithelium is a highly specialized tissue with a unique and sophisticated set of transporter proteins. Although transcellular transport mechanisms have been studied in great detail in the choroid plexus [54–59], our knowledge about intracellular calcium transport and storage is much more limited in this tissue. In this work we investigated SERCA3 protein expression in normal and hyperplastic human choroid plexus epithelium and in benign, as well as malignant choroid plexus tumours *in situ* by immunohistochemistry, and investigated SERCA expression in primary normal choroid plexus epithelial cells grown *in vitro*. Our results show that SERCA3 is abundantly expressed in normal choroid plexus epithelium, and expression is strongly down-regulated in choroid plexus tumours, indicating that ER calcium homeostasis undergoes significant changes during tumorigenesis in this tissue.

Materials and methods

Tissue analysis

A total of 22 normal, 11 WHO grade I papilloma, 9 WHO grade II papilloma and 8 choroid plexus carcinoma samples (WHO grade III), obtained from distinct individual cases were investigated. Tissue collection and routine histological analysis according to the criteria of the WHO classification of tumours of the nervous system [60] were done as described earlier [61]. The case of the hyperplastic choroid plexus tissue studied in this work has been described earlier [9]. Permission for collection and scientific use of choroid plexus tumour samples had been obtained from the local ethical committees (2007-20420-f-S, Münster, CPP IDF4 N°2013-36NI, Paris).

Immunostaining for SERCA3 expression with the 2H3 mouse monoclonal antibody (IgG2akappa, H00000489-

M01, Abnova) purchased from Tebu-bio (le Perray-en-Yvelines, France) was performed on deparaffinized formalin fixed sections using an indirect avidin-biotin-peroxydase method and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as chromogene, using an automated immunostainer system (Benchmark®, Ventana Medical Systems, Illkirch, France) as described earlier [36,50,51]. Inhibition of endogenous peroxydase activity was performed by incubation with 3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline for 10 min, and blocking of endogenous biotin in the samples was done with the Biotin Blocking Kit (#760-050) of Ventana, according to the instructions of the manufacturer. Antigen retrieval was performed using a *tris*-hydroxymethyl-aminomethane-based antigen retrieval reagent (Ventana CC1 cell conditioning solution) at 95–100°C for 30 min. Incubation with the SERCA3-specific antibody (3 µg/ml) in Dako Real® antibody diluting reagent was done at 37°C for 30 min, and labelling was revealed using the Ventana iVIEW DAB Detection Kit with copper enhancement according to the instructions of the manufacturer. Slides were counterstained with haematoxylin and bluing reagent (Ventana), and SERCA3 labelling was evaluated semi-quantitatively using a four-tiered scoring system (0 to 3+). Control experiments were performed in identical conditions using isotype-matched irrelevant antibody at the same concentration, and these gave no staining. Staining intensity of the various tumour types is expressed as the mean (m) ± SEM.

In immunostaining experiments normal choroid samples were always included along with the neoplastic samples as an external positive control. In addition, vascular endothelial cells, lymphocytes or platelets that express SERCA3 abundantly, present in the neoplastic samples served as an internal positive control. Individual tissue samples were stained on average thrice in independent experiments using a total of 51 separate sectioned specimens, and average staining intensity was calculated for each sample. A total number of 153 slides were stained for SERCA3 in this study.

In additional experiments SERCA3 staining was also done manually with the ImmPress™ anti-mouse Reagent kit (#MP-7402) and DAB substrate of Vector Laboratories (purchased from CliniSciences s.a.s. Nanterre, France) according to the instructions of the manufacturer, following peroxidase inhibition and antigen retrieval as above. Staining with this avidin-biotin-free detection system gave identical results.

Cell culture and treatments

Human primary choroid plexus epithelial cells and complete epithelial culture medium (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA, USA) were purchased from CliniScience (Nanterre, France). Cells were grown in polylysine-coated cell culture grade Petri dishes according to the instructions of the manufacturer, and were used at the first or second passage after thawing. Five days after reaching confluence, medium was renewed and drugs were added to the cells from concentrated stock solutions exactly as in [36]. Treatments with PBS vehicle alone were included in control experiments.

Electrophoresis and Western blotting

Sample preparation, electrophoresis, transfer, Ponceau red staining of blots and densitometry, as well as immunoblotting were done exactly as described earlier [36,40,50]. Briefly, after treatments, cells were washed and precipitated with ice-cold 5% trichloroacetic acid and centrifuged. The obtained total cellular protein pellet was then dissolved in modified Laemmli-type electrophoresis sample buffer, and equal amounts of protein lysates were run in 8% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Equal loading of samples and homogeneous transfer of proteins were controlled by Ponceau red staining of blots and densitometry with the ScionImage software (Scion Corporation, <http://www.scioncorp.com>). Blots were thereafter incubated with the PLIM430 SERCA3-, and the IID8 (BioMol, Plymouth Meeting PA) SERCA2-specific monoclonal antibodies, and signal was revealed with the ECL Enhanced Chemiluminescence reagent of Amersham as described earlier in detail [36,40,50], using a Bio-Rad ChemiDoc MP phosphoimager and the Image Lab 4.0 software.

Statistical analysis

Statistical analysis of SERCA3 expression was performed by Student's unpaired t-test and Kruskal-Wallis analysis using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA (<http://www.graphpad.com>).

Results

Immunohistochemistry with the SERCA3-specific 2H3 monoclonal antibody in normal choroid plexus leads to a

strong and uniform labelling of the epithelial cells in the cytosol in a finely granular pattern, corresponding to the location of SERCA3 in the ER (Figure 1, Photographs 1 and 2). Identical staining was obtained on choroid plexus tissue obtained from different anatomical locations (lateral, third and fourth ventricles), and adjacent ependymal cells were negative (not shown). In sharp contrast with normal epithelium, SERCA3 staining in WHO grade I (Photographs 4–6) and WHO grade II papillomas (Photographs 7–9) was strongly decreased in most cases, and labelling was almost lost in choroid plexus carcinomas (Photographs 10–12). The loss of SERCA3 staining in neoplastic samples was homogeneous; regions within a given lesion with significantly different staining intensities were not apparent. Interestingly, in contrast with papillomas, SERCA3 labelling in choroid plexus hyperplasia tissue (Photograph 3) was strong (3+) in the epithelial cells, and was in fact indistinguishable from that observed in normal epithelium. Staining for SERCA3 expression in endothelial cells, lymphocytes or platelet aggregates present in normal or tumoural tissue was positive.

As shown in Figure 2, the loss of SERCA3 expression between normal epithelium ($m = 2.872 \pm 0.046$, $n = 22$) and either WHO grade I ($m = 0.72 \pm 0.182$, $n = 11$) or WHO grade II papilloma ($m = 0.542 \pm 0.126$, $n = 9$) or carcinoma ($m = 0.203 \pm 0.045$, $n = 8$) was, in all instances, highly significant ($P < 0.0001$). In addition, although SERCA3 expression in grade I and grade II papillomas did not differ significantly ($P = 0.22$), the difference of expression reached significance when carcinoma was compared (i) with grade I papilloma ($P = 0.0124$), (ii) with grade II papilloma ($P = 0.015$), or (iii) with grade I and II papilloma as a group ($P = 0.0109$).

SERCA expression in choroid plexus epithelial cells was explored by Western blotting in primary purified normal human choroid epithelial cells cultured *in vitro*, in the absence or the presence of various short-chain fatty acids such as butyrate, phenylbutyrate or valproate (3 mM) for 5 days. Short-chain fatty acids are known cell differentiation inducing agents. As shown in Figure 3, untreated cells (lane 1) expressed simultaneously SERCA2 (as detected by the IID8 antibody; lower immunoblot) and SERCA3 (as detected by the PLIM430 antibody; upper immunoblot) ER calcium pumps. Importantly, treatment of the cells with valproate (lane 2), phenylbutyrate (lane 3) or butyrate (lane 4) led to a marked and selective up-regulation of SERCA3 expression, whereas the expression of SERCA2, a ubiquitously expressed SERCA

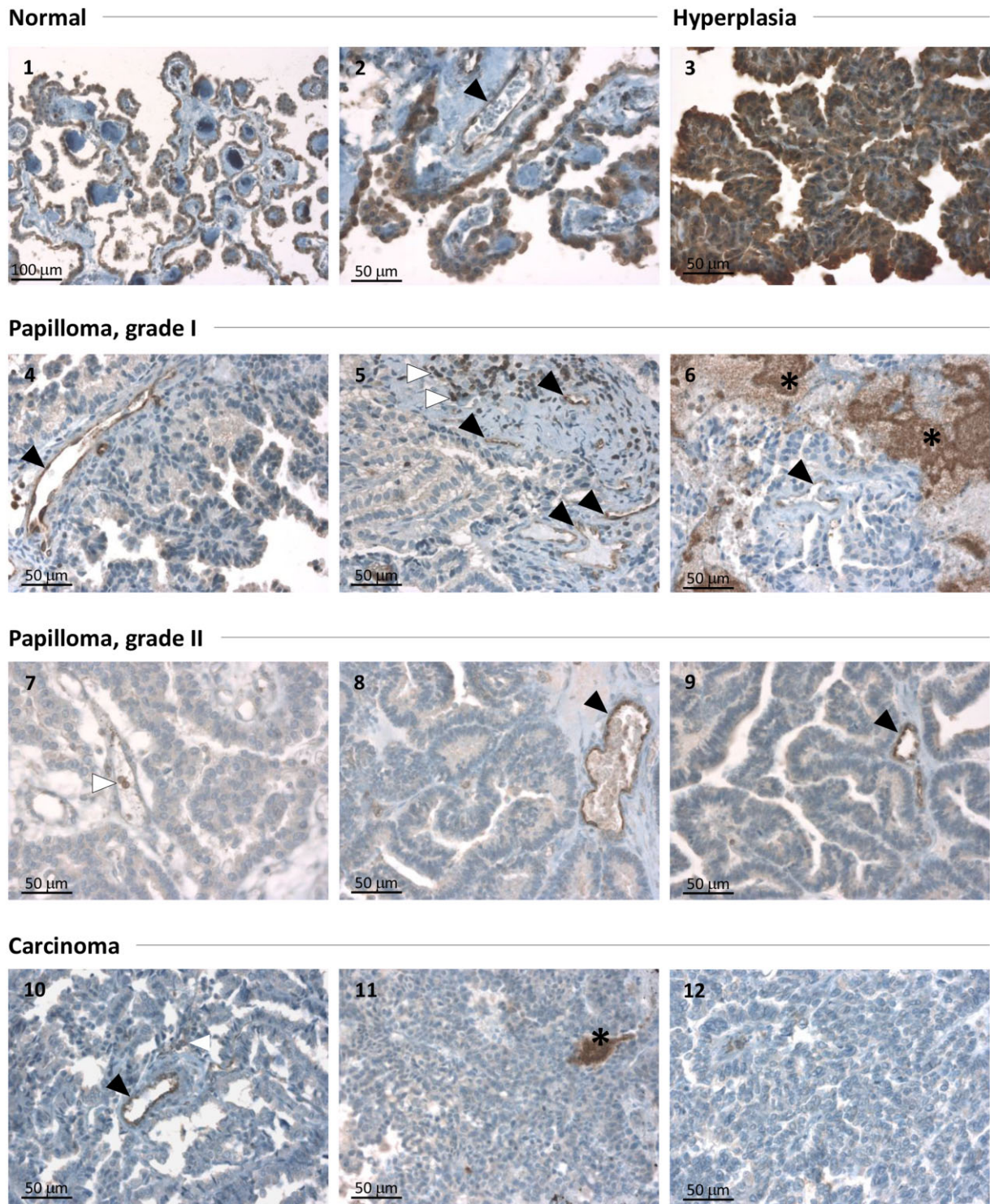


Figure 1. Expression of SERCA3 protein in choroid plexus tissue. Expression of SERCA3 in normal choroid epithelium, in benign and malignant choroid plexus tumours and in choroid plexus hyperplasia tissue studied by immunohistochemistry with the 2H3 SERCA3-specific monoclonal antibody. Normal (Photographs 1 and 2), as well as hyperplastic epithelium (Photograph 3) express SERCA3 abundantly, whereas staining is strongly decreased or lost in WHO grade I (Photographs 4–6) and grade II (Photographs 7–9) adenomas and in carcinomas (Photographs 10–12). Endothelial cells (black arrowheads), lymphocytes (white arrowheads), as well as platelet aggregates (asterisks) are stained for SERCA3 in normal, as well as tumoural tissue.

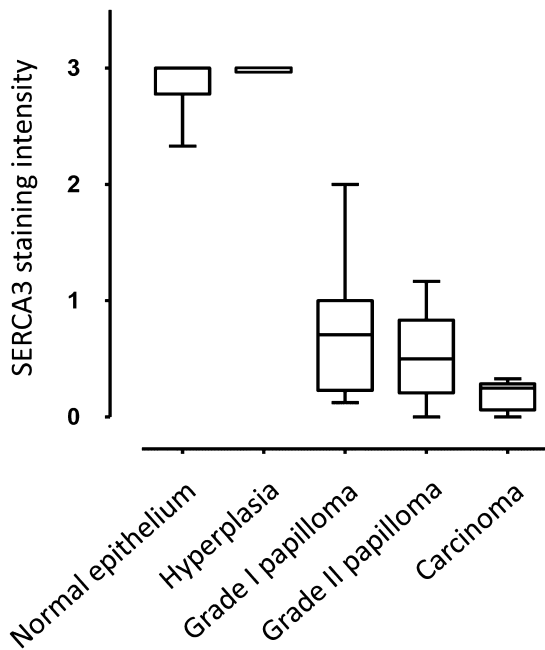


Figure 2. Statistical analysis of SERCA3 expression in choroid plexus and its lesions. Box plots show median. The decrease of SERCA3 expression between normal epithelium ($m = 2.872 \pm 0.046$, $n = 22$) and grade I ($m = 0.721 \pm 0.182$, $n = 11$) or grade II papillomas (0.542 ± 0.126 , $n = 9$) or carcinoma (0.203 ± 0.045 , $n = 8$) is highly significant ($P < 0.0001$), and a statistically significant further decrease ($P < 0.05$) is observed between grade I or grade II papillomas and choroid plexus carcinoma ($m = 0.203 \pm 0.045$, $n = 8$). In contrast with tumours, staining intensity in hyperplasia ($n = 1$) is similar to that observed in normal epithelium.

gene, was not modified, or was slightly decreased by the treatments.

Discussion

The observations presented in this work show that (i) SERCA3 protein is abundantly expressed in normal choroid plexus epithelium, (ii) SERCA3 expression strongly decreases already in WHO grade I benign choroid plexus papillomas and thereafter remains low or undetectable in higher grade lesions (atypical choroid plexus papillomas and carcinomas), whereas expression is high in hyperplasia, and (iii) SERCA3 is expressed in normal choroid plexus epithelial cells cultured *in vitro*, and expression is further enhanced in these cells by differentiation-inducing agents such as short-chain fatty acids and analogues including valproate.

Whereas SERCA2b, the house-keeping SERCA isoform is expressed ubiquitously, SERCA3 expression is restricted to

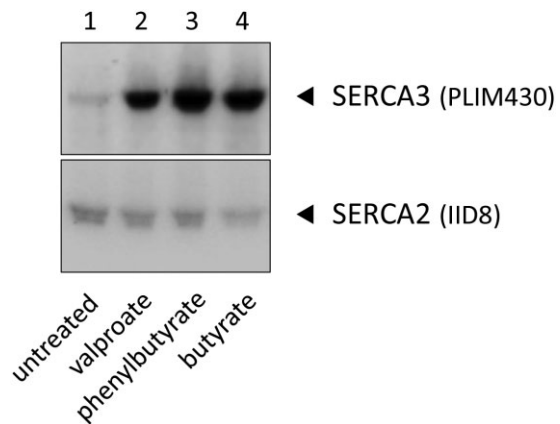


Figure 3. Induction of SERCA3 expression in normal primary choroid plexus epithelial cells by short-chain fatty acids *in vitro*. Equal amounts of total cellular protein lysates were submitted to electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes and analysed by Western immunoblotting. Expression of SERCA3 (upper immunoblot) and of SERCA2 (lower immunoblot) in untreated cells (lane 1) and in cells treated with 3 mM valproate (lane 2), phenylbutyrate (lane 3) or butyrate (lane 4) for 5 days, detected with the PLIM430 and the IID8 monoclonal antibodies respectively. Whereas both SERCA3 and SERCA2 are detected in untreated cells, the expression of SERCA3 is selectively induced by the treatments.

a selected set of highly specialized cell types such as T and B lymphocytes, platelets, neutrophil granulocytes, gastric and colon epithelial cells, as well as bronchial and mammary epithelium [31,32,36–38,40,47,51,52]. In addition, in these cells SERCA3 expression is highly correlated with the state of differentiation of the cells, with high SERCA3 levels in fully differentiated normal cells, and a progressive loss of SERCA3 expression during tumorigenesis. In particular, in colon epithelium, as well as in breast acinar epithelial cells which both express SERCA3 abundantly, SERCA3 expression decreases already in early, nonmalignant neoplastic lesions such as adenomas, and then remains low or undetectable in more advanced or malignant tumours [50,51]. In addition, when lung, colon and gastric carcinoma or myeloid leukaemia cell lines are treated *in vitro* with various differentiation-inducing agents such as retinoids, phorbol esters or short-chain fatty acids (butyrate, valerate) or synthetic analogues (phenylbutyrate, valproate), the expression of SERCA3 is induced, similarly to other established markers of cell differentiation [36,40,50,52], whereas SERCA2 expression is decreased, or is not modified significantly. When taken together with these observations, data presented in this work indicate that similarly to other specialized tissues in

which SERCA3 is expressed in the normal, differentiated state, SERCA3 constitutes a new phenotypic marker also of fully differentiated normal choroid plexus epithelium, and is a tumour marker 'by loss of expression' in this tissue.

Interestingly, in contrast with choroid plexus papilloma, the level of SERCA3 expression in hyperplastic choroid plexus epithelial cells was high, and was in fact indistinguishable from that observed in normal choroid plexus epithelium. This is reminiscent of SERCA3 expression in the colon, where hyperplastic polyps of Morson express high levels of SERCA3, whereas SERCA3 expression in adenomas is decreased [50]. The distinct SERCA3 expression pattern in hyperplastic choroid plexus epithelium when compared with adenoma underscores that adenomatous and hyperplastic cells are different regarding their calcium signalling. This is in accordance with morphological as well as functional differences known to exist between these two types of lesions, and suggests that SERCA3 immunohistochemistry may prove useful to distinguish hyperplastic lesions of the choroid plexus from adenomas.

SERCA3 staining may also help distinguish choroid plexus tumours from normal choroid plexus due to the loss of SERCA3 expression in tumours. Interestingly, it has been shown earlier that choroid plexus papillomas often express significant amounts of the EAAT-1 excitatory amino-acid transporter, whereas its expression in normal choroid plexus epithelium is mostly absent [62]. Thus, identification of an EAAT-1 positive, SERCA3-negative (neoplastic) phenotype when compared with EAAT-1 negative, SERCA3 positive normal epithelium may prove particularly useful for the identification of adenomas.

The functional consequences of the loss of SERCA3 expression have been studied in various epithelial cell types and in various cell lines of haematopoietic origin. In addition, the comparative biochemical characterization of SERCA3 and the ubiquitous SERCA2b isoforms has been performed for the native, as well as the transfected enzymes [41,42,63,64]. These observations when taken together suggest that due to its lower calcium affinity, SERCA3 will accumulate calcium into the ER only at increased cytosolic calcium concentrations, such as those which occur during calcium transients induced by inositol-1,4,5-trisphosphate-mobilizing agents in activated cells, whereas basal 'tonic' calcium sequestration would be performed mainly by SERCA2b [19,28]. SERCA3 would thus blunt only high/maximal cytosolic calcium peaks, being more permissive at more moderate levels of

calcium-dependent cell activation. It is thus believed that the role of SERCA3 in a cell is to permit the appearance of larger calcium signals while at the same time limiting/attenuating excessive cytosolic calcium peaks in the cytosol [19,28]. SERCA3 may also be associated with ER regions specialized in calcium release due to the local abundance of calcium channels such as inositol-1,4,5-trisphosphate receptors [30,65], or with ER regions involved in the induction of capacitative calcium influx [66–68]. These characteristics render SERCA3 particularly well suited to function adequately in highly specialized cells that perform intense calcium signalling, such as fully differentiated choroid plexus epithelium.

When taken together with available brain transcriptome data [69] indicating high SERCA3 mRNA levels in choroid plexus tissue, our observations show that SERCA3 expression is part of the gene expression programme of mature choroid plexus epithelial cells. These observations shed light on a previously unknown level of complexity and specialization of intracellular calcium homeostasis of the choroid plexus epithelium, a feature lost in its tumours. Although the exact molecular mechanisms leading to the loss of SERCA3 protein in these lesions are currently unknown, the induction of SERCA3 mRNA and protein expression by cell differentiation-inducing treatments observed in various leukaemia and carcinoma cell lines [40,52] suggests that the loss of SERCA3 expression in tumours is due to altered transcriptional regulation that occurs in the context of inhibition of cell differentiation, a general phenomenon in tumours.

