

Université de Montréal

**Contrôle de l'expression de HCaRG, un nouveau gène
impliqué dans la migration des cellules rénales**

Par

Sandra Tremblay

Département de Sciences biomédicales

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Philosophiae Doctor (Ph.D.)

en Sciences biomédicales

©Sandra Tremblay, décembre 2004



W
4
U58
2005
v.174

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :
Contrôle de l'expression de HCaRG, un nouveau gène
impliqué dans la migration des cellules rénales

présentée par
Sandra Tremblay

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur	D ^r John S.D. Chan
Directrice de recherche	D ^r Johanne Tremblay
Membre du jury	D ^r Michèle Brochu
Examineur externe	D ^r Richard Larivière
Représentante du doyen de la FES	D ^r Mona Nemer

Sommaire

HCaRG (Hypertension-related calcium regulated gene), un gène dont l'expression est modulée de façon négative par le calcium extracellulaire, a été identifié dans notre laboratoire. Les taux d'ARNm de HCaRG sont plus élevés chez les rats génétiquement hypertendus (SHR) que chez les rats normotendus. HCaRG code pour une protéine de 23KDa et est fortement exprimé dans le rein, les surrénales et le cœur. Dans le modèle d'ischémie-reperfusion, les niveaux d'ARNm de HCaRG varient de façon opposée à ceux du proto oncogène c-myc. Or, l'expression de c-myc corrèle habituellement avec la réponse hyperplasique dans les cellules de mammifères, suggérant ainsi que l'expression de HCaRG soit diminuée dans les cellules en prolifération. Pour identifier la ou les fonctions de HCaRG, nous avons établi une lignée stable de cellules rénales (HEK293) surexprimant HCaRG. Ces cellules ont un taux de prolifération plus faible que les cellules témoins et s'arrêtent en phase G2M du cycle cellulaire. De plus, les cellules sont hypertrophiées, présentent un phénotype de cellules épithéliales différenciées et ont une concentration élevée de sodium intracellulaire. Ce travail visait à vérifier les hypothèses selon lesquelles HCaRG puisse jouer un rôle dans les anomalies calciques et sodiques observées dans certaines formes d'hypertension et avoir la capacité de favoriser la réparation des dommages rénaux.

Nous avons d'abord étudié la régulation de l'expression de HCaRG. La caractérisation de la région promotrice de HCaRG nous a permis d'identifier un élément putatif de réponse au calcium et au sodium, le nCARE. Les études d'activité du promoteur nous

ont par la suite démontré que HCaRG était régulé de façon négative par l'augmentation de NaCl dans le milieu extracellulaire. La présence d'un îlot CpG dans la séquence de HCaRG nous laisse supposer que son expression puisse être régulée par la méthylation et que ceci pourrait partiellement expliquer les niveaux variables de HCaRG dans les différents types de tumeurs. La surexpression de HCaRG dans les cellules HEK293 influence l'expression de plusieurs gènes impliqués dans des fonctions aussi différentes que le transport calcique, l'homéostasie ionique, le cycle cellulaire, l'adhésion et la migration des cellules. De plus, les cellules surexprimant HCaRG montrent une migration accrue et une meilleure adhésion à la matrice extracellulaire comparativement aux cellules témoins. Cette augmentation de la capacité migratoire est entre autres dépendante de facteurs sécrétés par les cellules surexprimant HCaRG. Parmi eux, on retrouve le TGF- α qui s'avère être un joueur clé dans la stimulation de la migration cellulaire par HCaRG.

L'ensemble de nos données nous permet de proposer un modèle pour expliquer la fonction de HCaRG. Ainsi, HCaRG modifierait l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la migration cellulaire, la différenciation des cellules et le transport ionique. Nous pouvons donc supposer que HCaRG participe à la fonction rénale et à la réparation du rein suivant un dommage.