SERCA3 expression was also observed in primary normal choroid plexus epithelial cells grown *in vitro*, and expression could be markedly enhanced by cell differentiation inducing agents of the short-chain fatty acid-type. This is reminiscent of observations made previously on vascular endothelial cells. SERCA3 is highly expressed in fully differentiated quiescent endothelial cells *in situ*, and expression, which reversibly decreases during *in vitro* growth, is strongly increased upon differentiation induced by growth in Matrigel [33]. Induction of SERCA3 expression by short-chain fatty acids suggests that these agents can enhance choroid plexus epithelial differentiation. SERCA3 induction by valproate is particularly interesting because valproate is a neuropharmacological agent widely used in humans as an anti-epileptic and mood stabilizer [70]. Our observations suggest that valproate-induced effects on choroid plexus epithelium calcium homeostasis and differentiation may potentially have

some relevance regarding the pharmacological effects of this drug.

When taken together, data presented in this work place SERCA-dependent calcium transport into a developmentally, pharmacologically as well as histopathologically relevant context in the choroid plexus, and shed light on previously unknown complexities of the intracellular calcium homeostasis of this tissue. Our data show that ER calcium homeostasis is remodelled due to the loss of SERCA3 expression during tumorigenesis in choroid plexus epithelium. SERCA3 may therefore be a useful new marker for the study of normal differentiation, and may serve as a new tumour marker, by lack of expression, in this tissue.

Acknowledgements

We express special thanks to Prof. Neville Crawford (Department of Biochemistry, the Hunterian Institute, London, UK) for giving us the PLIM430 hybridoma, and thank Pr. Jacqueline Mikol, Pr. Anne Lavergne-Slove and Dr Marc Polivka (Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Lariboisière, Paris, France) for the support of our work. The excellent technical help of Mr Patrice Castagnet and Ms Agnès Macquet (Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Lariboisière, Paris, France) is gratefully acknowledged.

This work was supported by Inserm and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), France. This work is dedicated to the memory of Andrei Tarkovsky.

Author contributions

LAG, AA and BP performed and analysed experiments, AJ, MH, GGH, CVdB, FG, NV-B and JPB contributed vital material and performed histological analysis, and BP wrote the paper with the support and critical review of all authors. Authors declare no conflict of interest.

References

- Johanson CE, Stopa EG, McMillan PN. The blood-cerebrospinal fluid barrier: structure and functional significance. *Methods Mol Biol* 2011; **686**: 101–31
- Wolburg H, Paulus W. Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol (Berl)* 2010; **119**: 75–88
- Praetorius J. Water and solute secretion by the choroid plexus. *Pflugers Arch* 2007; **454**: 1–18
- Mills SE. *Histology for Pathologists*, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol (Berl)* 2007; **114**: 97–109
- Wrede B, Hasselblatt M, Peters O, Thall PF, Kutluk T, Moghrabi A, Mahajan A, Rutkowski S, Diez B, Wang X, Pietsch T, Kortmann RD, Paulus W, Jeibmann A, Wolff JE. Atypical choroid plexus papilloma: clinical experience in the CPT-SIOP-2000 study. *J Neurooncol* 2009; **95**: 383–92
- Jeibmann A, Hasselblatt M, Gerst J, Wrede B, Egensperger R, Beschorner R, Hans VH, Rickert CH, Wolff JE, Paulus W. Prognostic implications of atypical histologic features in choroid plexus papilloma. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006; **65**: 1069–73
- Gopal P, Parker JR, Debski R, Parker JC Jr. Choroid plexus carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2008; **132**: 1350–4
- Hallaert GG, Vanhauwaert DJ, Logghe K, Van den Broecke C, Baert E, Van Roost D, Caemaert J. Endoscopic coagulation of choroid plexus hyperplasia. *J Neurosurg Pediatr* 2012; **9**: 169–77
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; **1**: 11–21
- Berridge MJ. Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans* 2012; **40**: 297–309
- Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 1997; **386**: 855–8
- Dolmetsch RE, Xu K, Lewis RS. Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. *Nature* 1998; **392**: 933–6
- Macian F, Lopez-Rodriguez C, Rao A. Partners in transcription: NEAT and AP-1. *Oncogene* 2001; **20**: 2476–89
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1793**: 933–40
- Berridge MJ. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* 2002; **32**: 235–49
- Derler I, Schindl R, Fritsch R, Romanin C. Gating and permeation of Orai channels. *Front Biosci* 2012; **17**: 1304–22
- Soboloff J, Rothberg BS, Madesh M, Gill DL. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; **13**: 549–65
- Vandecaetsbeek I, Vangheluwe P, Raeymaekers L, Wuytack F, Vanoevelen J. The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; **3**: a004184
- Bublitz M, Musgaard M, Poulsen H, Thøgersen L, Olesen C, Schiøtt B, Morth JP, Møller JV, Nissen P. Ion pathways in the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *J Biol Chem* 2013; **288**: 10759–65

- 21 Bertram R, Arceo RC. A mathematical study of the differential effects of two SERCA isoforms on Ca^{2+} oscillations in pancreatic islets. *Bull Math Biol* 2008; **70**: 1251–71
- 22 Diederichs F. Ion homeostasis and the functional roles of SERCA reactions in stimulus-secretion coupling of the pancreatic beta-cell: a mathematical simulation. *Biophys Chem* 2008; **134**: 119–43
- 23 Araki K, Nagata K. Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; **3**: a007526
- 24 Coe H, Michalak M. Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Gen Physiol Biophysics* 2009; **28** Spec No Focus: F96–103
- 25 Bãnhegyí G, Baumeister P, Benedetti A, Dong D, Fu Y, Lee AS, Li J, Mao C, Margittai E, Ni M, Paschen W, Piccirella S, Senesi S, Sitia R, Wang M, Yang W. Endoplasmic reticulum stress. *Ann NY Acad Sci* 2007; **1113**: 58–71
- 26 Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 2009; **417**: 651–66
- 27 Bobe R, Bredoux R, Corvazier E, Lacabartz-Porret C, Martin V, Kovács T, Enouf J. How many Ca^{2+} -ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets. *Platelets* 2005; **16**: 133–50
- 28 Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 2007; **35**: 430–42
- 29 Gélébart P, Martin V, Enouf J, Papp B. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **303**: 676–84
- 30 Wuytack F, Raeymaekers L, Missiaen L. Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 2002; **32**: 279–305
- 31 Papp B, Enyedi A, Kovács T, Sarkadi B, Wuytack F, Thastrup O, Gàrdos G, Bredoux R, Levy-Toledano S, Enouf J. Demonstration of two forms of calcium pumps by thapsigargin inhibition and radioimmunoblotting in platelet membrane vesicles. *J Biol Chem* 1991; **266**: 14593–6
- 32 Papp B, Enyedi A, Pászty K, Kovács T, Sarkadi B, Gàrdos G, Magnier C, Wuytack F, Enouf J. Simultaneous presence of two distinct endoplasmic-reticulum-type calcium-pump isoforms in human cells. Characterization by radio-immunoblotting and inhibition by 2,5-di-(*t*-butyl)-1,4-benzohydroquinone. *Biochem J* 1992; **288** (Pt 1): 297–302
- 33 Mountian I, Manolopoulos VG, De Smedt H, Parys JB, Missiaen L, Wuytack F. Expression patterns of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms in vascular endothelial cells. *Cell Calcium* 1999; **25**: 371–80
- 34 Monteith GR, McAndrew D, Faddy HM, Roberts-Thomson SJ. Calcium and cancer: targeting Ca^{2+} transport. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**: 519–30
- 35 Baba-Aissa F, Raeymaekers L, Wuytack F, Callewaert G, Dode L, Missiaen L, Casteels R. Purkinje neurons express the SERCA3 isoform of the organellar type Ca^{2+} -transport ATPase. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; **41**: 169–74
- 36 Arbabian A, Brouland JP, Apàti A, Pászty K, Hegedűs L, Enyedi A, Chomienne C, Papp B. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J* 2013; **280**: 5408–18
- 37 Dellis O, Arbabian A, Brouland JP, Kovács T, Rowe M, Chomienne C, Joab I, Papp B. Modulation of B-cell endoplasmic reticulum calcium homeostasis by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1. *Mol Cancer* 2009; **8**: 59
- 38 Launay S, Bobe R, Lacabartz-Porret C, Bredoux R, Kovács T, Enouf J, Papp B. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during T lymphocyte activation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 10746–50
- 39 Wuytack F, Papp B, Verboomen H, Raeymaekers L, Dode L, Bobe R, Enouf J, Bokkala S, Authi KS, Casteels R. A sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 3-type Ca^{2+} pump is expressed in platelets, in lymphoid cells, and in mast cells. *J Biol Chem* 1994; **269**: 1410–16
- 40 Gélébart P, Kovács T, Brouland JP, van Gorp R, Grossmann J, Rivard N, Panis Y, Martin V, Bredoux R, Enouf J, Papp B. Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation. *J Biol Chem* 2002; **277**: 26310–20
- 41 Chandrasekera PC, Kargacin ME, Deans JP, Lytton J. Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase isoform SERCA3. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009; **296**: C1105–14
- 42 Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 1992; **267**: 14483–9
- 43 Poch E, Leach S, Snape S, Cacic T, MacLennan DH, Lytton J. Functional characterization of alternatively spliced human SERCA3 transcripts. *Am J Physiol* 1998; **275**: C1449–58
- 44 Arredouani A, Guiot Y, Jonas JC, Liu LH, Nenquin M, Pertusa JA, Rahier J, Rolland JF, Shull GE, Stevens M, Wuytack F, Henquin JC, Gilon P. SERCA3 ablation does not impair insulin secretion but suggests distinct roles of different sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps for Ca^{2+} homeostasis in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2002; **51**: 3245–53
- 45 Falcke M. Buffers and oscillations in intracellular Ca^{2+} dynamics. *Biophys J* 2003; **84**: 28–41
- 46 Juska A, Jardin I, Rosado JA. Physical properties of two types of calcium stores and SERCAs in human platelets. *Mol Cell Biochem* 2008; **311**: 9–18

- 47 Arbabian A, Brouland JP, Gélébart P, Kovács T, Bobe R, Enouf J, Papp B. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer. *Biofactors* 2011; **37**: 139–49
- 48 Papp B, Brouland JP, Gélébart P, Kovács T, Chomienne C. Endoplasmic reticulum calcium transport ATPase expression during differentiation of colon cancer and leukaemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **322**: 1223–36
- 49 Papp B, Brouland JP, Arbabian A, Gélébart P, Kovács T, Bobe R, Enouf J, Varin-Blank N, Apàti A. Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation. *Biomolecules* 2012; 165–86
- 50 Brouland JP, Gélébart P, Kovács T, Enouf J, Grossmann J, Papp B. The loss of sarco/endoplasmic reticulum calcium transport ATPase 3 expression is an early event during the multistep process of colon carcinogenesis. *Am J Pathol* 2005; **167**: 233–42
- 51 Papp B, Brouland JP. Altered endoplasmic reticulum calcium pump expression during breast tumorigenesis. *Breast Cancer (Auckl)* 2011; **5**: 163–74
- 52 Launay S, Gianni M, Kovács T, Bredoux R, Bruel A, Gélébart P, Zassadowski F, Chomienne C, Enouf J, Papp B. Lineage-specific modulation of calcium pump expression during myeloid differentiation. *Blood* 1999; **93**: 4395–405
- 53 Lacabartz-Porret C, Launay S, Corvazier E, Bredoux R, Papp B, Enouf J. Biogenesis of endoplasmic reticulum proteins involved in Ca²⁺ signalling during megakaryocytic differentiation: an *in vitro* study. *Biochem J* 2000; **350** (Pt 3): 723–34
- 54 Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 2005; **25**: 5–23
- 55 Borke JL, Caride AJ, Yaksh TL, Penniston JT, Kumar R. Cerebrospinal fluid calcium homeostasis: evidence for a plasma membrane Ca²⁺-pump in mammalian choroid plexus. *Brain Res* 1989; **489**: 355–60
- 56 Damkier HH, Brown PD, Praetorius J. Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. *Physiology (Bethesda)* 2010; **25**: 239–49
- 57 Eakin TJ, Antonelli MC, Malchiodi EL, Baskin DG, Stahl WL. Localization of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform PMCA3 in rat cerebellum, choroid plexus and hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; **29**: 71–80
- 58 Ho HT, Dahlin A, Wang J. Expression profiling of solute carrier Gene families at the Blood-CSF barrier. *Front Pharmacol* 2012; **3**: 154
- 59 Liddelow SA, Temple S, Mollgard K, Gehwolf R, Wagner A, Bauer H, Bauer HC, Phoenix TN, Dziegielewska KM, Saunders NR. Molecular characterisation of transport mechanisms at the developing mouse blood-CSF interface: a transcriptome approach. *PLoS ONE* 2012; **7**: e33554
- 60 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, eds. *WHO Classification of Tumours of The Central Nervous System*. Lyon: IARC, 2007
- 61 Hasselblatt M, Bohm C, Tatenhorst L, Dinh V, Newrzella D, Keyvani K, Jeibmann A, Buerger H, Rickert CH, Paulus W. Identification of novel diagnostic markers for choroid plexus tumors: a microarray-based approach. *Am J Surg Pathol* 2006; **30**: 66–74
- 62 Beschorner R, Pantazis G, Jeibmann A, Boy J, Meyermann R, Mittelbronn M, Schittenhelm J. Expression of EAAT-1 distinguishes choroid plexus tumors from normal and reactive choroid plexus epithelium. *Acta Neuropathol (Berl)* 2009; **117**: 667–75
- 63 Dode L, Andersen JP, Leslie N, Dhitavat J, Vilsen B, Hovnanian A. Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of Darier disease (SERCA2) mutants by steady-state and transient kinetic analyses. *J Biol Chem* 2003; **278**: 47877–89
- 64 Wuytack F, Dode L, Baba-Aissa F, Raeymaekers L. The SERCA3-type of organellar Ca²⁺ pumps. *Biosci Rep* 1995; **15**: 299–306
- 65 Papp B, Pászty K, Kovács T, Sarkadi B, Gàrdos G, Enouf J, Enyedi A. Characterization of the inositol trisphosphate-sensitive and insensitive calcium stores by selective inhibition of the endoplasmic reticulum-type calcium pump isoforms in isolated platelet membrane vesicles. *Cell Calcium* 1993; **14**: 531–8
- 66 Alonso MT, Manjarres IM, Garcia-Sancho J. Privileged coupling between Ca²⁺ entry through plasma membrane store-operated Ca²⁺ channels and the endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **353**: 37–44
- 67 Jousset H, Frieden M, Demaurex N. STIM1 knockdown reveals that store-operated Ca²⁺ channels located close to sarco/endoplasmic Ca²⁺ ATPases (SERCA) pumps silently refill the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2007; **282**: 11456–64
- 68 Berridge MJ. Calcium signal transduction and cellular control mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1742**: 3–7
- 69 Zapala MA, Hovatta I, Ellison JA, Wodicka L, Del Rio JA, Tennant R, Tynan W, Broide RS, Helton R, Stoveken BS, Winrow C, Lockhart DJ, Reilly JF, Young WG, Bloom FE, Barlow C. Adult mouse brain gene expression patterns bear an embryologic imprint. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 10357–62. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/tools/profileGraph.cgi?ID=GDS1490:103935_at (last accessed 25 November 2013)
- 70 Terbach N, Williams RS. Structure-function studies for the panacea, valproic acid. *Biochem Soc Trans* 2009; **37**: 1126–32

Received 22 July 2013

Accepted after revision 8 November 2013

Published online Article Accepted on 13 November 2013

Article II : Expression des enzymes de type SERCA dans les cellules de la leucémie aiguë lymphoblastique B

Dans les cellules B comme dans les autres lymphocytes, la signalisation calcique est cruciale dans le contrôle du devenir des cellules, notamment dans la balance prolifération, apoptose, maturation, survie et la réponse à l'antigène. Les pompes calciques de type SERCA ayant un rôle majeur dans la régulation de la signalisation calcique cellulaire, il est donc important d'étudier leur rôle et leur régulation dans ces cellules.

L'objectif principal de cette partie de mon travail de thèse a été d'étudier le rôle et d'analyser l'expression des ATPases calciques de type SERCA, au cours de la différenciation des cellules pré-B leucémiques. Durant leur différenciation normale, les cellules B immatures passent par plusieurs stades de développement. Ces stades sont caractérisés par l'expression de diverses molécules de surfaces telles que le CD20, le CD19 [130], et les facteurs de transcription comme le facteur E2A [131]. Au cours de ce processus, les cellules précurseurs acquièrent toute la machinerie moléculaire nécessaire pour répondre à une stimulation antigénique. Des perturbations au cours de cette différenciation peuvent donner lieu à des hémopathies malignes [132]. Ces dernières sont classées en fonction du stade au niveau duquel la différenciation des cellules est bloquée, du type d'anomalie génétique impliquée dans ce blocage et la transformation leucémique.

Afin de réaliser notre étude, nous avons utilisé des lignées cellulaires issues de la leucémie aiguë lymphoblastique portant la translocation $t(1;19)(q23;p13)$. Cette translocation implique le gène E2A et le gène PBX1 pour former la protéine de fusion E2A-BPX1 [133]. Cette oncoprotéine, par un mécanisme de dominant négatif bloque la différenciation lymphoïde B au stade pré-B. Ainsi, ce type de leucémie est caractérisé par l'expansion clonale de cellules lymphoïdes immatures bloquées à un stade précoce de la différenciation.

Au cours de mes travaux j'ai mis en évidence, que le blocage de différenciation des cellules de LAL-B $t(1;19)(q23;p13)$, peut être aboli par l'activation pharmacologique des protéines kinases C. Cette activation mène à la différenciation phénotypique des cellules, détectée par l'induction de l'expression de marqueurs de maturation (CD19, CD20) et par la diminution/perte d'expression de marqueurs d'immaturité tels que le TDT, RAG-1, et CD10. Nos travaux ont permis de mettre en évidence, qu'alors que les cellules non-traitées

expriment simultanément SERCA2 et SERCA3, la différenciation des cellules est accompagnée d'une forte induction de l'expression de SERCA3, alors que l'expression de SERCA2 est peu modifiée. Les taux d'expression de SERCA3 après différenciation deviennent comparables à ceux observés dans les cellules B matures. Nous avons également montré que l'inhibition des enzymes de type SERCA bloque l'induction de l'expression de CD20 au cours de la différenciation.

Ces observations montrent, pour la première fois, que 1) l'homéostasie calcique de RE est remodelée au cours de la différenciation lymphoïde B précoce, 2) il existe une interconnexion fonctionnelle entre la fonction des enzymes de type SERCA et le contrôle de la différenciation B, et 3) SERCA3 peut servir comme nouveau marqueur de la différenciation précoce du lignage lymphoïde B.

Induction of endoplasmic reticulum calcium pump expression during early B cell differentiation

Lamia Aït Ghezali^{1,2}, Atousa Arbabian³, Hervé Roudot^{1,2,5}, Jean-Philippe Brouland⁴, Fanny Baran-Marszak^{1,2,5}, Evelyn Salvaris⁶, Hans Drexler⁷, Agnes Enyedi⁸, Remi Letestu^{1,2,5}, Nadine Varin-Blank^{1,2} and Bela Papp^{1,2}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U978, Bobigny, France

²Université Paris-13, PRES Sorbonne Paris-Cité, 74, rue Marcel Cachin 93017 Bobigny, France

³Département de Virologie, Institut Pasteur, Paris, France

⁴Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Lariboisière, Paris, France

⁵Service d'Hématologie Biologique, Hôpital Avicenne, Bobigny, France

⁶Lions Clinical Cancer Research Laboratory, Walter and Elisa Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Australia

⁷Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany

⁸Second Institute of Pathology, Semmelweis University Medical School, Budapest, Hungary

Corresponding author: Bela Papp, U978 Inserm, UFR SMBH, Université Paris-13
74, rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France

email : belapapp2@yahoo.fr or bela.papp@inserm.fr

Key words: pre-B acute lymphoblastic leukemia, phorbol ester, endoplasmic reticulum, SERCA, calcium transport

Running title: Calcium pumps and pre-B cell differentiation

Lamia Ait Ghezali : lamia.agl@gmail.com
Atoussa Arbabian : atoussa-arbabian@hotmail.fr
Hervé Roudot : morgan.roudot@wanadoo.fr
Jean-Philippe Brouland : jphbrouland@free.fr
Fanny Baran-Marszak : fanny.baran-marszak@aphp.fr
Evelyn Salvaris : Evelyn.SALVARIS@svha.org.au
Hans Drexler : hdr@dsmz.de
Agnes Enyedi : enyedi.agnes@med.semmelweis-univ.hu
Remi Letestu : remi.letestu@aphp.fr
Nadine Varin-Blank : nadine.varin@inserm.fr
Bela Papp : belapapp2@yahoo.fr

Abbreviations:

ALL	:	acute lymphoblastic leukemia
BCR	:	B cell antigen receptor
DAG	:	diacyl-glycerol
DMSO	:	dimethyl-sulfoxide
ER	:	endoplasmic reticulum
IP3	:	<i>D-myo</i> -inositol-1,4,5-trisphosphate
PKC	:	protein kinase C
PLC- γ	:	phospholipase C-gamma
PMA	:	phorbol-12-myristate-13-acetate
RAG-1	:	recombination-activating gene 1
SERCA	:	sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase
SDS PAGE	:	sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	:	trichloroacetic acid
TdT	:	terminal deoxynucleotidyl transferase

Abstract

Endoplasmic reticulum (ER) calcium storage plays an important role in B lymphocyte maturation, survival, immunoglobulin synthesis and antigen-dependent cell activation. Calcium is accumulated in the ER by Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases (SERCA enzymes). In this work we investigated the modulation of SERCA expression during the differentiation of leukemic precursor B lymphoblasts that carry the t(1;19)(q23;p13) translocation that leads to the expression of the E2A-PBX1 fusion oncoprotein. We show that although these cells express simultaneously SERCA2 and SERCA3-type calcium pumps, their SERCA3 expression is markedly inferior to that of mature B cells. Activation of protein kinase C enzymes by phorbol ester leads to phenotypic differentiation of the cells, and this is accompanied by the induction of SERCA3 expression. Direct pharmacological inhibition of SERCA-dependent calcium transport during phorbol ester treatment interferes with the differentiation process. These data show that ER calcium homeostasis is remodeled due to increased SERCA3 expression during the differentiation of precursor B acute lymphoblastic leukemia cells, that a cross-talk exists between SERCA function and the control of differentiation, and that SERCA3 may constitute an interesting new marker for the study of early B cell phenotype.

Introduction

Calcium signaling is essential for B lymphocyte responses. The activation of the B cell antigen receptor and other important receptors leads, via PLC- γ activation and subsequent IP₃ production, to the release of calcium accumulated in the ER via IP₃ receptor calcium channels. ER calcium release, coupled to capacitative calcium influx from the extracellular space through Orai-type calcium channels leads to increased cytosolic calcium levels, the activation of calcineurin and various PKC isoforms and the activation of NF- κ B and NFAT-type transcription factors that orchestrate B cell activation [1; 2; 3; 4; 5].

Calcium-dependent activation is critically dependent on the function of Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPases (SERCA enzymes). Located in the ER membrane, SERCA proteins accumulate calcium ions from the cytosol in the ER lumen by ATP-dependent active transport, creating a several thousand fold calcium concentration gradient from the ER (high micromolar) towards the cytosol (low nanomolar)[6; 7; 8]. SERCA activity is therefore a prerequisite for IP₃-induced calcium release to occur, and, by recapturing calcium during a calcium release event, SERCA enzymes also shape the amplitude and the duration of calcium signals, and thus modulate cell activation. Mature B cells express simultaneously SERCA2b and SERCA3-type calcium pumps [9; 10]. The calcium affinity of SERCA3 is markedly weaker ($K_{Ca^{2+}} \sim 1.2 \mu M$) than that of SERCA2b ($K_{Ca^{2+}} \sim 0.2 \mu M$) [8; 11]. Due to its lower calcium affinity, SERCA3 will tolerate higher calcium rises during ER calcium release [8; 11; 12; 13; 14]. The SERCA2b/SERCA3 protein ratio constitutes a unique mechanism whereby the avidity of the ER for calcium can be modulated in a cell [15; 16].

Early B cell differentiation proceeds through several consecutive steps during which an initially immature lymphoid precursor acquires the cellular machinery required for the function of the differentiated B cell. Phenotypic changes that occur during this process, such as the loss or gain of various markers and gene expression regulatory networks, have already been described in considerable detail [17; 18; 19]. However, little is known so far about the functional remodeling of ER calcium homeostasis and about changes of SERCA-dependent ER calcium sequestration that may occur during early B lymphoid differentiation.

Precursor-B ALL cells are blocked at early stages of B-cell differentiation due to the presence of various genetic lesions that give rise to different fusion oncoproteins such as E2A-PBX1, BCR-ABL, MLL-ENL, TEL-AML1 or others. These oncoproteins activate distinct molecular oncogenic mechanisms, influence prognosis, and are widely used for the molecular classification of precursor-B ALL [20; 21].

In order to investigate SERCA expression during early B cell differentiation, and to gain insight into its defects in leukemia, in this work we investigated the effects of protein kinase C activation by a phorbol ester on the phenotype and SERCA expression of various precursor B ALL

cell lines *in vitro*. Phorbol esters are known to induce differentiation of several myeloid leukemia cell types, and this is accompanied by increased SERCA3 expression [22; 23]. We show that the differentiation blockage of E2A-PBX1-expressing precursor B-ALL cells can be abolished *in vitro* by the pharmacological activation of PKC, and that the differentiation of these cells is accompanied by marked changes in SERCA expression. Whereas untreated cells express simultaneously SERCA2 and SERCA3-type calcium pumps, the expression of SERCA3, a lower calcium affinity isoenzyme [8; 11; 14] is preferentially induced upon differentiation, indicating that ER calcium accumulation is functionally remodeled during this process. In addition, we show that the direct pharmacological inhibition of SERCA-dependent calcium transport interferes with the differentiation process as detected by CD20 expression.

Materials and Methods

Cell culture

Cell lines used in this study were obtained from DSMZ (Braunschweig, Germany), ATCC (Manassas, VA), ECACC (Porton Down, UK) or from the originators (see Supplemental Table 1). Authenticity check of cell lines was performed by short tandem repeat analysis by the commercial furnishers. Early passage cells were cultured in suspension in the appropriate culture medium at 37°C in humidified cell culture incubators in a 95% air 5% CO₂ atmosphere. Fetal calf serum that supported vigorous growth of the Kasumi-2 line as single cells without clumping was selected for culture. Mycoplasma screening was performed by polymerase chain reaction using the G238 mycoplasma detection kit of Applied Biological Materials, Euromedex, Souffelweyersheim, France. Cell densities and viabilities of exponentially growing cultures were determined by cell counting using a Malassez chamber and trypan blue exclusion.

Reagents and treatments

Before treatments cells were centrifuged and resuspended in new complete medium at densities indicated in Figures and distributed into 60 cm² plastic Petri dishes. Non-adherent dishes were used for the various cell lines because treatment in adherent conditions resulted in the adherence of a minor fraction (<5%) of the cells following treatments, for example for Kasumi-2 cells. Treatment of MHH-CALL3 cells was done in cell culture grade adherent Petri dishes, since treatment of this cell line leads to the adherence of the overwhelming majority (>90%) of viable cells.

PMA, Gö 6983 and GF 109203X, thapsigargin, cyclopiazonic acid and 2,5-di(*tert*)butyl-1,4-benzohydroquinone were obtained from Sigma-Aldrich France, Saint-Quentin Fallavier, France. Drugs were added to cells from concentrated stock solutions made in dimethyl-sulfoxide (DMSO). DMSO vehicle did not exceed 0.01%, was included in controls and did not interfere with the experiments.

When PMA treatments were done in the presence of Gö 6983 or GF 109203X, these were added to the cell cultures 30 minutes before the addition of PMA.

Western blotting and flow cytometry

After treatments as indicated in the Figures, cells were harvested by centrifugation and washed with ice cold 150 mM NaCl. Total cellular protein was then precipitated with 5% trichloroacetic acid (TCA), centrifuged and dissolved in modified SDS PAGE lysis buffer. This sample preparation process, as well as quantification of the protein content of lysates is described in [24] in detail. Equal amounts of total cellular protein (60 µg/well) were deposited on polyacrylamide gels, and SDS PAGE followed by immunoblotting onto nitrocellulose membranes were done as in [24]. After electrotransfer, total membrane bound protein was quantified by Ponceau red staining and densitometry as in [24].

Western blotting for SERCA2 and SERCA3 was performed using the IID8 (Sigma-Aldrich, 0.4 µg/ml) and the PLIM430 mouse monoclonal (10x diluted hybridoma cell culture supernatant) antibodies, respectively, and peroxidase-conjugated anti-mouse Ig antibodies as in [24]. Luminescent signal obtained with the ECL Prime (Amersham) and SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity (Thermo Fisher) reagents was detected, quantified and analyzed using a BioRad ChemiDoc MP image acquisition system and the Image Lab 4.0 software. Immunoblot signal intensities were normalized to the corresponding total protein values as obtained by Ponceau staining, and are expressed as fold change in treated cells *versus* untreated control.

Detection by western blotting of CD20 (clone L26 purified mouse monoclonal anti-human CD20cy, Dako Denmark A/S, 0.2 µg/ml), RAG-1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-5599, H-300, rabbit polyclonal IgG 0.2 µg/ml). TdT (clone EPR2976Y, rabbit hybridoma culture supernatant monoclonal antibody, dilution:3500x, Epitomics). CD19 (clone LE-CD19 purified mouse monoclonal anti-human CD19, Thermo Fisher Scientific, 0.33 µg/ml) was performed similarly.

Detection and analysis of expression of various lymphoid phenotypic markers (CD3, CD5, CD10, CD19, CD20, CD22, CD34, CD38, CD45, FMC7, TdT, κ and λ chains and IgM) by flow cytometry was done as described earlier [25; 26].

Cytology

Immunocytochemical staining for CD20 expression was performed on cytologic smears. Suspensions of treated and untreated control cells of packed cell volume ratio of approximately 50% were applied to poly-lysine coated microscopic slides and dried on air overnight. Following fixation in acetone at room temperature for 10 minutes and drying the slides were rehydrated and labeled for CD20 expression using the Clone L26 monoclonal mouse anti-CD20 antibody (Dakocytomation, Les Ulis, France) at a concentration of 6 µg/ml in Dako REAL™ antibody diluent (Dakocytomation), using an indirect avidin-biotin-peroxydase method with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) as chromogen on an automated immunostainer (Benchmark®, Ventana Medical Systems, Illkirch, France). Inhibition of endogenous peroxydase activity was done with 3% hydrogen peroxide in phosphate-buffered saline for 10 minutes. Incubation with the CD20-specific antibody was done at 37°C for 30 minutes, and labeling was revealed using the Ventana iView® DAB Detection kit with copper enhancement, according to the instructions of the manufacturer. Slides were counterstained with hematoxylin and bluing reagent (Ventana). Cells were photographed using a Zeiss Axio Scope.A1 microscope and an AxioCam ICc1 camera using the Axiovision 4.8.2 software. May-Grünwald-Giemsa staining of cytological smears was done using standard methods.

Real time PCR

Following treatments cells were centrifuged, and RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit of Qiagen (Courtaboeuf, France). RT-PCR was done on 1 µg of total RNA using the Iscript cDNA synthesis kit of Bio-Rad (Marne la Coquette, France) TaqMan gene expression assays were performed on an Abiprism 7000 apparatus (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the Hs 99999905_m1, Hs 0054487_m1 and Hs 01024558_m1 primer pairs (Applied Biosystems, Life Technologies, Fisher Scientific, Illkirch, France) for GAPDH, ATP2A2 (SERCA2) and ATPA3 (SERCA3), respectively. Relative gene expression levels after treatments were calculated by the $\Delta\Delta C_t$ method normalized to GAPDH, and expressed as fold change compared to untreated cells.

Data are presented as the mean \pm SEM, and correspond to at least three independent experiments. Statistical analysis was done using Student's unpaired t test.

Results

Induction of SERCA expression in precursor B ALL cells

As investigated in the Kasumi-2 and RCH-ACV cell lines that carry the t(1;19)(q23;p13) translocation and express the E2A-PBX1 fusion oncoprotein, PMA treatment led to enhanced SERCA3 expression. This could be observed from 10^{-10} - 10^{-9} M PMA, and reached a plateau in the 10^{-8} - 10^{-7} concentration range (**Fig. 1**). Significant induction of SERCA3 expression was observed starting at day 1-2 and reached a plateau at day 4-5 (**Fig. 2**). Maximal induction in both cell lines was approximately fivefold when compared to untreated cells. As shown in **Fig. 3**, PMA treatment in Kasumi-2 cells led to inhibition of cell proliferation with maintained viability up till day 5, whereas longer treatments led to significant cell death.

Induction of SERCA3 expression was manifest also on the mRNA level. As shown in **Fig. 4**, induction of SERCA3 mRNA expression was observed in both Kasumi-2 and RCH-ACV cells, already at 12 hours of treatments, and this followed reproducibly a biphasic pattern with a 5-6-fold enhancement when compared to untreated control. Moreover, the moderate enhancement of SERCA2 protein expression observed in Kasumi-2 cells could also be observed on the mRNA level.

SERCA3 expression was induced by PMA in all available precursor B ALL cell lines of the t(1;19)/E2A-PBX1 molecular type. As shown in **Fig. 5**, the Kasumi-2, RCH-ACV, LK63, Lila-1, MHH-CALL3 and 697 cell lines all expressed simultaneously SERCA2 and SERCA3 calcium pump isoforms. When the cells were treated with 10^{-7} M PMA for 5 days, the expression of SERCA3 protein was strongly enhanced in all cell lines, whereas that of the simultaneously expressed SERCA2 protein remained unchanged or was only slightly modified. PMA treatment of precursor B ALL cell lines (Nalm-21, TOM-1, BV173, KOPN-8 and Reh) of other molecular types (see Supplemental Table 1) led to the death of cultures within 24-48 hours.

PMA treatment leads to cell differentiation

The phenotype of Kasumi-2 precursor B ALL cells was investigated before and after stimulation with 10^{-7} M PMA for 5 days using established markers of early B cell differentiation. Whereas before treatment cells expressed high levels of TdT and RAG-1 and low levels of CD20

proteins, PMA treatment led to strong CD20 expression and to the simultaneous down-regulation of TdT and RAG-1 expression (**Figure 6, Panel A**).

PMA-treatment of cells led to the formation of multicellular aggregates and to morphological changes (**Figure 6, Panel B**). Whereas untreated cells were round, small and displayed high nucleocytoplasmic ratio and round nuclei, treatment with 10^{-8} M PMA for 4 days led to increased cell size, lower nucleocytoplasmic ratio and lobulated nuclei.

As studied by flow cytometry, and in accordance with previous observations [27], untreated Kasumi-2 cells displayed a precursor B lymphoid phenotype (CD3⁻, CD5⁻, CD10⁺, CD19⁺, CD20^{+/-}, CD22⁺, CD34⁻, CD38⁺, CD45⁺, TdT⁺). As shown in **Fig 7**, treatment of cells with 10^{-8} M PMA for 4 days led to markedly enhanced expression of the CD19, CD20, CD22 and FMC7 differentiation markers, whereas the expression of markers of immaturity such as CD10 or TdT was decreased. PMA treatment, however, did not lead to CD79A, κ or λ chain or IgM expression (not shown).

Induction of SERCA3 expression is PKC-dependent

The induction of SERCA3 expression by PMA was investigated in the presence or absence of pharmacological inhibitors of PKC. As shown in **Fig 8**, when cells were preincubated with Gö 6983 or with GF 109203X for 30 minutes, the consecutive addition of 10^{-8} M PMA (a maximally active concentration) was without effect on SERCA expression, indicating the involvement of conventional or novel-type PKC activity in PMA-induced SERCA expression.

Comparison of SERCA3 expression in precursor B and mature B cell lines

In order to further correlate SERCA3 expression with the state of differentiation of neoplastic B cells, SERCA3 expression of precursor B cell lines was compared to that of an extensive set of randomly selected mature B cell lines. As shown in **Fig. 9**, SERCA3 expression in all individual precursor B cell lines was significantly weaker than in any of the investigated mature cell lines, and a highly significant, approximately 15-fold higher SERCA3 expression could be established when pre-B and mature B cell lines were compared as a group.

SERCA activity is involved in the control of cell differentiation

The role of SERCA function in the differentiation of leukemic B cells was investigated using thapsigargin, a high affinity, selective inhibitor of SERCA-dependent calcium transport. As shown in

Fig. 10, Treatment of Kasumi-2 cells with sub-nanomolar concentrations of thapsigargin completely abolished the induction of CD20 expression induced by PMA (**Fig. 10, Panel A**). Inhibition of PMA-induced CD20 expression by thapsigargin was observed in the absence of significant toxicity during the experiments (**Fig. 10, Panel B**), although higher thapsigargin concentrations were, in accordance with the literature [28], toxic. Similar observations could be obtained with cyclopiazonic acid or 2,5-di-*tert*-butyl-1,4-benzohydroquinone, two other, structurally unrelated SERCA inhibitors as well (data not shown).

Discussion

We show in this work for the first time that ER calcium pump expression is remodeled during early B lymphoid differentiation. Activation of PKC-dependent signaling with a phorbol ester-type DAG analog in B ALL cells, blocked at the precursor B stage, led to the induction of differentiation of the cells as detected by the loss of expression of TDT and RAG-1 and the induction of expression of CD20 as well as morphological changes. This process was accompanied by a marked induction of the expression of SERCA3 mRNA and protein, whereas the expression of SERCA2 was unchanged or was only moderately increased.

The induction of SERCA3 expression upon PMA treatment could be observed in all B ALL cell lines investigated that carry the t(1;19) translocation giving rise to the E2A-PBX1 fusion oncoprotein, whereas in cell lines that belong to other molecular types such as t(9;22), t(11;19) or t(12;21) that express the BCR-ABL, MLL-ENL or TEL-AML1 fusion oncoproteins, respectively, PMA treatment led to rapid cell death. This suggests that the E2A-PBX1 expressing B ALL may constitute a molecular subtype in which differentiation blockade can be overcome by PKC activation. This may help to better understand the molecular mechanisms responsible for the blockade of differentiation of this type of leukemia and may be of interest for the targeted therapy of this type of leukemia in the future.

In addition to activating protein kinase C (PKC) isoenzymes belonging to the conventional and novel subfamilies, PMA can bind to and activate other DAG-binding proteins [29; 30; 31; 32; 33; 34], including the RasGRP1 guanine nucleotide exchange factor [35]. However, the inhibition of the effects of PMA on the expression of SERCA3 and of other differentiation markers by PKC inhibitors indicates that PKC activation is the essential initiating step of the pharmacologically induced differentiation process that leads to the induction of SERCA3 expression in E2A-PBX1-expressing t(1;19) precursor B ALL cells.

Strong SERCA3 expression has already been observed in normal mature resting B lymphocytes *in situ* in lymph node follicles [10], indicating that enhanced SERCA3 expression is part

the normal B lymphocyte differentiation program. Our work indicates that high SERCA3 expression is acquired during the maturation of pre-B cells. A sharp contrast could also be observed when SERCA3 expression of precursor B ALL cell lines was compared to a large set of cell lines encompassing a wide range of mature B neoplasia types. Despite variation among different cell lines, SERCA3 expression was several-fold higher in mature cells when compared to precursor B cell lines. This indicates that systematic differences exist in terms of SERCA3 expression between immature and mature B lymphoid malignancies, and that SERCA3 may therefore constitute a useful new phenotypic marker for the study of B lymphoid differentiation and leukemia/lymphoma phenotype.

Calcium signaling plays an important role in the activation of mature B cells [5; 36]. Antigen binding to the BCR leads to phospholipase-C activation, IP3 production and calcium release from IP3-sensitive intracellular pools [36; 37; 38]. The calcium affinity of SERCA3 is inferior when compared to the simultaneously expressed SERCA2 isoform [11; 13], and SERCA3 has been shown to be preferentially associated with the IP3-sensitive intracellular calcium compartment in platelets [39]. It is therefore tempting to hypothesize that the induction of SERCA3 expression during the maturation of B cell precursors is part of the differentiation program, whereby the cells acquire an intracellular calcium storage compartment poised to mount larger calcium release signals upon BCR activation.

Importantly, the modulation of SERCA expression was not a simple passive consequence of cell differentiation. When cell differentiation was conducted in the presence of sub-nanomolar, non-toxic concentrations of thapsigargin, a high affinity SERCA inhibitor, induction of CD20 expression by PMA was completely suppressed. Similar results were obtained by using cyclopiazonic acid and 2,5-di(tert)butyl-1,4-benzohydroquinone, two other, structurally unrelated SERCA inhibitors as well. These observations show, that SERCA function is required for differentiation to proceed and that the perturbation of SERCA activity during differentiation can interfere with this process.

In summary, this work shows, for the first time that the modulation of SERCA3 expression is part of early B cell differentiation, inhibition of SERCA3 expression and the differentiation block in pre-B ALL cells can be overcome by PKC activation, and that unperturbed SERCA function is required for cell differentiation. In addition, these data indicate that SERCA3 may serve as a useful new phenotypic marker for the study of B cell differentiation and its defects in leukemia.