Mots-clés : HCaRG, rein, nCARE, migration cellulaire, TGF- α

Summary

HCaRG (Hypertension-related calcium regulated gene), a gene which has been identified in our laboratory, is negatively regulated by extracellular calcium. HCaRG mRNA levels are higher in spontaneously hypertensive rats (SHR) as compared to the normotensive strain, WKY. HCaRG codes for a 23kDa protein and is highly expressed in kidney, adrenals and heart. After a kidney ischemia-reperfusion injury, HCaRG mRNA levels are modulated in the opposite way to c-myc expression. The later is correlated with hyperplastic response in mammalian cells, suggesting a decrease expression of HCaRG in proliferating cells. To identify the function of HCaRG, we have produced a stable kidney cell line (HEK293) overexpressing HCaRG. These cells present a reduce proliferation rate and an arrest in the G2M phase of the cell cycle. They are also hypertrophied, present phenotypic characteristics of differentiated epithelial cells and have a high intracellular sodium concentration. The aim of the present work was to evaluate HCaRG implication in calcium and sodium abnormalities observed in some forms of hypertension and its role in kidney repair mechanism.

First, we have studied the regulation of HCaRG expression. The characterization of the HCaRG promoter region led to the identification of an nCARE-like element, which is known to be responsive to calcium and sodium. Functional promoter studies showed that HCaRG is negatively regulated by an increase of NaCl in the extracellular medium. The presence of a CpG island in the HCaRG region suggests that methylation can be responsible for the variable levels of HCaRG observed in different tumors. HCaRG

overexpression in HEK293 cells has an effect on the expression of numerous genes involved in calcium transport, ionic homeostasis, cell cycle, adhesion and cell migration. Indeed, cells overexpressing HCaRG migrate faster than control cells and present a greater adhesiveness to the extracellular matrix. Secreted factors are involved in the increased migration potential of cells overexpressing HCaRG. Among them, TGF- α is an important factor in the stimulation of cell migration by HCaRG.

All together, these data let us to propose a model to explain the function of HCaRG. In this model, HCaRG would be responsible for the modulation of expression of many genes involved in cell migration, cell differentiation and ionic transport. We can then hypothesize that HCaRG play a role in kidney function and in kidney repair following injury.

Key-words: HCaRG, kidney, nCARE, cell migration, TGF- α

Table des matières

Sommaire	iii
Liste des tableaux	xii
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations	xvii
Dédicace	xxi
Remerciements	xxii
Chapitre 1- Introduction	1
1.1 Le rein	2
1.1.1 Physiologie du rein.....	2
1.1.2 Rôle du rein dans la régulation de la pression artérielle.....	5
1.1.3 Néphropathies.....	8
1.2 Introduction sur les ions	12
1.2.1 Le calcium.....	12
1.2.2 Métabolisme du calcium.....	13
1.2.3 Régulation de l'homéostasie calcique par les hormones calcitropiques.....	14
1.2.4 CaR (récepteur calcique).....	19
1.2.5 Autres récepteurs de calcium.....	25
1.2.6 Le nCARE.....	26
1.2.7 Le calcium et l'hypertension artérielle.....	31
1.3 Le sodium	34
1.3.1 Stress osmotique.....	36

1.3.2	Mécanismes de réponse à un stress osmotique.....	38
1.3.3	Éléments de réponse au stress hyperosmotique.....	46
1.3.4	Voies de signalisation impliquées dans la régulation des gènes d'osmorégulation.....	48
1.3.5	Pathologies associées à des anomalies ioniques	49
1.4	Interaction calcium/sodium dans l'hypertension artérielle.....	51
1.5	Migration cellulaire.....	52
1.5.1	Mécanisme général de la locomotion cellulaire.....	52
1.5.2	Protéines de la famille Rho GTPases.....	53
1.5.3	Étapes de la migration cellulaire.....	54
1.5.4	Implication des canaux ioniques dans le processus de migration.....	77
1.5.5	Migration cellulaire pendant la réparation du rein suite à un dommage.....	80
1.5.6	Pathologies associées à la migration cellulaire.....	81
1.6	Épigénétique et méthylation de l'ADN.....	85
1.7	HCaRG (Hypertension-related calcium regulated gene).....	90
1.8	Hypothèse et objectifs du travail de recherche.....	94
Chapitre 2- Clonage et caractérisation de la région promotrice de HCaRG.....		96
2.0	Introduction du chapitre.....	97
2.1	Méthodologie.....	97
2.1.2	Clonage et séquençage de la région 5'UTR de HCaRG.....	97
2.1.2	Extension d'amorce.....	98
2.1.3	Construction des plasmides pour les études d'activité luciférase.....	99
2.1.4	Transfections.....	100