- [1] Y. Baba, and T. Kurosaki, Impact of Ca²⁺ signaling on B cell function. *Trends Immunol* 32 (2011) 589-94.
- [2] S. Feske, E.Y. Skolnik, and M. Prakriya, Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat Rev Immunol* 12 (2012) 532-47.
- [3] A.J. Marshall, H. Niiro, T.J. Yun, and E.A. Clark, Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma pathway. *Immunol Rev* 176 (2000) 30-46.
- [4] M. Vig, and J.P. Kinet, Calcium signaling in immune cells. *Nat Immunol* 10 (2009) 21-7.
- [5] M. Oh-hora, and A. Rao, Calcium signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 20 (2008) 250-8.
- [6] M. Periasamy, and A. Kalyanasundaram, SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve* 35 (2007) 430-42.
- [7] E.E. Strehler, and M. Treiman, Calcium pumps of plasma membrane and cell interior. *Curr Mol Med* 4 (2004) 323-35.
- [8] F. Wuytack, L. Raeymaekers, and L. Missiaen, Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps. *Cell Calcium* 32 (2002) 279-305.
- [9] B. Papp, A. Enyedi, K. Paszty, T. Kovacs, B. Sarkadi, G. Gardos, C. Magnier, F. Wuytack, and J. Enouf, Simultaneous presence of two distinct endoplasmic-reticulum-type calcium-pump isoforms in human cells. Characterization by radio-immunoblotting and inhibition by 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone. *Biochem J* 288 (Pt 1) (1992) 297-302.
- [10] O. Dellis, A. Arbabian, J.P. Brouland, T. Kovacs, M. Rowe, C. Chomienne, I. Joab, and B. Papp, Modulation of B-cell endoplasmic reticulum calcium homeostasis by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1. *Mol Cancer* 8 (2009) 59.
- [11] P.C. Chandrasekera, M.E. Kargacin, J.P. Deans, and J. Lytton, Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase isoform SERCA3. *Am J Physiol Cell Physiol* 296 (2009) C1105-14.
- [12] I. Vandecaetsbeek, P. Vangheluwe, L. Raeymaekers, F. Wuytack, and J. Vanoevelen, The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (2011).
- [13] I. Vandecaetsbeek, M. Trekels, M. De Maeyer, H. Ceulemans, E. Lescrinier, L. Raeymaekers, F. Wuytack, and P. Vangheluwe, Structural basis for the high Ca²⁺ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca²⁺ pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (2009) 18533-8.
- [14] P. Vangheluwe, M.R. Sepulveda, L. Missiaen, L. Raeymaekers, F. Wuytack, and J. Vanoevelen, Intracellular Ca²⁺- and Mn²⁺-transport ATPases. *Chem Rev* 109 (2009) 4733-59.
- [15] A. Arbabian, J.P. Brouland, P. Gelebart, T. Kovacs, R. Bobe, J. Enouf, and B. Papp, Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer. *Biofactors* 37 (2011) 139-49.
- [16] B. Papp, J.P. Brouland, A. Arbabian, P. Gelebart, T. Kovacs, R. Bobe, J. Enouf, N. Varin-Blank, and A. Apati, Endoplasmic reticulum calcium pumps and cancer cell differentiation. *Biomolecules* 2 (2012) 165-86.
- [17] S. Herzog, M. Reth, and H. Jumaa, Regulation of B-cell proliferation and differentiation by pre-B-cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 9 (2009) 195-205.
- [18] T. Ikawa, Genetic and epigenetic control of early lymphocyte development. *Curr Top Microbiol Immunol* 381 (2014) 1-20.
- [19] E.V. Rothenberg, Transcriptional control of early T and B cell developmental choices. *Annu Rev Immunol* 32 (2014) 283-321.
- [20] H. Inaba, M. Greaves, and C.G. Mullighan, Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 381 (2013) 1943-55.
- [21] C.G. Mullighan, Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 122 (2012) 3407-15.
- [22] C. Lacabartz-Porret, S. Launay, E. Corvazier, R. Bredoux, B. Papp, and J. Enouf, Biogenesis of endoplasmic reticulum proteins involved in Ca²⁺ signalling during megakaryocytic differentiation: an in vitro study. *Biochem J* 350 Pt 3 (2000) 723-34.

- [23] S. Launay, M. Gianni, T. Kovacs, R. Bredoux, A. Bruel, P. Gelebart, F. Zassadowski, C. Chomienne, J. Enouf, and B. Papp, Lineage-specific modulation of calcium pump expression during myeloid differentiation. *Blood* 93 (1999) 4395-405.
- [24] A. Arbabian, J.P. Brouland, A. Apati, K. Paszty, L. Hegedus, A. Enyedi, C. Chomienne, and B. Papp, Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation. *FEBS J* 280 (2013) 5408-18.
- [25] C. Le Roy, N. Varin-Blank, F. Ajchenbaum-Cymbalista, and R. Letestu, Flow cytometry APC-tandem dyes are degraded through a cell-dependent mechanism. *Cytometry A* 75 (2009) 882-90.
- [26] F.E. Craig, and K.A. Foon, Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111 (2008) 3941-67.
- [27] E. Salvaris, J.R. Novotny, K. Welch, L. Campbell, and A.W. Boyd, Characterization of two novel pre-B-cell lines (LK63 and LiLa-1): potential models of pre-B-cell differentiation. *Leuk Res* 16 (1992) 655-63.
- [28] T.B. Andersen, C.Q. Lopez, T. Manczak, K. Martinez, and H.T. Simonsen, Thapsigargin--from Thapsia L. to mipsagargin. *Molecules* 20 (2015) 6113-27.
- [29] C. Gaggioli, S. Hooper, C. Hidalgo-Carcedo, R. Grosse, J.F. Marshall, K. Harrington, and E. Sahai, Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat Cell Biol* 9 (2007) 1392-400.
- [30] S.P. Bruinsma, and T.J. Baranski, Beta2-chimaerin in cancer signaling: connecting cell adhesion and MAP kinase activation. *Cell Cycle* 6 (2007) 2440-4.
- [31] Q.J. Wang, PKD at the crossroads of DAG and PKC signaling. *Trends Pharmacol Sci* 27 (2006) 317-23.
- [32] M.K. Topham, Signaling roles of diacylglycerol kinases. *J Cell Biochem* 97 (2006) 474-84.
- [33] J.C. Stone, Regulation of Ras in lymphocytes: get a GRP. *Biochem Soc Trans* 34 (2006) 858-61.
- [34] E.M. Silinsky, and T.J. Searl, Phorbol esters and neurotransmitter release: more than just protein kinase C? *Br J Pharmacol* 138 (2003) 1191-201.
- [35] J.O. Ebinu, D.A. Bottorff, E.Y. Chan, S.L. Stang, R.J. Dunn, and J.C. Stone, RasGRP, a Ras guanyl nucleotide- releasing protein with calcium- and diacylglycerol-binding motifs. *Science* 280 (1998) 1082-6.
- [36] D. Cantrell, Signaling in lymphocyte activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (2015).
- [37] M.J. Berridge, Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1793 (2009) 933-40.
- [38] Y. Baba, M. Matsumoto, and T. Kurosaki, Calcium signaling in B cells: regulation of cytosolic Ca²⁺ increase and its sensor molecules, STIM1 and STIM2. *Mol Immunol* 62 (2014) 339-43.
- [39] B. Papp, K. Paszty, T. Kovacs, B. Sarkadi, G. Gardos, J. Enouf, and A. Enyedi, Characterization of the inositol trisphosphate-sensitive and insensitive calcium stores by selective inhibition of the endoplasmic reticulum-type calcium pump isoforms in isolated platelet membrane vesicles. *Cell Calcium* 14 (1993) 531-8.

Legends to Figures

Figure 1. PMA concentration dependency of SERCA protein expression in precursor B ALL cell lines.

Kasumi-2 (**Panel A**) and RCH-ACV (**Panel B**) cells were treated with various concentrations of PMA for 5 days and SERCA2 (open columns) and SERCA3 expression (closed columns) was detected by western blotting (lower part) and quantified (upper part). PMA treatment led to an approximately five- or sevenfold increase of SERCA3 expression in Kasumi-2 and RCH-ACV cells, respectively. Concentration-dependent induction of SERCA expression by PMA could be observed from 10^{-10} - 10^{-9} M and reached a plateau around 10^{-8} - 10^{-7} M, whereas DMSO vehicle was without effect.

Figure 2. Time course of SERCA expression in PMA-treated precursor B ALL cell lines.

Kasumi-2 (**Panel A**) and RCH-ACV (**Panel B**) cells were treated with 10^{-7} M PMA and SERCA3 (closed squares) as well as SERCA2 (open circles) expression was determined. Induction of SERCA3 expression is detected from days 1-2 and reaches a plateau after 4-5 days.

Figure 3. Inhibition of proliferation with maintained viability in PMA-treated Kasumi-2 cells.

Cells were treated with 10^{-8} M PMA during 5 days (closed squares) or were grown without treatment (open circles), and cell growth (**Panel A**) and viability (**Panel B**) were determined daily. Treatment led to inhibition of cell proliferation with maintained viability.

Figure 4. Modulation of SERCA mRNA levels in PMA-treated cells.

Kasumi-2 (**Panel A**) and RCH-ACV (**Panel B**) cells were treated with 10^{-8} M PMA, and SERCA3 (closed columns), as well as SERCA2 mRNA levels (open columns) were measured by RQ-PCR as described in Materials and Methods. When compared to untreated cells, SERCA3 mRNA expression peaked at day 2 of treatment, and a rebound could be observed at day 4.

Figure 5. SERCA protein expression in various precursor B ALL cell lines. Induction of SERCA3 expression by PMA.

Semi-quantitative western blotting analysis of SERCA2 and SERCA3 levels in equal amounts of total cellular protein lysates obtained from untreated (-) and PMA-treated (+) cells. PMA treatment leads to enhanced SERCA3 expression in all t(1;19)/E2A-Pbx1⁺ cell lines.

Figure 6. Induction of differentiation by PMA in Kasumi-2 cells.

Panel A: Cells were treated with 10^{-7} M PMA during 5 days and the expression of SERCA3, CD20, TdT, RAG-1 and CD19 was determined by western blotting daily. Whereas CD19 is expressed in untreated cells, induction of SERCA3 and CD20 expression by PMA treatment is accompanied by the down-regulation of TdT and RAG-1.

Panel B, Photographs 1 and 2: PMA treatments leads to the formation of multicellular aggregates. Whereas untreated cells (Photograph 1) grew predominantly as single cells in suspension, PMA treated cells (10^{-8} M, 4 days) formed multicellular aggregates (Photograph 2).

Panel B, Photographs 3 and 4: Induction of CD20 expression in PMA-treated Kasumi-2 cells detected by immunohistochemistry. Cytological smears of untreated (Photograph 3) and PMA-treated cells (10^{-8} M, 4 days, photograph 4) were stained for CD20 expression by immunohistochemistry as described in Materials and Methods. Brown staining indicates that treatment leads to a marked induction of CD20 expression (original magnification: 20x).

Panel B, photographs 5 and 6: May-Grünwald-Giemsa staining of cytological smears of untreated (photograph 5) and PMA-treated cells (10^{-8} M, 4 days, photograph 6). PMA treatment leads to decreased nucleocytoplasmic ratio (asterisks), increased cell size and the frequent formation of bilobed nuclei (arrowheads; original magnification: 40x).

Figure 7. Flow cytometric analysis of phenotypic changes induced by PMA treatment.

Kasumi-2 cells were treated with 10^{-8} M PMA for 4 days (black curves) and the expression of various early B lymphoid phenotypic markers was compared to untreated cells (grey curves). Appropriate isotype-matched irrelevant antibodies were used as negative control (grey areas). Treatment led to increased expression of the CD19, CD20, CD22 and FMC7 differentiation markers (**Panels B, C, D and E**, respectively), whereas the expression of the CD10 (**Panel A**) and of intracellular TdT (**Panel F**) decreased.

Figure 8. Effect of PKC inhibitors on PMA-induced cell differentiation.

Kasumi-2 cells were treated with 10^{-7} M PMA in the presence or the absence of the Gö 6983 or the GF 109203X PKC inhibitor for 4 days, and the expression of SERCA3 and SERCA2, as well as of CD20, TdT and RAG-1 proteins was detected by western blotting as described in Materials and Methods. When compared to untreated cells (lane 1), PMA treatment alone (lane 2) led to the induction of SERCA3 and CD20 expression and the down-regulation of TdT and RAG-1 proteins. Gö 6983 or GF 109203X abolished the effects of PMA (lanes 3 and 4). When applied alone, Gö 6983 or GF 109203X had no significant effect of the cells (lanes 5 and 6).

Figure 9. SERCA3 expression levels in precursor B and mature B cell lines.

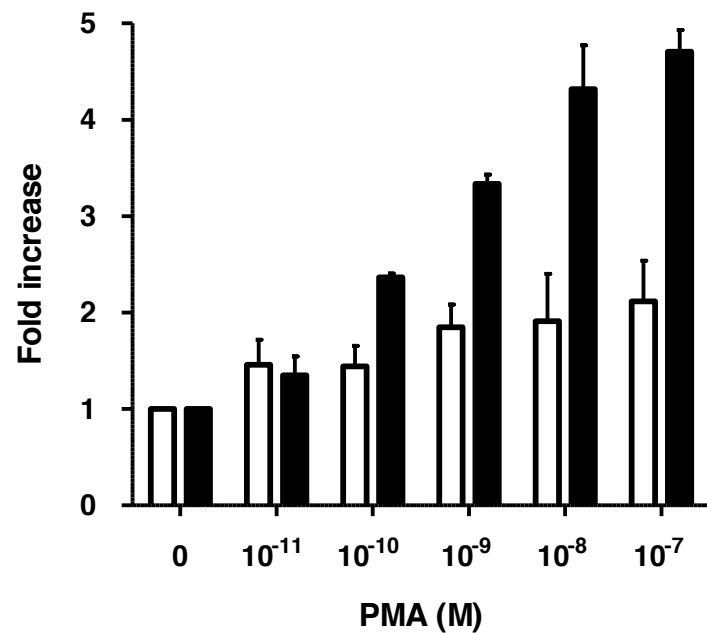
SERCA3 expression was determined by semi-quantitative western blotting using total protein lysates prepared from various untreated precursor-B and mature B cell lines. SERCA3 levels are expressed as fold change compared to untreated Kasumi-2 cells. Mature B cells express significantly higher levels of SERCA3 (Panel B). When SERCA3 expression is compared between pre-B and mature B cells as a group, an approximately tenfold higher expression is observed in mature B cells in a highly significant manner ($p=0.0087$).

Figure 10. Effect of SERCA inhibition on PMA-induced expression of CD20 in Kasumi-2 cells.

Panel A: Cells were incubated with 10^{-8} M PMA in the absence (empty column) or in the presence (gray columns) or of various thapsigargin concentrations in the sub- to low nanomolar concentration range for 4 days, and CD20 expression was measured by semi-quantitative western blotting. Thapsigargin treatment led to a concentration-dependent inhibition of PMA-induced CD20 expression. Although higher concentrations of thapsigargin led to cell death, no major cytotoxic effects were observed at the concentrations used in these experiments (Panel B).

Figure 1

A



B

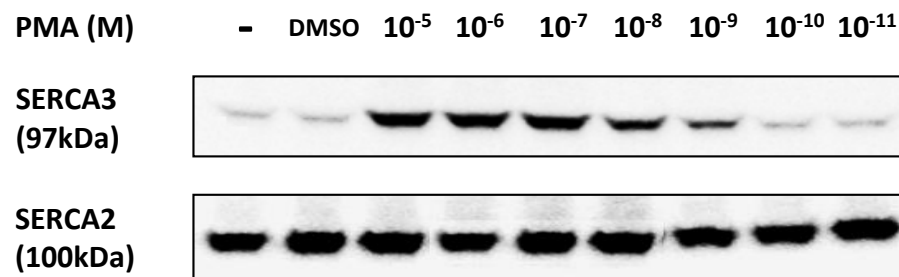
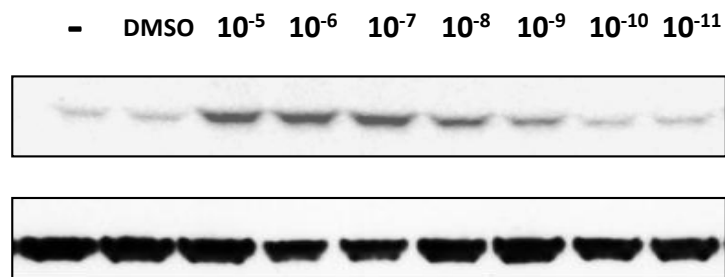
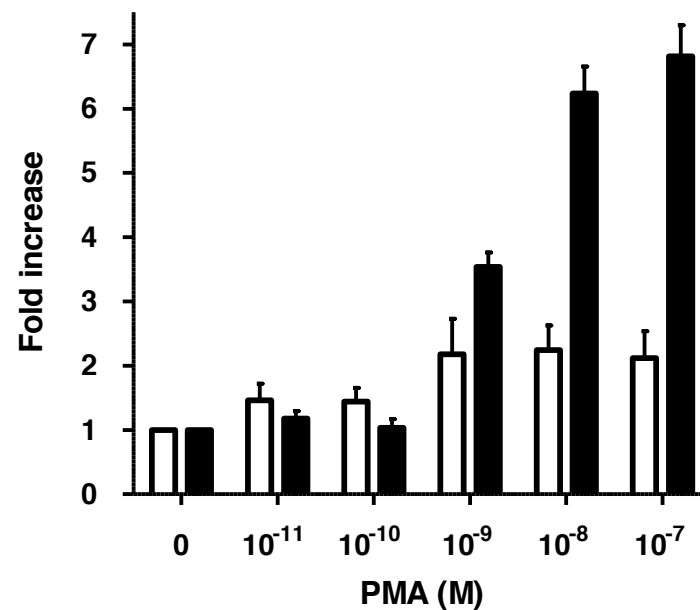
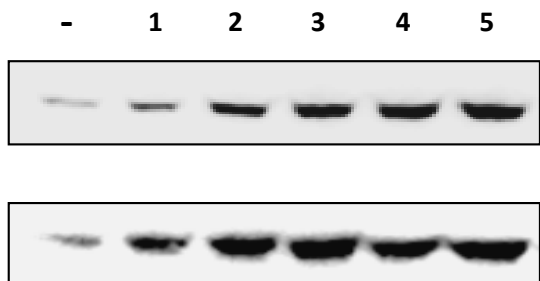
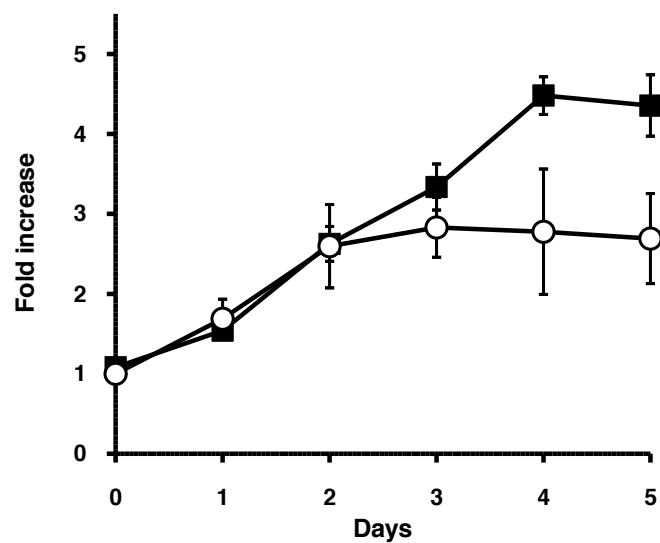


Figure 2

A



B

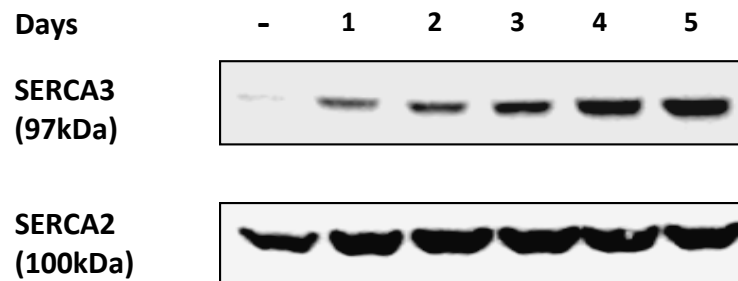
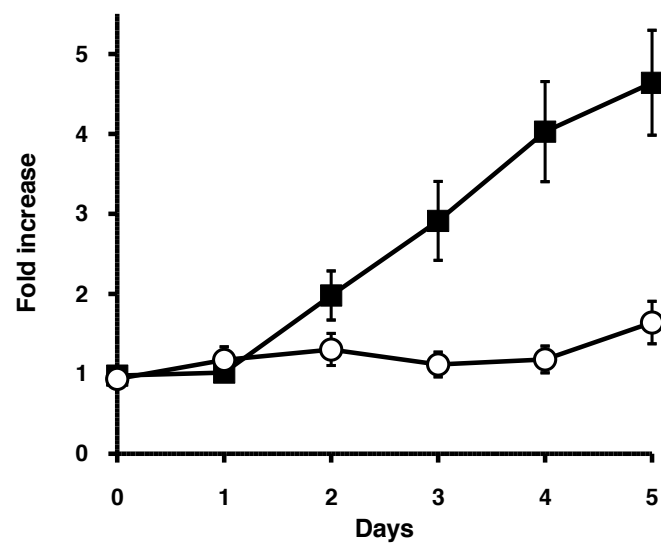
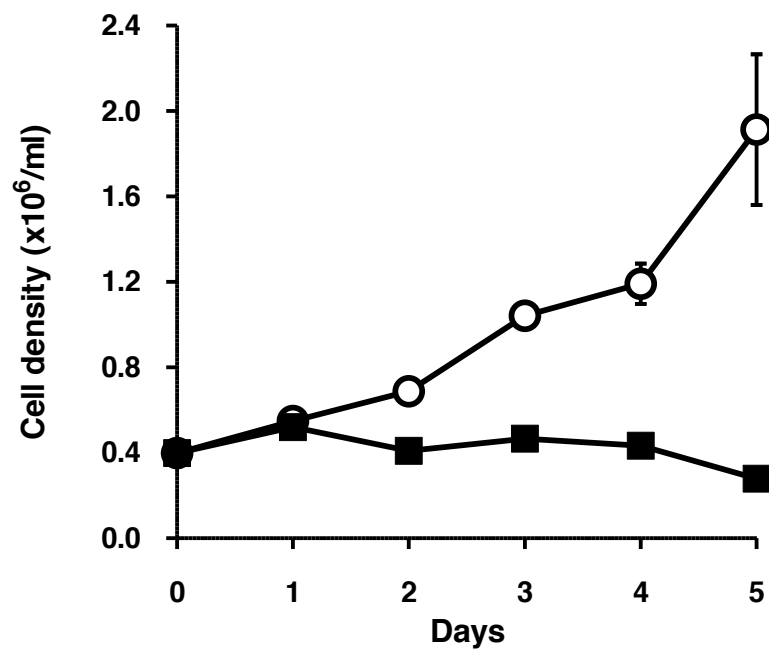


Figure 3

A



B

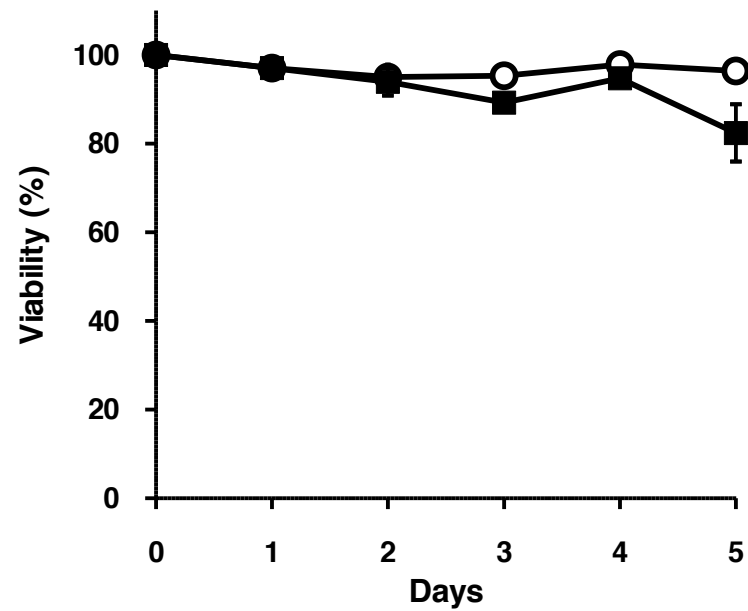
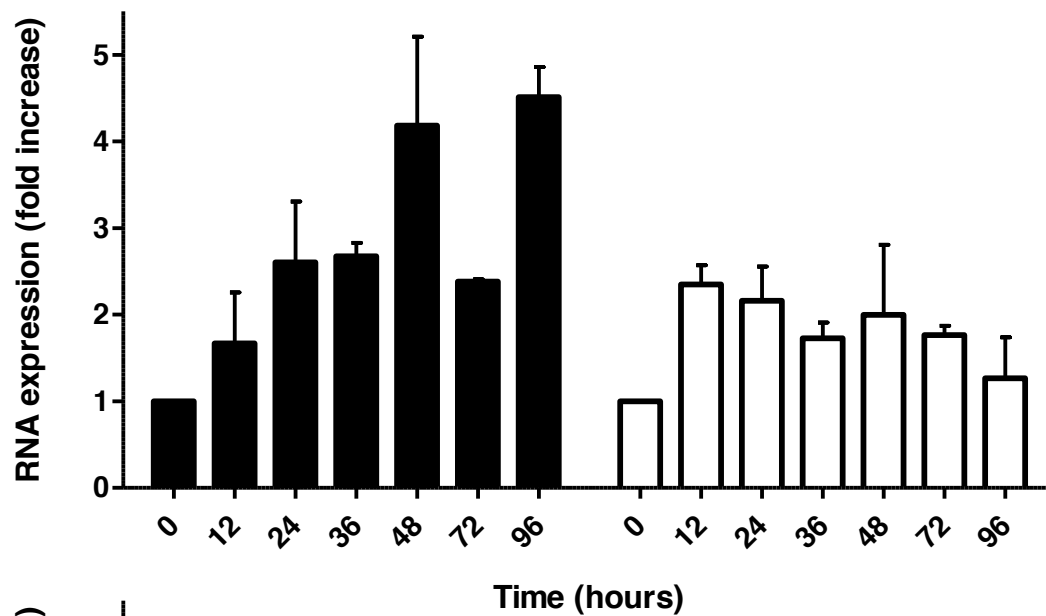


Figure 4

A



B

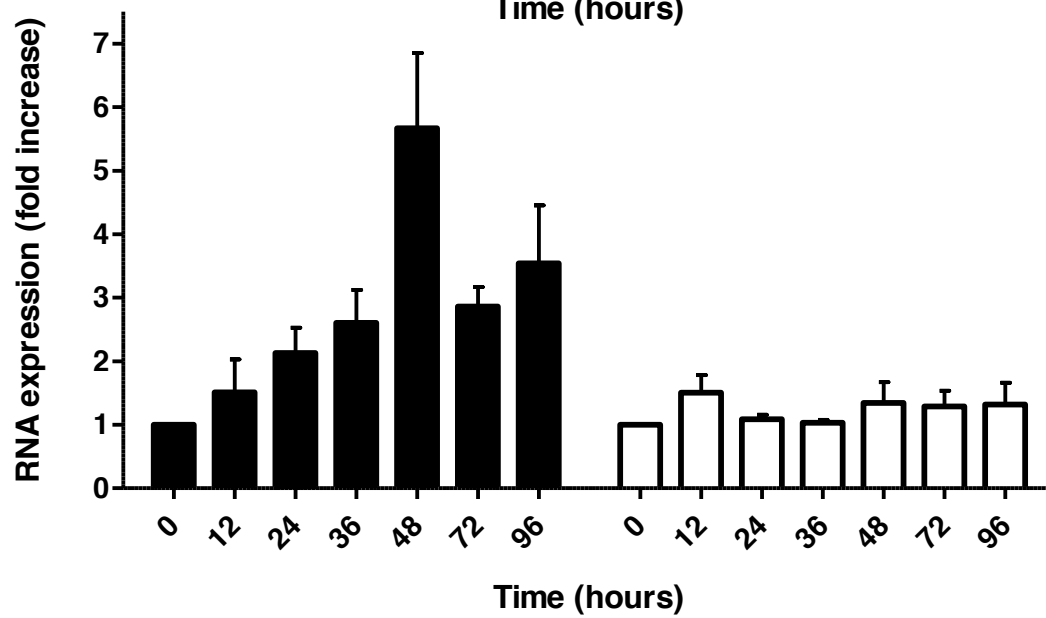


Figure 5

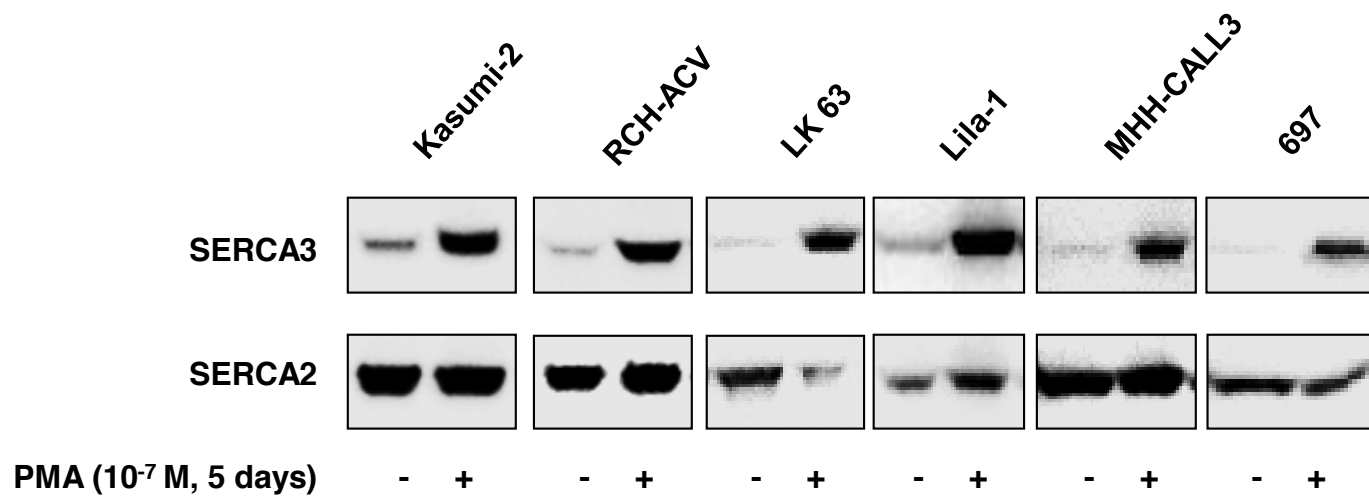


Figure 6

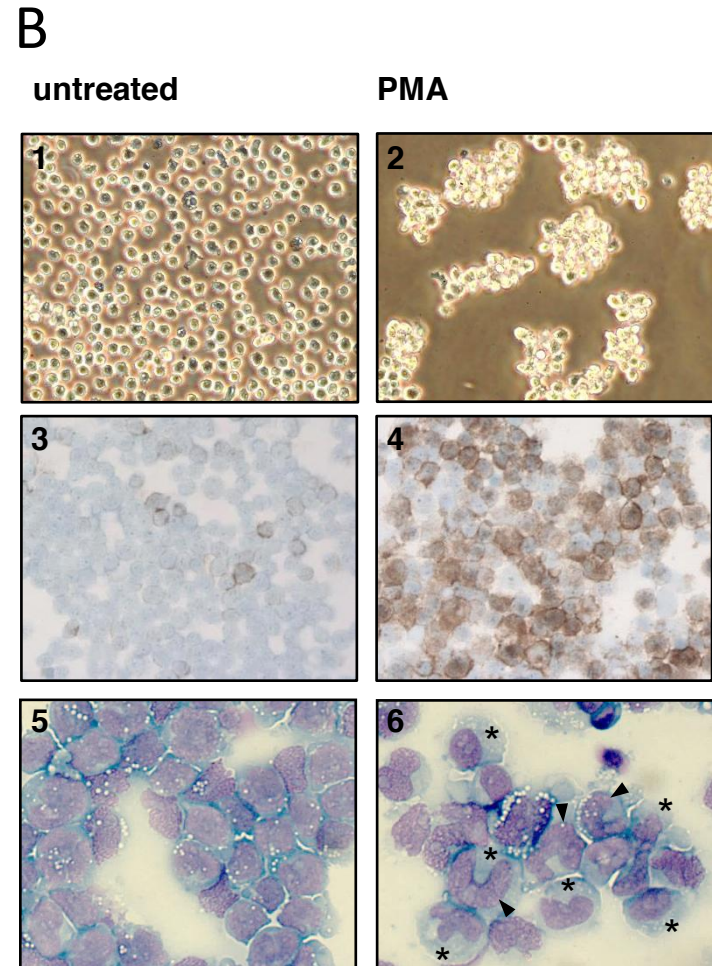
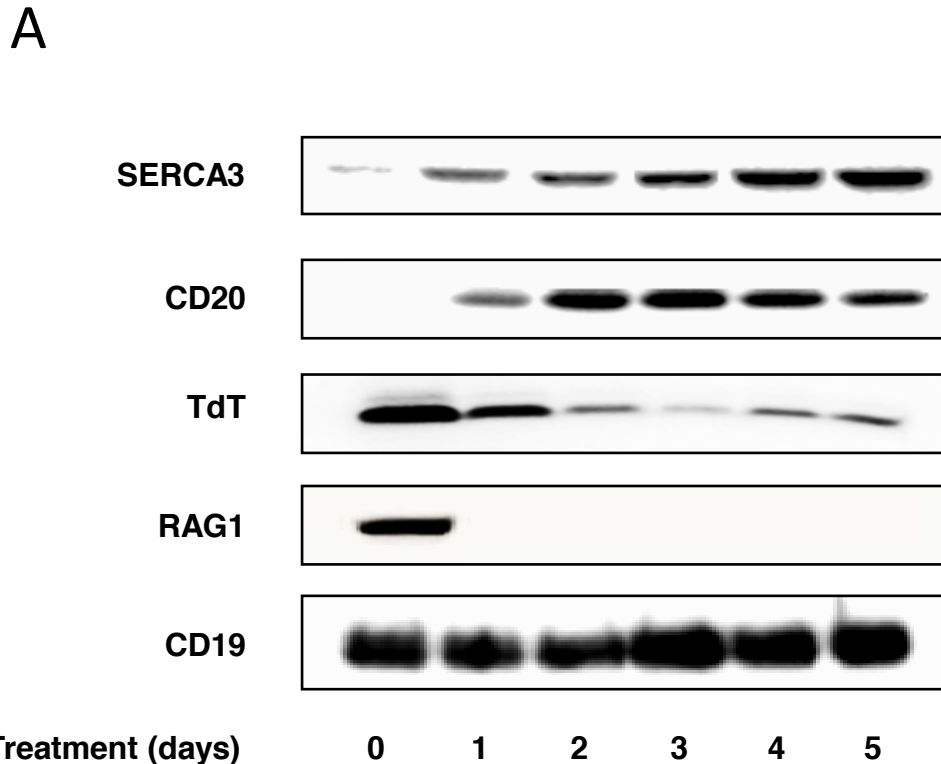
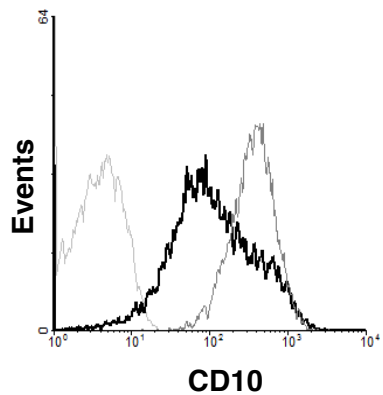
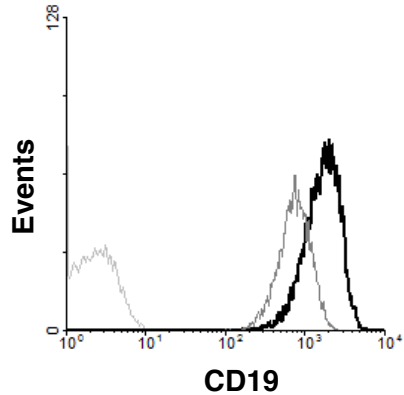


Figure 7

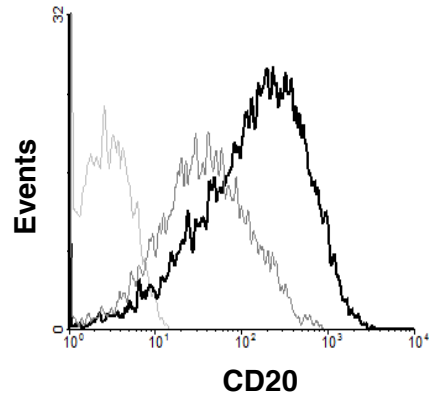
A



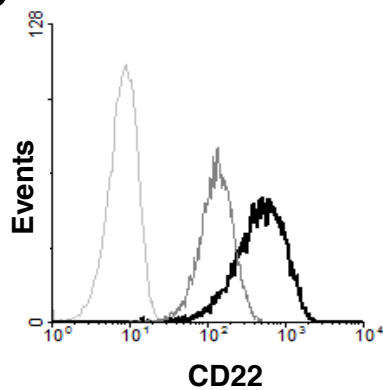
B



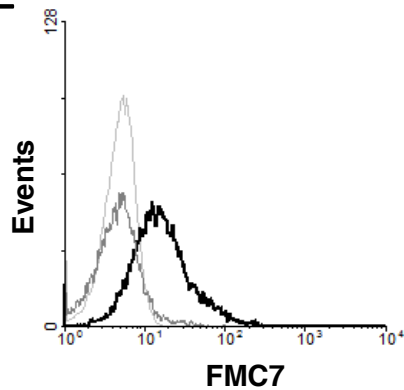
C



D



E



F

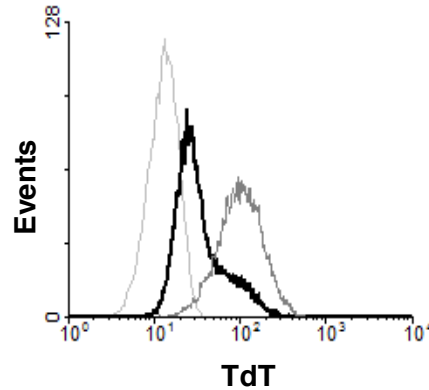


Figure 8

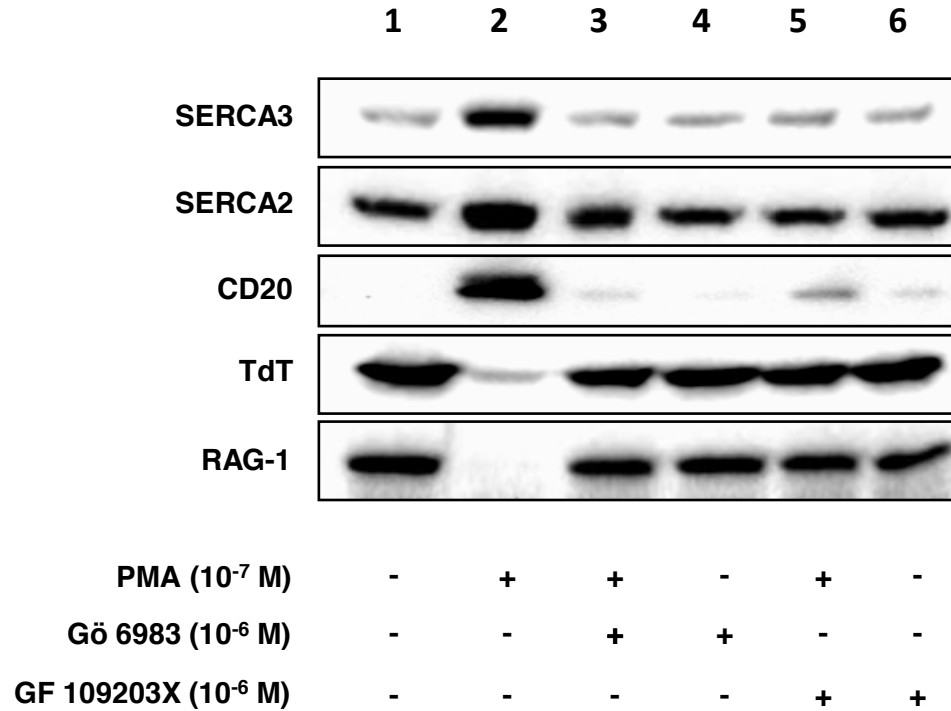
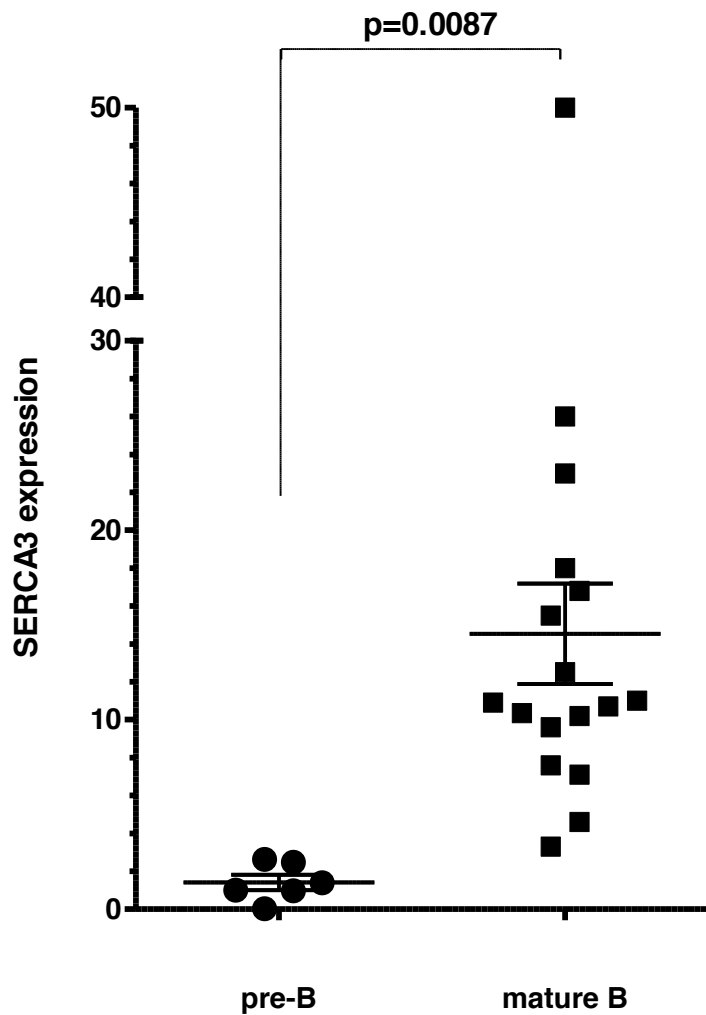