2.1.5	Préparation des extraits nucléaires et retard sur gel.....	100
2.1.6	Modulation de l'expression de HCaRG par le calcium ou le sodium de la diète.....	102
2.2	Résultats.....	103
2.2.1	Clonage de la région en amont du gène codant pour HCaRG.....	103
2.2.2	Homologie de la région 5'UTR de HCaRG chez le rat, la souris et l'humain...	109
2.2.3	Comparaison des séquences du nCARE dans différentes espèces.....	111
2.2.4	Détermination du site d'initiation de la transcription.....	113
2.2.5	Effet du calcium sur l'activité promotrice de HCaRG.....	115
2.2.6	Effet du stress osmotique sur l'activité promotrice de HCaRG.....	117
2.2.7	Expression de HCaRG dans les reins de rats soumis à différentes diètes.....	129
Chapitre 3- Profil d'expression de HCaRG en relation avec la prolifération cellulaire.....		130
3.0	Introduction du chapitre.....	131
3.1	Expression de HCaRG dans différentes tumeurs humaines.....	131
3.2	Méthodologie.....	132
3.3	Résultats.....	132
3.4	Expression de HCaRG pendant le processus de différenciation des cellules Caco-2.....	139
3.5	Méthodologie.....	140
3.6	Résultats.....	141
3.7	Méthylation.....	143
3.8	Méthodologie.....	143

3.8.1	Détermination d'un îlot CpG.....	143
3.8.2	Modification de l'ADN au bisulfite de sodium et PCR.....	143
3.9	Résultats.....	145
3.9.1	Identification d'une région potentiellement méthylée.....	145
3.9.2	Analyse de l'îlot CpG de HCaRG.....	146
Chapitre 4- Effet de HCaRG sur l'expression des gènes: une analyse par microarray.....		149
4.0	Introduction du chapitre.....	150
4.1	Méthodologie.....	150
4.2	Résultats.....	151
4.2.1	Analyse générale des résultats.....	151
4.4.2	Analyse spécifique des gènes dont l'expression est modulée par HCaRG.....	154
Chapitre 5- Manuscrit : HCaRG Increases Renal Cell Migration by an Internal TGF-α Autocrine Loop mechanism.....		171
	Résumé.....	172
	Abstract.....	174
	Introduction.....	175
	Material and Methods.....	177
	Results.....	181
	Discussion.....	186
	Acknowledgements.....	190
	References.....	191
	Figure Legends.....	196

Chapitre 6- Discussion	206
6.0 Introduction du chapitre	207
6.1 Régulation de l'expression de HCaRG	207
6.1.1 Stress osmotique et volume cellulaire.....	207
6.1.2 Régulation de l'expression de HCaRG pendant le cycle cellulaire.....	208
6.1.3 Méthylation de l'îlot CpG.....	209
6.1.4 Tumeurs associées avec un gain du chromosome 8.....	211
6.2 Fonction de HCaRG	212
6.2.1 Effet de HCaRG sur l'expression des gènes.....	212
6.2.2 HCaRG stimule la migration cellulaire	212
6.3 Directions futures	219
6.3.1 Régulation de l'expression de HCaRG.....	219
6.3.2 Effet de HCaRG dans les VSMC.....	220
Chapitre 7- Conclusion	222
7.0 Hypothèse expliquant la régulation de l'expression et la fonction de HCaRG...	223
Bibliographie	226
<i>Curriculum vitae</i>	288