Figure 9

A



B

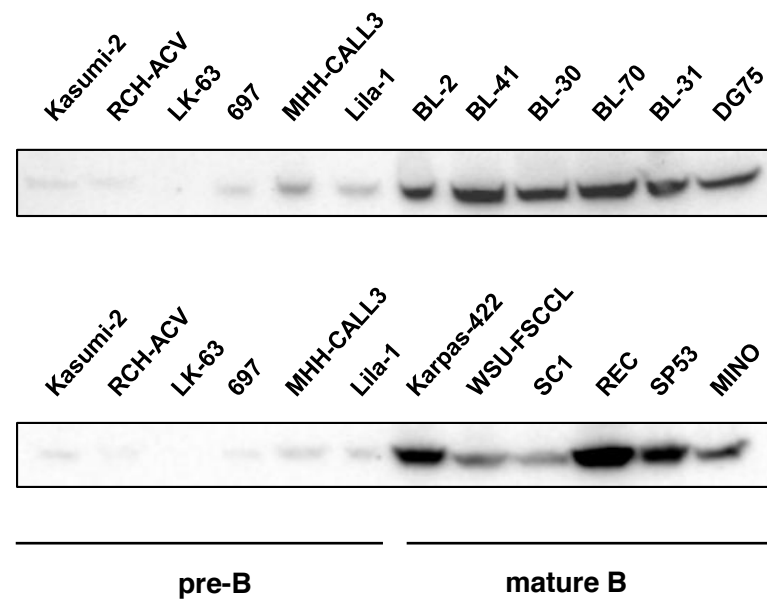
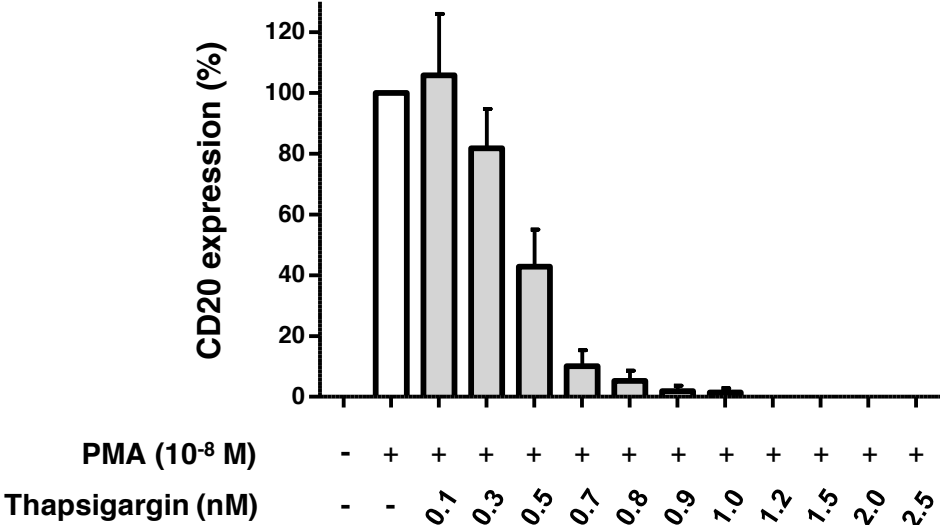
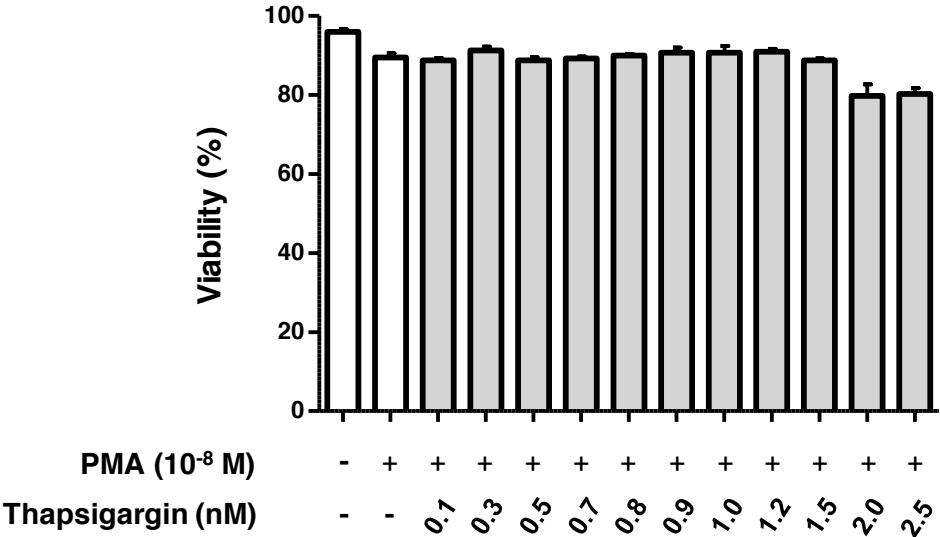


Figure 10

A



B



Supplemental Table I

Cell line	Hematological origin	Reference		
Kasumi-2	t(1;19) E2A-PBX1	Akbari Moqadam et al. <i>Leukemia</i> 2014 [#]		
RCH-ACV		Jack et al. <i>Cancer Genet Cytogenet</i> 1986 [#]		
LK-63		Salvaris et al. <i>Leuk Res</i> 1992		
Lila-1		Tomeczkowski et al. <i>Br J Haematol</i> 1995 [#]		
MHH-CALL-3		Findley et al. <i>Blood</i> 1982 [#]		
697		Matsuo et al. <i>Hum Cell</i> (1991) [#]		
Nalm-21		t(9;22) BCR-ABL	Okabe et al. <i>Blood</i> 1987	
TOM-1			Pegoraro et al. <i>J Natl Canc Inst</i> 1983	
BV173			Nakazawa et al. <i>Jpn J Clin Hematol</i> 1978 [#]	
KOPN-8		t(11;19) MLL-ENL (MLL-MLLT1)	Rosenfeld et al. <i>Nature</i> 1977 [#]	
Reh	t(12;21) TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)			
BL-2	Burkitt's lymphoma (EBV ^{neg})	Lenoir et al. <i>IARC Sci Publ</i> 1985		
BL-30				
BL-31				
BL-41				
BL-70				
D.G.-75			Ben-Bassat et al. <i>Intl J Cancer</i> 1997	
BJA-B			Menezes et al. <i>Biomedicine</i> 1975	
Ramos			Klein et al. <i>Intervirology</i> 1975*	
HBL-2			mantle cell lymphoma	Abe et al. <i>Cancer</i> 1988
MAVER-1				Zamo et al. <i>Haematologica</i> 2006
JEKO-1	Jeon et al. <i>Br. J. Haematol.</i> 1998			
Mino	Lai et al. <i>Leuk Res</i> 2002 [°]			
REC-1	Raynaud et al. <i>Genes Chromosomes Cancer</i> 1993			
Karpas-422	follicular lymphoma	Martin et al. <i>Blood</i> 1990 [#]		
Sc-1		Th'ng et al. <i>Int J Cancer</i> 1987 [#]		
WSU-FSCCL		Mohammad et al. <i>Cancer Genet Cytogenet</i> 1993 [#]		

Table 1: Origin and characterization of the cell lines used in this study ([#]DSMZ, [°]ATCC, *ECACC).

DISCUSSION

Les ATPases calciques de type SERCA constituent le seul mécanisme d'accumulation de calcium dans la lumière du réticulum endoplasmique, indispensable à de nombreux mécanismes de réponse cellulaire. Le calcium accumulé dans le RE est essentiel non seulement pour l'initiation et le contrôle de la signalisation calcique cellulaire, mais également pour la maturation de protéines nouvellement synthétisées qui transitent à travers cet organelle. Les SERCAs constituent ainsi un point nodal important et unique dans l'homéostasie calcique cellulaire, et la modulation de l'expression des enzymes de type SERCA peut avoir des conséquences importantes sur le phénotype cellulaire.

Dans un contexte tumoral, la modulation de l'activité de transport des enzymes de type SERCAs peut influencer la survie, la prolifération, la dépendance aux cytokines des cellules tumorales. Les travaux antérieurs de notre équipe ont mis en évidence l'importance des pompes de type SERCA dans ces différents mécanismes. L'utilisation de leurs inhibiteurs a également montré l'importance de ces pompes dans le fonctionnement cellulaire. En fonction du type cellulaire étudié, l'inhibition des pompes SERCA peut déclencher la différenciation, l'apoptose ou l'arrêt de prolifération des cellules. Deux de ses inhibiteurs sélectifs, la thapsigargine et le CPA, sont considérés comme des promoteurs de tumeurs.

De plus, l'inactivation du gène SERCA2 provoque l'apparition de cancers de l'épithélium Malpighien dans un modèle murin [109], des mutations inactivatrices ont été décrites au niveau de SERCA2 et SERCA3 dans plusieurs types de tumeurs [134], et une diminution de l'expression de SERCA3 est retrouvée au cours de la tumorigenèse colique, mammaire et pulmonaire [83], [94], [117]. L'ensemble de ces observations indique que les SERCAs jouent un rôle important dans la différenciation cellulaire et dans le maintien du phénotype tumoral.

En nous basant sur ces données, dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons étudié l'expression des enzymes de type SERCA au cours de la différenciation cellulaire, afin de mieux appréhender leur rôle et pour mieux comprendre la régulation du calcium au cours de ce processus. Pour cela nous avons utilisé deux modèles de la différenciation : l'épithélium du plexus choroïde et les lymphocytes pré-B de la LAL-B t(1 ; 19).

Expression des SERCAs dans l'épithélium du plexus choroïde sain et tumoral

Nos études, effectuées sur plexus choroïde indiquent, que cet épithélium exprime simultanément SERCA2 et SERCA3, alors qu'avant nos travaux l'identité des pompes calciques exprimées dans ce tissu n'était pas connue. Le marquage immunohistochimique de SERCA3 montre que l'épithélium du plexus choroïde normal exprime fortement cette pompe. Cette observation indique que l'expression de SERCA3 fait partie du programme physiologique de la différenciation de ces cellules.

SERCA3 est fortement exprimée dans l'hyperplasie du plexus choroïde, alors que son expression diminue fortement dans les tumeurs. En effet, dans les papillomes de grade I, l'expression de SERCA3 est déjà diminuée. Cette observation représente un intérêt dans le traitement des tumeurs du plexus choroïde, qui se fait par chirurgie, car la distinction entre l'hyperplasie et les papillomes de grade I est difficile, puisque, sur des petites biopsies les deux se ressemblent histologiquement. Cependant, l'approche chirurgicale de ces deux types de lésions est très différente. Alors que dans l'hyperplasie une résection partielle est généralement suffisante, dans les adénomes, lésions proliférantes, une ablation totale est recherchée. L'immunomarquage de SERCA3, peut permettre de différencier les deux types de lésions, puisque l'expression de SERCA3 est maintenue dans l'hyperplasie, alors qu'elle est fortement diminuée ou absente dans les adénomes.

Il est intéressant de noter que l'expression différentielle entre lésions hyperplasiques et tumorales a été également mise en évidence par notre équipe dans l'épithélium colique (expression forte dans les polypes hyperplasiques de Morson et expression diminuée dans les tumeurs) [83]. L'ensemble de ces résultats indique que les différences d'expression de SERCA3 retrouvées d'une part entre tissu normal et ses lésions tumorales et d'autre part entre lésions hyperplasiques et tumorales reflètent un phénomène général, et que SERCA3 peut être considérée comme marqueur néoplasique « par défaut d'expression » dans de nombreux tissus.

Induction de l'expression de SERCA3 au cours de la différenciation des cellules primaires du plexus choroïde :

Nous avons également montré que l'expression de SERCA3 augmente au cours du traitement cyto-différenciateur par les acides gras à chaîne courte (AGCC) dans les cellules primaires du plexus choroïde, cultivées *in vitro*. L'effet cyto-différenciateur des AGCC a été retrouvé dans plusieurs autres modèles cellulaires, y compris les cellules épithéliales coliques [83], gastrique et broncho-pulmonaire tumorales [117], ou encore les cellules issues de différents types de leucémies myéloïdes ou promyélocytaires [124], [125]. Ainsi, l'induction de l'expression de SERCA3 observée dans les cellules épithéliales du plexus choroïde sous traitement par les AGCC suggère que ce phénomène fait aussi partie du programme de différenciation de ces cellules.

Etude de l'homéostasie calcique au cours de la différenciation induite pharmacologiquement des lymphocytes B leucémiques.

L'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique est très importante dans les lymphocytes B, et ceci à plusieurs stades de leur différenciation : la survie des cellules B immatures, ainsi que l'activation des lymphocytes B matures par l'antigène dépend, *via* les axes PKC/NF- κ B et calcineurine/NFAT, de signaux calciques initiés depuis le réticulum endoplasmique. Les signaux calciques contribuent également à la survie et à la prolifération des cellules B leucémiques, et constituent une cible pharmacologique prometteuse. Les travaux antérieurs de notre équipe ont montré une forte expression de SERCA3 dans les lymphocytes B matures non activés [119]. Pour élucider les origines de cette forte expression, durant ce travail je me suis intéressée aux stades de la différenciation lymphoïde précoce pour déterminer à quel stade les lymphocytes B acquièrent l'expression de SERCA3, et quelles sont les ATPases calciques intra-réticulaires exprimées dans ces premiers stades de différenciation.

Dans cette étude, nous avons voulu induire la différenciation par les esters de phorbol (PMA), dans les lymphocytes pré-B leucémiques. Cette hypothèse de travail a été basée sur les travaux antérieurs de notre équipe, où ce traitement induisait la différenciation des cellules de la leucémie promyélocytaire aigüe, et d'autres types de leucémies myéloïdes [124], [125]. Cela indique que le PMA est un outil pharmacologique valable pour l'induction de la différenciation de cellules malignes d'origine hématopoïétique. Le choix des lignées de la leucémie LAL portant la translocation t(1;19) E2A-PBX1 s'est fait suite aux

traitements de différentes lignées pré-B par le PMA. Dans les lignées t(1;19) ce traitement induisait la différenciation cellulaire alors que les autres lignées pré-B mouraient rapidement sous l'effet du PMA. Ce résultat indique que les lignées portant la translocation t(1;19) forment un sous type moléculaire dans lequel le traitement avec des analogues de DAG induit la différenciation pouvant lever le blocage de ces cellules dû à l'expression de l'oncoprotéine E2A-PBX1. Ceci constitue une observation potentiellement intéressante pour la recherche de traitement pour cette pathologie.

L'étude de l'expression des SERCAs dans ces lignées montre que ces lymphoblastes expriment simultanément les isoformes SERCA2 et SERCA3. L'induction de la différenciation est suivie d'une forte augmentation de l'expression de SERCA3 dans toutes les lignées portant la translocation t(1;19) étudiées. Cette induction est dose dépendante, l'effet est visible dès 1 nM de PMA en accord avec la littérature sur l'effet de cette molécule sur cellules cultivées *in vitro*, et similaire aux observations obtenues sur d'autres modèles de différenciation [121][124]. Cette différenciation suit une cinétique sur 3 à 5 jours. L'analyse, par RT-PCR quantitative, de l'évolution des taux d'ARN messenger au cours des traitements indique que l'induction de l'expression des enzymes SERCA se situe au niveau ARN messenger, soulevant un mécanisme transcriptionnel ou concernant la régulation de stabilité des ARNm.

L'induction de la différenciation et de l'expression de SERCA3 a été également retrouvée lors de l'utilisation d'un inducteur physiologique, le DAG ; cependant cette induction n'est pas aussi forte que celle obtenue par le PMA, probablement à cause de la dégradation physiologique de ce ligand dans ces cellules. L'induction de l'expression de SERCA3 est accompagnée de la modulation de l'expression d'autres marqueurs de différenciation établis tels que la TdT, RAG, CD19 et le CD20, indiquant que c'est un vrai phénomène de différenciation ; sans pour autant atteindre un stade B mature puisque l'expression des immunoglobulines de surface n'a pas été observée.

Le PMA est connu comme un activateur des protéines kinases C, cependant, il peut activer d'autres voies de signalisation dans la cellule telles que la signalisation impliquant Ras via l'activation du RasGRP1 et 3, facteur d'échange (guanine nucleotide exchange factor) qui possèdent un site de fixation pour le DAG/PMA. Toutefois l'abolition de l'effet du PMA par des inhibiteurs des PKCs (Gö 6983 et le GF 109203X) sur nos lignées montre que l'induction de la différenciation cellulaire et de l'expression de SERCA3 sont médiées par la PKC.

L'inhibition pharmacologique de la voie des MAP-kinases par des inhibiteurs tels que le PD98059 et le UO126 n'a pas d'effet significatif sur la différenciation cellulaire et l'expression de SERCA3 écartant ainsi l'implication de cette voie de signalisation dans le processus de différenciation des lignées t(1;19) E2A/PBX1 induite par le PMA.

Pour mettre en évidence une interaction fonctionnelle entre l'activité de transport des enzymes de type SERCA et le contrôle de la différenciation, nous avons inhibé l'activité des pompes SERCAs avec des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de ces enzymes (TG, tBHQ, CPA). Nos résultats indiquent que l'activité des SERCAs est nécessaire pour la différenciation de ces cellules, car ces inhibiteurs perturbent la différenciation cellulaire, puisque l'inhibition de l'activité de transport des pompes calciques du RE mène à l'inhibition de l'expression du CD20 induite par le PMA. Ces résultats indiquent que l'augmentation de l'expression de SERCA3 n'est pas une conséquence passive de la différenciation cellulaire.

Les lymphocytes B normaux non activés expriment fortement SERCA3, cela a été démontré par marquage immuno-histochimique sur ganglions lymphatiques, marquage fort dans les follicules primaires et dans les régions de manteau des follicules secondaires [119]. Ceci indique que l'expression de SERCA3 fait partie du programme physiologique de différenciation des LB normaux. Nos résultats montrent que cette expression est acquise dans les premiers stades de maturation de ces cellules. Cette observation a été renforcée par l'étude de l'expression de SERCA3 dans un grand nombre de lignées leucémiques B matures, qui, contrairement aux lignées pré-B, expriment fortement SERCA3. Cela indique qu'il existe une différence d'expression de SERCA3 entre les lignée pré-B et B matures, et que cette différence d'expression peut servir de marqueur phénotypique pour la différenciation de ces cellules. Il sera également intéressant d'étudier la fonction et la régulation d'expression des enzymes de type SERCA au cours de la différenciation lymphoïde B précoce normale sur différentes populations précoces lymphoïdes B isolées de la moelle osseuse ou en se basant sur des modèles de différenciation de la cellule souche hématopoïétique *in vitro*.

Les recherches que nous avons effectuées dans les bases de données de transcriptomes disponibles, indiquent que l'induction de l'expression de SERCA3 fait partie également du programme de différenciation lymphoïde B précoce normale. En effet, l'analyse des données accessibles sur le site ImmGen, montre une augmentation des taux d'ARNm de SERCA3 au

cours de la différenciation lymphoïde B précoce normale, alors que les taux d'ARNm de SERCA2 sont peu modifiés [135].

Homéostasie calcique et différenciation

Les caractéristiques biochimiques de SERCA2 et SERCA3 étant distinctes par leurs différences d'affinité vis-à-vis du calcium et de vitesse maximale de transport, un changement dans le rapport de leur expression peut potentiellement conduire à des modifications de l'homéostasie calcique de la cellule en modifiant les caractéristiques spatio-temporelles des signaux et oscillations calciques. On peut formuler l'hypothèse, que l'accumulation dans la cellule de SERCA3, isoforme de plus faible affinité vis-à-vis du calcium, permet à la cellule de former des signaux calciques de plus grande amplitude qu'en présence de SERCA2b. Nous proposons que l'induction de l'expression de SERCA3 au cours de la différenciation lymphoïde B fait partie d'un programme de maturation au cours duquel le réticulum endoplasmique devient capable de tolérer un relargage de calcium d'amplitude plus importante, requis pour les réponses calciques qui caractérisent l'activation, dépendante de l'antigène, des lymphocytes B matures.

Mes résultats montrent que l'induction de l'expression des enzymes de type SERCA, médiée par les PKCs, fait partie du programme de différenciation des lymphoblastes B leucémiques, différenciation qui peut être déclenchée pharmacologiquement dans les cellules de LAL-B t(1 ;19). Ainsi, nos travaux révèlent, pour la première fois, que l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique peut être remodelée au cours de la différenciation lymphoïde B précoce.

Les retombées utiles

En plus de l'intérêt du remodelage de l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique pour la recherche fondamentale, les observations présentées dans cette thèse pourront avoir des retombées, à terme, pour le diagnostic également. Une étude des taux d'expression de SERCA3 peut être utile au pathologiste pour l'analyse des lésions tumorales de l'épithélium du plexus choroïde, parce que des différences importantes ont été observées entre tumeurs bénignes, tumeurs malignes et lésions hyperplasiques, ainsi que pour l'étude de l'état de maturations des cellules lymphoïdes B.

Les SERCAs représentent une cible thérapeutique potentielle pour le traitement du cancer. L'inhibition de SERCA par des agents tels que la thapsigargine conduit au stress du RE et à

l'activation simultanée des voies apoptotiques au sein du RE et des mitochondries. Pour cela, il faut que les SERCA soient ciblées sélectivement dans les cellules cancéreuses. On peut coupler la thapsigargine à une molécule qui peut agir spécifiquement sur la cellule cancéreuse. Par exemple, dans le cancer de la prostate, cela est possible grâce à un couplage de la thapsigargine à un peptide clivé uniquement par des protéases spécifiques de la prostate tel que l'antigène spécifique de sérine protéase (PSA). Des promédicaments de thapsigargine activés par PSA ont été caractérisés comme étant sélectivement toxiques contre des cellules de cancer de la prostate produisant du PSA in vitro et in vivo [136]. Ces promédicaments sont actuellement en cours d'évaluation préclinique comme thérapies potentielles ciblées contre le cancer de la prostate.

Nos résultats sur l'induction de la différenciation dans la leucémie aigüe lymphoblastique, par l'activation des PKC, suggèrent une approche thérapeutique encore inexplorée pour le traitement de cette leucémie. La modulation des PKCs représente une nouvelle approche de la thérapie contre le cancer. La bryostatine 1 est un puissant activateur des PKCs qui présente un profil pharmacologique plus favorable que celui du PMA, utilisé dans nos travaux. Le traitement à court terme de cette molécule favorise l'activation des PKC classiques et conventionnelles. Dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales hématopoïétiques, la bryostatine1 inhibe la prolifération, induit une différenciation et favorise l'apoptose [137]. Cette molécule est actuellement en essais cliniques, et grâce à notre étude elle peut être envisagée dans les thérapie de LAL-B t (1 ;19) E2A-PBX1.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusions

Mes travaux, réalisés sur deux types de modèles indépendants, montrent que l'homéostasie calcique du réticulum endoplasmique est remodelée au cours de la différenciation cellulaire. L'expression des SERCAs est modulée de façon dynamique au cours de la différenciation des deux types cellulaires étudiés. La modulation de l'expression des pompes de type SERCA a été retrouvée dans les lignées cellulaires étudiées *in vitro*, ainsi que dans les cellules primaires cultivées *ex vivo* et dans les échantillons tissulaires pathologiques *in situ*. Elle peut être induite par des drogues pharmacologiques d'intérêt clinique (phénylbutyrate, valporate), ou par des inducteurs pharmacologiques ou physiologiques de l'activation des enzymes PKC.

Les données obtenues dans ce travail de thèse montrent donc qu'il existe une régulation différentielle de l'expression des différents isoformes SERCAs au cours de la différenciation cellulaire. Ce phénomène reflète probablement une différence dans les rôles respectifs des deux isoformes, SERCA2 et SERCA3. L'ensemble de ces résultats met en évidence le remodelage de l'homéostasie calcique du RE lors de la différenciation afin d'acquérir une configuration modifiée qui répond mieux aux exigences des nouvelles fonctions effectrices des cellules matures, mécanismes défectueux dans les cancers.

Perspectives

Inhibition des enzymes de types SERCA

Mes travaux ont permis de mettre en évidence l'identité des pompes calciques exprimées aux stades précoces de la lymphopoïèse B et dans l'épithélium du plexus choroïde, ainsi que la nature dynamique de la régulation de leur expression. Cependant les mécanismes d'action et les voies de signalisation impliqués dans l'expression des gènes SERCAs ne sont pas complètement élucidés. Pour caractériser l'expression des pompes SERCAs dans la différenciation des cellules tumorales, il serait intéressant d'inhiber leur expression par des sh-RNA ou par le biais du système CRISPR/Cas-9. Cela permettra de suivre les changements phénotypiques des cellules au cours de la surexpression ou de l'inhibition d'expression des SERCAs, et de mettre en évidence les effets spécifiques des différentes isoformes.

Transfection des SERCAs recombinantes

Afin de caractériser l'implication des enzymes de type SERCA3 dans la différenciation des cellules du cancer du PC et des cellules pré-B leucémiques, il serait intéressant d'étudier l'effet de leur surexpression sur le phénotype, la prolifération et le potentiel de différenciation des cellules. Ces expériences pourront être réalisées sur tous les systèmes dans lesquels l'expression des SERCAs est modifiée (LAL-B, cancer du côlon, du sein, cancers broncho-pulmonaire, hémopathies myéloïdes, etc). Les différentes isoformes recombinantes de SERCA3 pourront être transfectées dans des lignées cellulaires correspondantes. Après obtention de clones stables, les changements phénotypiques éventuels pourront être détectés. Il serait également intéressant de générer des clones cellulaires transfectés par des vecteurs permettant l'expression inductible des ADNc des différentes isoformes de SERCA3. L'utilisation des systèmes inductibles permettrait de suivre l'effet de l'expression des SERCAs recombinantes sur l'évolution du phénotype au sein de la même cellule, avant, et après induction du transgène.

Etude de l'homéostasie calcique au cours de la différenciation

En utilisant des chélateurs de calcium tel que le Fluo-4, il est possible de mesurer en temps réel, sur des cellules vivantes, la concentration calcique cytosolique. Cette technique est basée sur le fait que les caractéristiques de fluorescence de ces chélateurs sont modifiées lors de leur liaison avec les ions Ca^{2+} . La mesure de l'intensité de fluorescence des cellules, dont le cytosol est chargé en Fluo-4, permettrait de mesurer la concentration du calcium dans

le cytosol à l'aide d'un spectrofluorimètre, microscopie confocale ou par cytométrie de flux. Les cellules peuvent être stimulées par des agonistes, l'IP3, par des inhibiteurs des SERCAs ou encore en utilisant des ionophores calciques afin de quantifier la capacité de stockage du Ca^{2+} dans le RE.

Ce type d'études peut être effectué sur des cellules contrôles et différenciées, ou traitées par les agents cytodifférenciateurs, pour déterminer la concentration calcique cytosolique au repos, et la quantité de calcium stocké dans le RE. Etant donné que SERCA3 a été associée aux réserves calciques mobilisables par l'IP3, nous pouvons nous attendre à observer une augmentation de la quantité de calcium accumulé dans le compartiment mobilisable pas l'IP3 dans les cellules différenciées.

Après l'analyse de la concentration calcique cytosolique, il serait également intéressant de procéder à une étude directe de la concentration de calcium stocké dans la lumière du RE. Pour cela on peut utiliser les protéines « cameleons » qui sont des chimères constituées de la GFP (protéine fluorescente), ou de ses dérivées, et des séquences peptidiques liant le calcium, portant également des signaux de rétention dans le RE.

Ces systèmes de détection peuvent nous permettre de comparer la concentration du calcium dans la lumière du RE, des cellules contrôles et différenciées, au repos, et après stimulation. Ces travaux permettraient d'analyser de manière quantitative, la réorganisation de l'homéostasie calcique du RE ayant lieu au cours de la différenciation des cellules malignes.

Etudes des cellules primaires

L'étude d'expression de SERCA3 au cours de la différenciation pré-B leucémique peut être complétée sur cellule B normales. Pour réaliser cette étude, on peut obtenir des cellules pré-B par tri cellulaire, en utilisant les marqueurs CD34, CD38, CD45RA et CD19, à partir de cellules de sang du cordon ombilical et cultivées *in vitro* dans des conditions favorisant la différenciation B précoce. Les populations cellulaires triées correspondraient au phénotype de cellules à différents stades précoces du développement lymphocytaire B. L'étude de l'expression de SERCA3 dans ces cellules par immunocytochimie permettra d'établir à quel stade de différenciation se situe l'induction de l'expression de SERCA3 au cours de la différenciation lymphoïde B normale.

Ces expériences peuvent être reproduites et validées pour mesurer les taux d'expression des enzymes de type SERCA sur cellules fraîches, isolées à partir de sang de patients atteints de LAL-B pro- ou pré-B. Elles permettront également de mettre en évidence, si nos résultats obtenus sur des lignées cellulaires peuvent être retrouvés également *ex vivo* chez l'homme.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] L. Munaron, S. Antoniotti, and D. Lovisolo, "Intracellular calcium signals and control of cell proliferation: how many mechanisms?," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 8, no. 2, pp. 161–168, Apr. 2004.
- [2] L. Munaron, S. Antoniotti, A. Fiorio Pla, and D. Lovisolo, "Blocking Ca²⁺ entry: a way to control cell proliferation.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 11, no. 12, pp. 1533–43, Jun. 2004.
- [3] S. Wang and W. S. El-Deiry, "Cytochrome c: a crosslink between the mitochondria and the endoplasmic reticulum in calcium-dependent apoptosis.," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 3, no. 1, pp. 44–6, Jan. 2004.
- [4] M. J. Berridge, M. D. Bootman, and H. L. Roderick, "Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 4, no. 7, pp. 517–529, Jul. 2003.
- [5] S. Arnaudeau, M. Frieden, K. Nakamura, C. Castelbou, M. Michalak, and N. Demaurex, "Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 48, pp. 46696–705, Nov. 2002.
- [6] M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, "The versatility and universality of calcium signalling.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 11–21, Oct. 2000.
- [7] D. Chin and A. R. Means, "Calmodulin: a prototypical calcium sensor," *Trends Cell Biol.*, vol. 10, no. 8, pp. 322–328, Aug. 2000.
- [8] Y. S. Babu, J. S. Sack, T. J. Greenhough, C. E. Bugg, A. R. Means, and W. J. Cook, "Three-dimensional structure of calmodulin.," *Nature*, vol. 315, no. 6014, pp. 37–40, Jan. .
- [9] S. Sackmann, U. Lichtenauer, I. Shapiro, M. Reincke, and F. Beuschlein, "Aldosterone producing adrenal adenomas are characterized by activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK) dependent pathways.," *Horm. Metab. Res.*, vol. 43, no. 2, pp. 106–11, Feb. 2011.
- [10] M. Kühl, L. C. Sheldahl, M. Park, J. R. Miller, and R. T. Moon, "The Wnt/Ca²⁺ pathway," *Trends Genet.*, vol. 16, no. 7, pp. 279–283, Jul. 2000.
- [11] I. M. Mansuy and S. Shenolikar, "Protein serine/threonine phosphatases in neuronal plasticity and disorders of learning and memory.," *Trends Neurosci.*, vol. 29, no. 12, pp. 679–86, Dec. 2006.
- [12] S. Ohno and Y. Nishizuka, "Protein kinase C isotypes and their specific functions: prologue.," *J. Biochem.*, vol. 132, no. 4, pp. 509–11, Oct. 2002.
- [13] W. Echevarría, M. F. Leite, M. T. Guerra, W. R. Zipfel, and M. H. Nathanson, "Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 5, no. 5, pp. 440–6, May 2003.
- [14] C. M. Alberini, "Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity," *Physiol. Rev.*, vol. 89, no. 1, 2009.
- [15] E. D. C. McFarland, K. M. Izumi, and G. Mosialos, "Epstein-Barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of

- NF- κ B,” *Oncogene*, vol. 18, no. 49, pp. 6959–6964, Nov. 1999.
- [16] M. Kaileh and R. Sen, “NF- κ B function in B lymphocytes,” *Immunol. Rev.*, vol. 246, no. 1, pp. 254–71, Mar. 2012.
- [17] L. K. Teixeira, N. Carrossini, C. Sécca, J. E. Kroll, D. C. DaCunha, D. V. Faget, L. D. S. Carvalho, S. J. de Souza, and J. P. B. Viola, “NFAT1 transcription factor regulates cell cycle progression and cyclin E expression in B lymphocytes,” *Cell Cycle*, vol. 15, no. 17, pp. 2346–2359, Sep. 2016.
- [18] R. A. Schulz and K. E. Yutzey, “Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development,” *Dev. Biol.*, vol. 266, no. 1, pp. 1–16, Feb. 2004.
- [19] A. M. Carrión, W. A. Link, F. Ledo, B. Mellström, and J. R. Naranjo, “DREAM is a Ca²⁺-regulated transcriptional repressor,” *Nature*, vol. 398, no. 6722, pp. 80–4, Mar. 1999.
- [20] B. Mellström, M. Savignac, R. Gomez-Villafuertes, and J. R. Naranjo, “Ca²⁺-Operated Transcriptional Networks: Molecular Mechanisms and In Vivo Models,” *Physiol. Rev.*, vol. 88, no. 2, 2008.
- [21] M. Osawa, K. I. Tong, C. Lilliehook, W. Wasco, J. D. Buxbaum, H. Y. Cheng, J. M. Penninger, M. Ikura, and J. B. Ames, “Calcium-regulated DNA binding and oligomerization of the neuronal calcium-sensing protein, calsenilin/DREAM/KChIP3,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 44, pp. 41005–13, Nov. 2001.
- [22] S. Sours-Brothers, R. Ma, and P. Koulen, “Ca²⁺-sensitive transcriptional regulation: direct DNA interaction by DREAM,” *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, vol. 14, pp. 1851–6, Jan. 2009.
- [23] J. Alvarez, M. Montero, and J. García-Sancho, “Subcellular Ca(2+) Dynamics,” *News Physiol. Sci.*, vol. 14, no. 4, pp. 161–168, Aug. 1999.
- [24] M. Michalak, P. Mariani, and M. Opas, “Calreticulin, a multifunctional Ca²⁺ binding chaperone of the endoplasmic reticulum,” *Biochem. Cell Biol.*, vol. 76, no. 5, pp. 779–85, Jan. 1998.
- [25] I. Yoshida, A. Monji, K. Tashiro, K. Nakamura, R. Inoue, and S. Kanba, “Depletion of intracellular Ca²⁺ store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells,” *Neurochem. Int.*, vol. 48, no. 8, pp. 696–702, Jun. 2006.
- [26] S. Chandra, E. P. Kable, G. H. Morrison, and W. W. Webb, “Calcium sequestration in the Golgi apparatus of cultured mammalian cells revealed by laser scanning confocal microscopy and ion microscopy,” *J. Cell Sci.*, vol. 100 (Pt 4, pp. 747–52, Dec. 1991.
- [27] P. Lin, H. Le-Niculescu, R. Hofmeister, J. M. McCaffery, M. Jin, H. Hennemann, T. McQuistan, L. De Vries, and M. G. Farquhar, “The mammalian calcium-binding protein, nucleobindin (CALNUC), is a Golgi resident protein,” *J. Cell Biol.*, vol. 141, no. 7, pp. 1515–27, Jun. 1998.
- [28] B. Honoré and H. Vorum, “The CREC family, a novel family of multiple EF-hand, low-affinity Ca(2+)-binding proteins localised to the secretory pathway of mammalian cells,” *FEBS Lett.*, vol. 466, no. 1, pp. 11–8, Jan. 2000.

- [29] K. Van Baelen, L. Dode, J. Vanoevelen, G. Callewaert, H. De Smedt, L. Missiaen, J. B. Parys, L. Raeymaekers, and F. Wuytack, "The Ca²⁺/Mn²⁺ pumps in the Golgi apparatus," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1742, no. 1, pp. 103–112, 2004.
- [30] P. Pinton, T. Pozzan, and R. Rizzuto, "The Golgi apparatus is an inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca²⁺ store, with functional properties distinct from those of the endoplasmic reticulum.," *EMBO J.*, vol. 17, no. 18, pp. 5298–308, Sep. 1998.
- [31] A. Surroca and D. Wolff, "Inositol 1,4,5-trisphosphate but not ryanodine-receptor agonists induces calcium release from rat liver Golgi apparatus membrane vesicles.," *J. Membr. Biol.*, vol. 177, no. 3, pp. 243–9, Oct. 2000.
- [32] P. J. Rogue and A. N. Malviya, "Calcium signals in the cell nucleus. Strasbourg, France, August 20-23, 1998.," *EMBO J.*, vol. 18, no. 19, pp. 5147–52, Oct. 1999.
- [33] M. A. Rodrigues, D. A. Gomes, M. H. Nathanson, and M. F. Leite, "Nuclear calcium signaling: a cell within a cell.," *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 42, no. 1, pp. 17–20, Jan. 2009.
- [34] J. P. Humbert, N. Matter, J. C. Artault, P. Köppler, and A. N. Malviya, "Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes.," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 1, pp. 478–85, Jan. 1996.
- [35] P. Marius, M. T. Guerra, M. H. Nathanson, B. E. Ehrlich, and M. F. Leite, "Calcium release from ryanodine receptors in the nucleoplasmic reticulum.," *Cell Calcium*, vol. 39, no. 1, pp. 65–73, Jan. 2006.
- [36] D. F. Babcock and B. Hille, "Mitochondrial oversight of cellular Ca²⁺ signaling.," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 8, no. 3, pp. 398–404, Jun. 1998.
- [37] R. Rizzuto, "Microdomains of Intracellular Ca²⁺: Molecular Determinants and Functional Consequences," *Physiol. Rev.*, vol. 86, no. 1, pp. 369–408, Jan. 2006.
- [38] M. Hoth, C. M. Fanger, and R. S. Lewis, "Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes.," *J. Cell Biol.*, vol. 137, no. 3, pp. 633–48, May 1997.
- [39] J. A. Gilibert and A. B. Parekh, "Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC).," *EMBO J.*, vol. 19, no. 23, pp. 6401–7, Dec. 2000.
- [40] R. Rizzuto, M. R. Duchen, and T. Pozzan, "Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison.," *Sci. STKE*, vol. 2004, no. 215, p. re1, Jan. 2004.
- [41] H. Malhi and R. J. Kaufman, "Endoplasmic reticulum stress in liver disease.," *J. Hepatol.*, vol. 54, no. 4, pp. 795–809, Apr. 2011.
- [42] R. V Rao, H. M. Ellerby, and D. E. Bredesen, "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program.," *Cell Death Differ.*, vol. 11, no. 4, pp. 372–80, Apr. 2004.
- [43] P. Lin, Y. Yao, R. Hofmeister, R. Y. Tsien, and M. G. Farquhar, "Overexpression of CALNUC (nucleobindin) increases agonist and thapsigargin releasable Ca²⁺ storage in the Golgi.," *J. Cell Biol.*, vol. 145, no. 2, pp. 279–89, Apr. 1999.

- [44] E. C. Thrower, R. E. Hagar, and B. E. Ehrlich, "Regulation of Ins(1,4,5)P₃ receptor isoforms by endogenous modulators," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 22, no. 11, pp. 580–586, Nov. 2001.
- [45] T. Nakagawa, H. Okano, T. Furuichi, J. Aruga, and K. Mikoshiba, "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.*, vol. 88, no. 14, pp. 6244–8, Jul. 1991.
- [46] C. L. Newton, G. A. Mignery, and T. C. Südhof, "Co-expression in vertebrate tissues and cell lines of multiple inositol 1,4,5-trisphosphate (InsP₃) receptors with distinct affinities for InsP₃.," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 46, pp. 28613–9, Nov. 1994.
- [47] M. J. Berridge, "Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms.," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1793, no. 6, pp. 933–40, Jun. 2009.
- [48] D. M. Bers, "Cardiac excitation–contraction coupling," *Nature*, vol. 415, no. 6868, pp. 198–205, Jan. 2002.
- [49] T. R. Cheek, "Expression and Function of Ryanodine Receptors in Nonexcitable Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 11, pp. 6356–6362, Mar. 1996.
- [50] P. Mariot, N. Prevarskaya, M. M. Roudbaraki, X. Le Bourhis, F. Van Coppenolle, K. Vanoverberghe, and R. Skryma, "Evidence of functional ryanodine receptor involved in apoptosis of prostate cancer (LNCaP) cells.," *Prostate*, vol. 43, no. 3, pp. 205–14, May 2000.
- [51] A. des Georges, O. B. Clarke, R. Zalk, Q. Yuan, K. J. Condon, R. A. Grassucci, W. A. Hendrickson, A. R. Marks, and J. Frank, "Structural Basis for Gating and Activation of RyR1," *Cell*, vol. 167, no. 1, p. 145–157.e17, 2016.
- [52] A. B. Parekh and J. W. Putney, "Store-operated calcium channels.," *Physiol. Rev.*, vol. 85, no. 2, pp. 757–810, Apr. 2005.
- [53] S. Feske, Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.-H. Puppel, B. Tanasa, P. G. Hogan, R. S. Lewis, M. Daly, and A. Rao, "A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function," *Nature*, vol. 441, no. 7090, pp. 179–185, May 2006.
- [54] S. Feske, C. Picard, and A. Fischer, "Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1," *Clin. Immunol.*, vol. 135, no. 2, pp. 169–182, 2010.
- [55] J. Roos, P. J. DiGregorio, A. V Yeromin, K. Ohlsen, M. Lioudyno, S. Zhang, O. Safrina, J. A. Kozak, S. L. Wagner, M. D. Cahalan, G. Veliçelebi, and K. A. Stauderman, "STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function.," *J. Cell Biol.*, vol. 169, no. 3, pp. 435–45, May 2005.
- [56] P. G. Hogan, R. S. Lewis, and A. Rao, "Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 28, pp. 491–533, Jan. 2010.
- [57] J. Liou, M. L. Kim, W. Do Heo, J. T. Jones, J. W. Myers, J. E. Ferrell, and T. Meyer, "STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx," 2005.
- [58] J.-Y. Wang, J. Sun, M.-Y. Huang, Y.-S. Wang, M.-F. Hou, Y. Sun, H. He, N.