Liste des tableaux

Chapitre 3- Profil d'expression de HCaRG en relation avec la prolifération cellulaire	
Tableau 3.I. CpG potentiellement méthylés.....	147
Chapitre 4- Effet de HCaRG sur l'expression des gènes: une analyse par microarray	
Tableau 4.I. Modulation des gènes liés au calcium.....	155
Tableau 4.II. Modulation des gènes liés à l'homéostasie ou au transport ionique.....	159
Tableau 4.III. Modulation des gènes liés au cycle cellulaire.....	163
Tableau 4.IV. Modulation des gènes liés à l'adhésion cellulaire.....	168
Tableau 4.V. Modulation des gènes impliqués dans la migration cellulaire.....	169
Chapitre 5- Manuscrit: HCaRG Increases Renal Cell Migration by an Internal TGF-α Autocrine Loop mechanism	
Table 5.I Genes differentially expressed between HCaRG-overexpressing cells and control cells.....	199

Liste des figures

Chapitre 1- Introduction

Figure 1.1	Structure du néphron.....	4
Figure 1.2	Système rénine-angiotensine.....	6
Figure 1.3	Effets tubulaires de l'ischémie rénale.....	10
Figure 1.4	PTH et homéostasie calcique.....	18
Figure 1.5	Stimulation du CaR.....	21
Figure 1.6	Réabsorption de calcium par voie paracellulaire dans le rein.....	24
Figure 1.7	Modulation de la protéine APE par le calcium extracellulaire.....	29
Figure 1.8	Sites de réabsorption du sodium dans le rein.....	35
Figure 1.9	Systèmes de transport ionique impliqués dans le RVI.....	40
Figure 1.10	Accumulation d'osmolytes organiques.....	42
Figure 1.11	Activation de la migration cellulaire via le EGF-R.....	56
Figure 1.12	Modèle de nucléation dendritique.....	59
Figure 1.13	Implication des RhoGTPases dans l'extension de la membrane plasmique.....	62
Figure 1.14	Relation entre adhésion et vitesse de migration.....	64
Figure 1.15	Interaction de la matrice extracellulaire avec les récepteurs membranaires.....	67
Figure 1.16	Recrutement des protéines présentes aux sites d'adhésion focale.....	73
Figure 1.17	Implication de Rho dans la formation de fibres de stress.....	76
Figure 1.18	Changements de volume associés à la migration.....	79

Chapitre 2-	Clonage et caractérisation de la région promotrice de HCaRG	
Figure 2.1	Séquence de la région 5'UTR de HCaRG.....	108
Figure 2.2	Homologie des séquences en 5' du codon ATG entre le rat et la souris.....	110
Figure 2.3	Comparaison des nCAREs.....	112
Figure 2.4	Localisation des sites d'initiation de la transcription.....	114
Figure 2.5	Effet du calcium sur le promoteur de HCaRG.....	116
Figure 2.6	Effet du NaCl sur l'activité du promoteur de HCaRG.....	118
Figure 2.7	Effet du NaCl sur l'activité du nCARE.....	120
Figure 2.8	Effet du mannitol sur l'activité du promoteur de HCaRG.....	122
Figure 2.9	Hypothèse pour expliquer l'effet du stress hyperosmotique sur l'activité du promoteur de HCaRG.....	125
Figure 2.10	Patron de liaison des protéines nucléaires à l'élément nCARE.....	127
Figure 2.11	Effet du NaCl sur la liaison des protéines nucléaires au nCARE.....	128
Figure 2.12	Expression de HCaRG dans les reins.....	129
Chapitre 3-	Profil d'expression de HCaRG en relation avec la prolifération cellulaire	
Figure 3.1	Expression de HCaRG dans les néphroblastomes.....	133
Figure 3.2	Expression de HCaRG dans les tumeurs de l'estomac.....	134
Figure 3.3	Expression de HCaRG dans différentes tumeurs.....	135
Figure 3.4	Expression de HCaRG dans les tumeurs mammaires et de l'utérus.....	137
Figure 3.5	Expression de HCaRG dans les tumeurs du côlon.....	138

Figure 3.6	Expression de HCaRG dans les cellules Caco-2.....	142
Figure 3.7	Modification de l'ADN avec le bisulfite de sodium.....	144
Figure 3.8	Identification d'un îlot CpG.....	146

Chapitre 4- Effet de HCaRG sur l'expression des gènes: une analyse par microarray

Figure 4.1	Graphique des gènes modulés au moins 2X entre les lignées cellulaires.....	153
Figure 4.2	Division des gènes selon leur fonction cellulaire.....	154
Figure 4.3	Action de HCaRG sur l'homéostasie calcique.....	157
Figure 4.4	Effet de HCaRG sur le cycle cellulaire.....	164

Chapitre 5- Manuscrit: HCaRG Increases Renal Cell Migration by an Internal TGF- α Autocrine Loop mechanism

Figure 1	HCaRG activates cell migration.....	200
Figure 2	Time-course of Neo1 vs HCaRG9 migration and proliferation.....	201
Figure 3	Effect of HCaRG on the attachment of HEK293 cells.....	202
Figure 4	Morphological changes of HCaRG-transfected HEK293 cells.....	203
Figure 5	Effect of conditioned medium from HCaRG9 cells.....	204
Figure 6	Effect of TGF- α activation and neutralization and EGFR inhibition on cell migration.....	205

Chapitre 6- Discussion

Figure 6.1 HCaRG stimule la migration cellulaire via la sécrétion de protéines.....216

Chapitre 7- Conclusion

Figure 7.1 Modèle général pour expliquer la régulation de l'expression et le rôle physiopathologique de HCaRG.....225

Liste des abréviations

ABP	<i>Actin binding protein</i>
ACE	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ALKP	Phosphatase alcaline
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AngII	Angiotensine II
ANP	Peptide natriurétique de l'oreillette
AP-1	<i>Activating protein 1</i>
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
AVP	Arginine vasopressine
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
Ca ²⁺	Ion calcique
CDE	<i>Cell-cycle dependant element</i>
CDK	Cycline dépendante des kinases
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator</i>
CHR	<i>Cell-cycle homology region</i>
Cl ⁻	Ion chlore
DAG	Diacylglycérol
DCT	Tubule contourné distal
ECaC	Canal calcique épithélial
EGF	Facteur de croissance épithélial

ENaC	Canal sodique épithélial
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
GADD45	<i>Growth arrest and DNA damage inducible protein 45</i>
GDP	Guanosine Di phosphate
G _i	Protéine G inhibitrice
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
GTP	Guanosine tri phosphate
HCaRG	Hypertension-related calcium regulated gene
HEK293	<i>Human embryonal kidney cells</i>
HSP	Protéine de choc thermique
ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1
IFN- γ	Interféron gamma
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphate
IRA	Insuffisance rénale aiguë
IRC	Insuffisance rénale chronique
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
K ⁺	Ion potassique
LDL	Lipoprotéine de basse densité
M	Mitose

MEC	Matrice extracellulaire
Mg ²⁺	Ion magnésium
MAPK	<i>Mitogen-activated kinase</i>
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
mGluR	Récepteurs métabotropiques du glutamate
MR	Récepteur des minéralocorticoïdes
Na ⁺	Ion sodique
nCARE	Élément de réponse négative au calcium
NF- κ B	<i>Nuclear factor κB</i>
NKCC	Co-transporteur sodium-potassium-2 chlores
OPG	Ostéoprotégérine
PA	Pression artérielle
PAK	<i>p21 GTPase-activated kinase</i>
PCDH8	Protocadhérine 8
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PTH	Hormone parathyroïdienne
RANKL	<i>Receptor activator of NF-κB-ligand</i>
RE	Réticulum endoplasmique
RS	Réticulum sarcoplasmique

RVD	<i>Regulatory volume decrease</i>
RVI	<i>Regulatory volume increase</i>
S	Synthèse d'ADN
SGK1	<i>Serum and glucocorticoid-regulated kinase</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
UTR	<i>Untranscribed region</i>
UV	Ultraviolet
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
VSMC	Cellule du muscle lisse vasculaire

À mes parents

Remerciements

C'est sans aucun doute la section de ma thèse la plus agréable à écrire. Elle me permet enfin de remercier les personnes qui m'ont appuyées, chacune à leur façon, pendant ces longues années d'études graduées.