- Krishna, S.-J. Chiu, S. Lin, S. Yang, and W.-C. Chang, "STIM1 overexpression promotes colorectal cancer progression, cell motility and COX-2 expression.," *Oncogene*, vol. 34, no. 33, pp. 4358–67, Aug. 2015.
- [59] S. Yang, J. J. Zhang, and X.-Y. Huang, "Orail and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis.," *Cancer Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 124–34, Feb. 2009.
- [60] M. P. Blaustein and W. J. Lederer, "Sodium/calcium exchange: its physiological implications.," *Physiol. Rev.*, vol. 79, no. 3, pp. 763–854, Jul. 1999.
- [61] C. Magnier, B. Papp, E. Corvazier, R. Bredoux, F. Wuytack, J. Eggermont, J. Maclouf, and J. Enouf, "Regulation of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases during platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell proliferation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 22, pp. 15808–15, Aug. 1992.
- [62] M. J. Berridge, M. D. Bootman, and P. Lipp, "Calcium--a life and death signal.," *Nature*, vol. 395, no. 6703, pp. 645–8, Oct. 1998.
- [63] N. Prevarskaya, R. Skryma, G. Bidaux, M. Flourakis, and Y. Shuba, "Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells.," *Cell Death Differ.*, vol. 14, no. 7, pp. 1295–304, Jul. 2007.
- [64] G. J. Augustine, "How does calcium trigger neurotransmitter release?," *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 11, no. 3, pp. 320–326, Jun. 2001.
- [65] J. R. Kovac, T. Chrones, and S. M. Sims, "Temporal and spatial dynamics underlying capacitative calcium entry in human colonic smooth muscle.," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 294, no. 1, pp. G88-98, Jan. 2008.
- [66] G. Dupont, T. Tordjmann, C. Clair, S. Swillens, M. Claret, and L. Combettes, "Mechanism of receptor-oriented intercellular calcium wave propagation in hepatocytes.," *FASEB J.*, vol. 14, no. 2, pp. 279–89, Feb. 2000.
- [67] B. E. Isakson, W. H. Evans, and S. Boitano, "Intercellular Ca²⁺ signaling in alveolar epithelial cells through gap junctions and by extracellular ATP.," *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 280, no. 2, pp. L221-8, Feb. 2001.
- [68] R. E. Dolmetsch, R. S. Lewis, C. C. Goodnow, and J. I. Healy, "Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration.," *Nature*, vol. 386, no. 6627, pp. 855–8, Apr. 1997.
- [69] H. Liang, C. D. DeMaria, M. G. Erickson, M. X. Mori, B. A. Alseikhan, and D. T. Yue, "Unified Mechanisms of Ca²⁺ Regulation across the Ca²⁺ Channel Family," *Neuron*, vol. 39, no. 6, pp. 951–960, Sep. 2003.
- [70] C. J. Brandl, S. DeLeon, D. R. Martin, and D. H. MacLennan, "Adult forms of the Ca²⁺ATPase of sarcoplasmic reticulum. Expression in developing skeletal muscle.," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 8, pp. 3768–74, Mar. 1987.
- [71] L. Dode, J. P. Andersen, N. Leslie, J. Dhitavat, B. Vilsen, and A. Hovnanian, "Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 2 isoforms and characterization of Darier disease (SERCA2) mutants by steady-state and transient kinetic analyses.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 48, pp. 47877–89, Nov. 2003.
- [72] J. Lytton, M. Westlin, S. E. Burk, G. E. Shull, and D. H. MacLennan, "Functional

- comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps.," *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 20, pp. 14483–9, Jul. 1992.
- [73] V. Martin, R. Bredoux, E. Corvazier, R. Van Gorp, T. Kovacs, P. Gelebart, and J. Enouf, "Three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 3 isoforms. Expression, regulation, and function of the membranes of the SERCA3 family.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 27, pp. 24442–52, Jul. 2002.
- [74] C. Toyoshima, M. Nakasako, H. Nomura, and H. Ogawa, "Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution.," *Nature*, vol. 405, no. 6787, pp. 647–55, Jun. 2000.
- [75] C. J. Brandl, N. M. Green, B. Korczak, and D. H. MacLennan, "Two Ca²⁺ ATPase genes: Homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences," *Cell*, vol. 44, no. 4, pp. 597–607, Feb. 1986.
- [76] P. Gélébart, V. Martin, J. Enouf, and B. Papp, "Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 303, no. 2, pp. 676–684, Apr. 2003.
- [77] S. E. Burk, J. Lytton, D. H. MacLennan, and G. E. Shull, "cDNA cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of a third organellar Ca²⁺ pump.," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 31, pp. 18561–8, Nov. 1989.
- [78] B. Papp, A. Enyedi, T. Kovács, B. Sarkadi, F. Wuytack, O. Thastrup, G. Gárdos, R. Bredoux, S. Levy-Toledano, and J. Enouf, "Demonstration of two forms of calcium pumps by thapsigargin inhibition and radioimmunoblotting in platelet membrane vesicles.," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 22, pp. 14593–6, Aug. 1991.
- [79] B. Papp, A. Enyedi, K. Pászty, T. Kovács, B. Sarkadi, G. Gárdos, C. Magnier, F. Wuytack, and J. Enouf, "Simultaneous presence of two distinct endoplasmic-reticulum-type calcium-pump isoforms in human cells. Characterization by radioimmunoblotting and inhibition by 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone.," *Biochem. J.*, vol. 288 (Pt 1, pp. 297–302, Nov. 1992.
- [80] S. Dally, V. Monceau, E. Corvazier, R. Bredoux, A. Raies, R. Bobe, F. del Monte, and J. Enouf, "Compartmentalized expression of three novel sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 isoforms including the switch to ER stress, SERCA3f, in non-failing and failing human heart," *Cell Calcium*, vol. 45, no. 2, pp. 144–154, 2009.
- [81] M. Anger, J. L. Samuel, F. Marotte, F. Wuytack, L. Rappaport, and A. M. Lompré, "In situ mRNA distribution of sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoforms during ontogeny in the rat.," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 26, no. 4, pp. 539–50, Apr. 1994.
- [82] R. Bobe, R. Bredoux, E. Corvazier, J. P. Andersen, J. D. Clausen, L. Dode, T. Kovács, and J. Enouf, "Identification, expression, function, and localization of a novel (sixth) isoform of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase 3 gene.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 23, pp. 24297–306, Jun. 2004.
- [83] P. Gélébart, T. Kovács, J.-P. Brouland, R. van Gorp, J. Grossmann, N. Rivard, Y. Panis, V. Martin, R. Bredoux, J. Enouf, and B. Papp, "Expression of endomembrane calcium pumps in colon and gastric cancer cells. Induction of SERCA3 expression during differentiation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 29, pp. 26310–20, Jul. 2002.

- [84] D. H. MacLennan and N. M. Green, "Structural biology. Pumping ions.," *Nature*, vol. 405, no. 6787, pp. 633–4, Jun. 2000.
- [85] W. HASSELBACH and M. MAKINOSE, "[The calcium pump of the 'relaxing granules' of muscle and its dependence on ATP-splitting].," *Biochem. Z.*, vol. 333, pp. 518–28, Jan. 1961.
- [86] M. Makinose, "Possible functional states of the enzyme of the sarcoplasmic calcium pump," *FEBS Lett.*, vol. 37, no. 2, pp. 140–143, Dec. 1973.
- [87] C. Butscher, M. Roudna, and H. Apell, "Electrogenic partial reactions of the SR-Ca-ATPase investigated by a fluorescence method.," *J. Membr. Biol.*, vol. 168, no. 2, pp. 169–81, Mar. 1999.
- [88] C. Toyoshima, "Structural aspects of ion pumping by Ca²⁺-ATPase of sarcoplasmic reticulum.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 476, no. 1, pp. 3–11, Aug. 2008.
- [89] P. C. Chandrasekera, M. E. Kargacin, J. P. Deans, and J. Lytton, "Determination of apparent calcium affinity for endogenously expressed human sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPase isoform SERCA3," *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.*, vol. 296, no. 5, 2009.
- [90] L. Dode, B. Vilsen, K. Van Baelen, F. Wuytack, J. D. Clausen, and J. P. Andersen, "Dissection of the functional differences between sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) 1 and 3 isoforms by steady-state and transient kinetic analyses.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 47, pp. 45579–91, Nov. 2002.
- [91] A. Xu, T. Netticadan, D. L. Jones, and N. Narayanan, "Serine phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in the intact beating rabbit heart.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 264, no. 1, pp. 241–6, Oct. 1999.
- [92] A. K. Grover, C.-Y. Kwan, and S. E. Samson, "Effects of peroxynitrite on sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ pump isoforms SERCA2b and SERCA3a.," *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, vol. 285, no. 6, pp. C1537-43, Dec. 2003.
- [93] † Pratap Singh, ‡ Anastasia M. Mhaka, § Soren B. Christensen, † Jeffrey J. Gray, ‡ and Samuel R. Denmeade, and ‡ John T. Isaacs*, "Applying Linear Interaction Energy Method for Rational Design of Noncompetitive Allosteric Inhibitors of the Sarco- and Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase," 2005.
- [94] D. Mahalingam, G. Wilding, S. Denmeade, J. Sarantopoulos, D. Cosgrove, J. Cetnar, N. Azad, J. Bruce, M. Kurman, V. E. Allgood, and M. Carducci, "Mipsagargin, a novel thapsigargin-based PSMA-activated prodrug: results of a first-in-man phase I clinical trial in patients with refractory, advanced or metastatic solid tumours.," *Br. J. Cancer*, vol. 114, no. 9, pp. 986–94, Apr. 2016.
- [95] C. Toyoshima and H. Nomura, "Structural changes in the calcium pump accompanying the dissociation of calcium.," *Nature*, vol. 418, no. 6898, pp. 605–11, Aug. 2002.
- [96] B. Papp, B. Sarkadi, A. Enyedi, A. J. Caride, J. T. Penniston, and G. Gardos, "Functional domains of the in situ red cell membrane calcium pump revealed by proteolysis and monoclonal antibodies. Possible sites for regulation by calpain and acidic lipids.," *J. Biol. Chem.*, vol. 264, no. 8, pp. 4577–82, Mar. 1989.
- [97] D. Guerini, "The significance of the isoforms of plasma membrane calcium ATPase.," *Cell Tissue Res.*, vol. 292, no. 2, pp. 191–7, May 1998.

- [98] F. Di Leva, T. Domi, L. Fedrizzi, D. Lim, and E. Carafoli, "The plasma membrane Ca²⁺ ATPase of animal cells: structure, function and regulation.," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 476, no. 1, pp. 65–74, Aug. 2008.
- [99] A. J. Caride, A. G. Filoteo, A. Enyedi, A. K. Verma, and J. T. Penniston, "Detection of isoform 4 of the plasma membrane calcium pump in human tissues by using isoform-specific monoclonal antibodies.," *Biochem. J.*, vol. 316 (Pt 1, pp. 353–9, May 1996.
- [100] R. Padányi, K. Pászty, L. Hegedűs, K. Varga, B. Papp, J. T. Penniston, and Á. Enyedi, "Multifaceted plasma membrane Ca²⁺ pumps: From structure to intracellular Ca²⁺ handling and cancer.," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1863, no. 6, pp. 1351–1363, 2016.
- [101] L.-H. Li, X.-R. Tian, and Z.-P. Hu, "The key target of neuroprotection after the onset of ischemic stroke: secretory pathway Ca(2+)-ATPase 1.," *Neural Regen. Res.*, vol. 10, no. 8, pp. 1271–8, Aug. 2015.
- [102] Y. Pan, E. Zvaritch, A. R. Tupling, W. J. Rice, S. de Leon, M. Rudnicki, C. McKerlie, B. L. Banwell, and D. H. MacLennan, "Targeted disruption of the ATP2A1 gene encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase isoform 1 (SERCA1) impairs diaphragm function and is lethal in neonatal mice.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 15, pp. 13367–75, Apr. 2003.
- [103] A. Odermatt, P. E. Taschner, V. K. Khanna, H. F. Busch, G. Karpati, C. K. Jablecki, M. H. Breuning, and D. H. MacLennan, "Mutations in the gene-encoding SERCA1, the fast-twitch skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase, are associated with Brody disease.," *Nat. Genet.*, vol. 14, no. 2, pp. 191–4, Oct. 1996.
- [104] D. H. MacLennan, "Ca²⁺ signalling and muscle disease.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 17, pp. 5291–7, Sep. 2000.
- [105] M. Chami, D. Gozuacik, K. Saigo, T. Capiod, P. Falson, H. Lecoeur, T. Urashima, J. Beckmann, M. L. Gougeon, M. Claret, M. le Maire, C. Bréchet, and P. Paterlini-Bréchet, "Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis.," *Oncogene*, vol. 19, no. 25, pp. 2877–86, Jun. 2000.
- [106] G. E. Shull, "Gene knockout studies of Ca²⁺-transporting ATPases.," *Eur. J. Biochem.*, vol. 267, no. 17, pp. 5284–90, Sep. 2000.
- [107] M. Periasamy, T. D. Reed, L. H. Liu, Y. Ji, E. Loukianov, R. J. Paul, M. L. Nieman, T. Riddle, J. J. Duffy, T. Doetschman, J. N. Lorenz, and G. E. Shull, "Impaired cardiac performance in heterozygous mice with a null mutation in the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 (SERCA2) gene.," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 4, pp. 2556–62, Jan. 1999.
- [108] Y. Ji, M. J. Lalli, G. J. Babu, Y. Xu, D. L. Kirkpatrick, L. H. Liu, N. Chiamvimonvat, R. A. Walsh, G. E. Shull, and M. Periasamy, "Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca²⁺ homeostasis and cardiomyocyte function.," *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 48, pp. 38073–80, Dec. 2000.
- [109] L. H. Liu, G. P. Boivin, V. Prasad, M. Periasamy, and G. E. Shull, "Squamous cell tumors in mice heterozygous for a null allele of *Atp2a2*, encoding the sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 2 Ca²⁺ pump.," *J. Biol.*

Chem., vol. 276, no. 29, pp. 26737–40, Jul. 2001.

- [110] G. Legrand, S. Humez, C. Slomianny, E. Dewailly, F. Vanden Abeele, P. Mariot, F. Wuytack, and N. Prevarskaya, “Ca²⁺ pools and cell growth. Evidence for sarcoendoplasmic Ca²⁺-ATPases 2B involvement in human prostate cancer cell growth control.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 50, pp. 47608–14, Dec. 2001.
- [111] A. Hovnanian, “Darier’s disease: from dyskeratosis to endoplasmic reticulum calcium ATPase deficiency.,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 322, no. 4, pp. 1237–44, Oct. 2004.
- [112] L. H. Liu, R. J. Paul, R. L. Sutliff, M. L. Miller, J. N. Lorenz, R. Y. K. Pun, J. J. Duffy, T. Doetschman, Y. Kimura, D. H. MacLennan, J. B. Hoying, and G. E. Shull, “Defective Endothelium-dependent Relaxation of Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cell Ca²⁺ Signaling in Mice Lacking Sarco(endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase Isoform 3,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 48, pp. 30538–30545, Nov. 1997.
- [113] J. Kao, C. N. Fortner, L. H. Liu, G. E. Shull, and R. J. Paul, “Ablation of the SERCA3 gene alters epithelium-dependent relaxation in mouse tracheal smooth muscle.,” *Am. J. Physiol.*, vol. 277, no. 2 Pt 1, pp. L264-70, Aug. 1999.
- [114] J. Paltauf-Doburzynska, K. Posch, G. Paltauf, and W. F. Graier, “Stealth ryanodine-sensitive Ca²⁺ release contributes to activity of capacitative Ca²⁺ entry and nitric oxide synthase in bovine endothelial cells.,” *J. Physiol.*, no. Pt 2, pp. 369–79, Dec. 1998.
- [115] A. Varadi, L. Lebel, Y. Hashim, Z. Mehta, S. J. Ashcroft, and R. Turner, “Sequence variants of the sarco(endoplasmic reticulum Ca(2+)-transport ATPase 3 gene (SERCA3) in Caucasian type II diabetic patients (UK Prospective Diabetes Study 48).,” *Diabetologia*, vol. 42, no. 10, pp. 1240–3, Oct. 1999.
- [116] A. Zarain-Herzberg, G. García-Rivas, and R. Estrada-Avilés, “Regulation of SERCA pumps expression in diabetes,” *Cell Calcium*, vol. 56, no. 5, pp. 302–310, 2014.
- [117] A. Arbabian, J.-P. Brouland, Á. Apáti, K. Pászty, L. Hegedűs, Á. Enyedi, C. Chomienne, and B. Papp, “Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during lung cancer cell differentiation.,” *FEBS J.*, vol. 280, no. 21, pp. 5408–18, Nov. 2013.
- [118] B. Papp and J.-P. Brouland, “Altered Endoplasmic Reticulum Calcium Pump Expression during Breast Tumorigenesis.,” *Breast Cancer (Auckl.)*, vol. 5, pp. 163–74, 2011.
- [119] O. Dellis, A. Arbabian, J.-P. Brouland, T. Kovács, M. Rowe, C. Chomienne, I. Joab, and B. Papp, “Modulation of B-cell endoplasmic reticulum calcium homeostasis by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1.,” *Mol. Cancer*, vol. 8, no. 1, p. 59, Jan. 2009.
- [120] S. Launay, R. Bobe, C. Lacabaratz-Porret, R. Bredoux, T. Kovács, J. Enouf, and B. Papp, “Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump expression during T lymphocyte activation.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 16, pp. 10746–50, Apr. 1997.
- [121] B. Papp, J.-P. Brouland, A. Arbabian, P. Gélébart, T. Kovács, R. Bobe, J. Enouf, N. Varin-Blank, and Á. Apáti, “Endoplasmic Reticulum Calcium Pumps and Cancer

- Cell Differentiation,” *Biomolecules*, vol. 2, no. 4, pp. 165–186, Mar. 2012.
- [122] P. Gélébart, T. Kovács, J.-P. Brouland, R. van Gorp, J. Grossmann, N. Rivard, Y. Panis, V. Martin, R. Bredoux, J. Enouf, and B. Papp, “Expression of Endomembrane Calcium Pumps in Colon and Gastric Cancer Cells .”
- [123] C. Chomienne, P. Fenaux, and L. Degos, “Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia,” *FASEB J.*, vol. 10, no. 9, pp. 1025–30, Jul. 1996.
- [124] S. Launay, M. Gianni, T. Kovács, R. Bredoux, A. Bruel, P. Gélébart, F. Zassadowski, C. Chomienne, J. Enouf, and B. Papp, “Lineage-specific modulation of calcium pump expression during myeloid differentiation,” *Blood*, vol. 93, no. 12, pp. 4395–405, Jun. 1999.
- [125] S. Launay, M. Gianni, L. Diomedede, L. M. Machesky, J. Enouf, and B. Papp, “Enhancement of ATRA-induced cell differentiation by inhibition of calcium accumulation into the endoplasmic reticulum: cross-talk between RAR alpha and calcium-dependent signaling,” *Blood*, vol. 101, no. 8, pp. 3220–8, Apr. 2003.
- [126] M. B. Segal, “Transport of nutrients across the choroid plexus,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 52, no. 1, pp. 38–48, Jan. 2001.
- [127] J. Praetorius, “Water and solute secretion by the choroid plexus,” *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 454, no. 1, pp. 1–18, Apr. 2007.
- [128] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues, “The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system,” *Acta Neuropathol.*, vol. 114, no. 2, pp. 97–109, Aug. 2007.
- [129] J. E. A. Wolff, M. Sajedi, R. Brant, M. J. Coppes, and R. M. Egeler, “Choroid plexus tumours,” *Br. J. Cancer*, vol. 87, no. 10, pp. 1086–91, Nov. 2002.
- [130] M. Ichii, “Early B lymphocyte development: Similarities and differences in human and mouse,” *World J. Stem Cells*, vol. 6, no. 4, p. 421, Sep. 2014.
- [131] S. L. Nutt and B. L. Kee, “The transcriptional regulation of B cell lineage commitment,” *Immunity*, vol. 26, no. 6, pp. 715–25, Jun. 2007.
- [132] T. W. LeBien, “Fates of human B-cell precursors,” *Blood*, vol. 96, no. 1, pp. 9–23, Jul. 2000.
- [133] S. E. Aspland, H. H. Bendall, and C. Murre, “The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis,” *Oncogene*, vol. 20, no. 40, pp. 5708–17, Oct. 2001.
- [134] B. Korošec, D. Glavač, M. Volavšek, and M. Ravnik-Glavač, “Alterations in genes encoding sarcoplasmic-endoplasmic reticulum Ca²⁺ pumps in association with head and neck squamous cell carcinoma,” *Cancer Genet. Cytogenet.*, vol. 181, no. 2, pp. 112–118, 2008.
- [135] T. S. P. Heng, M. W. Painter, K. Elpek, V. Lukacs-Kornek, N. Mauermann, S. J. Turley, D. Koller, F. S. Kim, A. J. Wagers, N. Asinovski, S. Davis, M. Fassett, M. Feuerer, D. H. D. Gray, S. Haxhinasto, J. A. Hill, G. Hyatt, C. Laplace, K. Leatherbee, D. Mathis, C. Benoist, R. Jianu, D. H. Laidlaw, J. A. Best, J. Knell, A. W. Goldrath, J. Jarjoura, J. C. Sun, Y. Zhu, L. L. Lanier, A. Ergun, Z. Li, J. J. Collins, S. A. Shinton, R. R. Hardy, R. Friedline, K. Sylvia, and J. Kang, “The Immunological Genome Project: networks of gene expression in immune cells,”

- Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 10, pp. 1091–1094, Oct. 2008.
- [136] N. T. Q. Doan, E. S. Paulsen, P. Sehgal, J. V. Møller, P. Nissen, S. R. Denmeade, J. T. Isaacs, C. A. Dionne, and S. B. Christensen, “Targeting thapsigargin towards tumors,” *Steroids*, vol. 97, pp. 2–7, 2015.
- [137] J. Kortmansky and G. K. Schwartz, “Bryostatin-1: a novel PKC inhibitor in clinical development,” *Cancer Invest.*, vol. 21, no. 6, pp. 924–36, 2003.