Tout d'abord, je suis très reconnaissante envers le Dr Johanne Tremblay de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir accordé sa confiance. Elle a su me guider dans mon projet tout en me laissant une grande liberté de pensée et d'action et je l'en remercie. En plus de tout ce qu'elle a pu m'apporter du côté scientifique, j'ai aussi pu apprécier toute la grandeur de son côté humain. Elle a été et demeure un modèle pour moi.

J'aimerais évidemment remercier mes collègues de travail grâce à qui les heures passées au laboratoire ont été agréables. Merci à Suzanne Cossette, le pilier du laboratoire. Un merci particulier à Nathalie Bourcier, tout d'abord pour son amitié mais aussi pour son apport technique indéfectible. Je pense entre autres aux centaines, voire milliers, de pétris de cellules qu'elle a "grattés" pour m'aider dans mon projet. Merci à Julie Bérubé pour sa présence, sa sensibilité, son écoute et son support.

Un doctorat en recherche s'accompagne invariablement de périodes de doutes et de remises en questions. Pendant, ces moments, j'ai pu compter sur l'appui inconditionnel de ma famille et de mes amis. Je remercie particulièrement mon père et ma mère qui

m'ont donné le goût et l'opportunité d'étudier. Ils m'ont appris qu'il valait la peine de mettre les efforts nécessaires pour atteindre les buts fixés. Ils ont toujours cru en moi et m'ont offert leur support. À ma mère, la femme la plus forte et la plus courageuse que je connaisse, merci. Un gros merci à mes deux frères, tout d'abord parce qu'ils sont des exemples pour moi, mais aussi pour leur présence, leur écoute et leurs encouragements. Merci à toi Sébastien, de m'avoir accompagnée dans les derniers milles de ma thèse, pendant les hauts et les bas de la rédaction. Ta présence à mes côtés a été très précieuse.

Finalement, j'ai une pensée bien spéciale pour Christian, mon conjoint du début de mes études universitaires jusqu'aux premières années de mon doctorat. Cette thèse est aussi un peu pour lui, à sa mémoire.

Chapitre 1

Introduction

1.1 Le rein

Le rein joue un rôle important dans l'homéostasie du compartiment extracellulaire en contrôlant son volume et sa composition. La balance entre l'apport d'eau et d'électrolytes et leur élimination de l'organisme est maintenue en grande partie par le rein. Le rein est responsable entre autre de la régulation de l'eau et des électrolytes et de la régulation de la pression artérielle (PA). Dans les prochaines sections, il sera question de la physiologie du rein, de son rôle dans le contrôle de la PA et de pathologies qui y sont associées.

1.1.1 Physiologie du rein

Chez l'humain, chaque rein contient environ un million de néphrons capables de former l'urine. Chaque néphron (figure 1.1) est composé d'un glomérule qui filtre les fluides et d'un long tubule dans lequel le fluide filtré est converti en urine (1). Les fluides filtrés par les capillaires glomérulaires passent par la capsule de Bowman puis le tubule proximal. Le tubule proximal s'étend du glomérule jusqu'à la portion descendante mince de l'anse de Henle. Cette dernière est liée à la portion ascendante mince de l'anse de Henle qui devient ensuite plus large. Au bout de la portion ascendante large de l'anse de Henle (TAL), on retrouve la *macula densa*, puis le complexe tubule contourné distal/tubule connecteur. Enfin, le tubule collecteur constitue la dernière partie du néphron. Chacun des ces segments est caractérisé ou peut être subdivisé selon sa situation médullaire ou corticale (1;2). Des fonctions distinctes sont aussi associées à chacun des segments. Le tubule proximal réabsorbe plus de 70% du sodium, du potassium, des ions chlore, du

bicarbonate, du phosphate, de l'eau et de la presque totalité du glucose et des acides aminés filtrés. Le TAL quant à lui, réabsorbe environ 15% du sodium, du potassium, du bicarbonate, du calcium et de magnésium filtrés. Cependant, on ne retrouve pas de transport de l'eau, du glucose, du phosphate ou des acides aminés. De par sa capacité de réabsorber un excès d'ions par rapport à l'eau, le TAL est important pour le maintien de la balance hydrique. De son côté, le tube collecteur constitue le site final pour la régulation de l'excrétion du sodium, du potassium et de l'eau (2). Les fonctions particulières des différentes parties du néphron au niveau de la réabsorption du calcium et du sodium seront discutées dans les sections appropriées de ce chapitre.

Soulignons qu'au niveau du rein, les couches de cellules épithéliales séparent les compartiments ayant des compositions distinctes et assurent le transfert d'eau et des autres composants entre les compartiments. Les cellules épithéliales sont caractérisées par leur polarisation fonctionnelle. Ainsi, la membrane apicale (face luminale) possède des transporteurs distincts de ceux retrouvés à la membrane basolatérale (côté du liquide interstiel) (2).

Structure du néphron

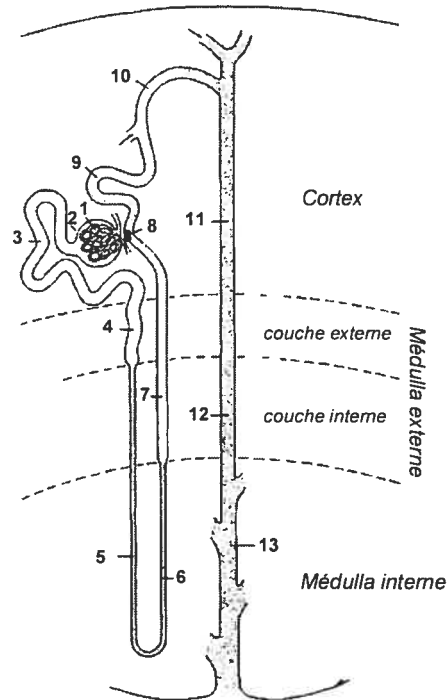


Figure 1.1 Illustration des différentes parties du néphron. 1. glomérule, 2. capsule de Bowman, 3. tube proximal, 4. segment droit du tube proximal, 5. branche descendante mince de l'anse de Henle, 6. branche ascendante mince de l'anse de Henle, 7. branche ascendante large de l'anse de Henle, 8. *macula densa*, 9. tube contourné distal, 10. tubule connecteur, 11. tube collecteur cortical, 12. tube collecteur médullaire externe, 13. tube collecteur médullaire interne.

1.1.2 Rôle du rein dans la régulation de la pression artérielle

La régulation à long terme de la PA s'effectue essentiellement sur le contrôle de la volémie. Cette régulation implique le rein et le système rénine-angiotensine. Lorsque la volémie augmente, la PA augmente aussi. Cette élévation de la PA a un effet direct sur le rein qui réagit en augmentant sa filtration glomérulaire, ce qui favorise l'excrétion d'eau et d'électrolytes (relation pression-natriurèse). Le système rénine-angiotensine module cette relation pression-natriurèse. Son rôle consiste à équilibrer la balance hydro-sodée en limitant les variations de PA.

Le système rénine-angiotensine (figure 1.2) implique d'abord la rénine, le facteur limitant du système. La rénine est une enzyme relâchée par les cellules juxtaglomérulaires rénales en réponse à une diminution de PA, une hypovolémie ou une hyponatrémie. La rénine convertit l'angiotensinogène en angiotensine I qui sera à son tour transformé en angiotensine II (AngII) par l'ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine). L'AngII est un puissant vasoconstricteur et augmente la résistance périphérique. D'autre part, l'AngII augmente la rétention d'eau et de sels en agissant directement sur le rein et en stimulant la sécrétion d'aldostérone par les glandes surrénales. L'aldostérone agit au niveau des tubules pour favoriser la réabsorption de sodium et d'eau et donc l'élévation de la PA (1;3). Probablement la fonction la plus importante de ce système c'est de contrôler le volume du fluide extracellulaire ou la PA lors de l'ingestion de quantités variables de sodium. Il va sans dire que le système rénine-angiotensine est une cible thérapeutique prisée dans le traitement de l'hypertension artérielle.

Système rénine-angiotensine

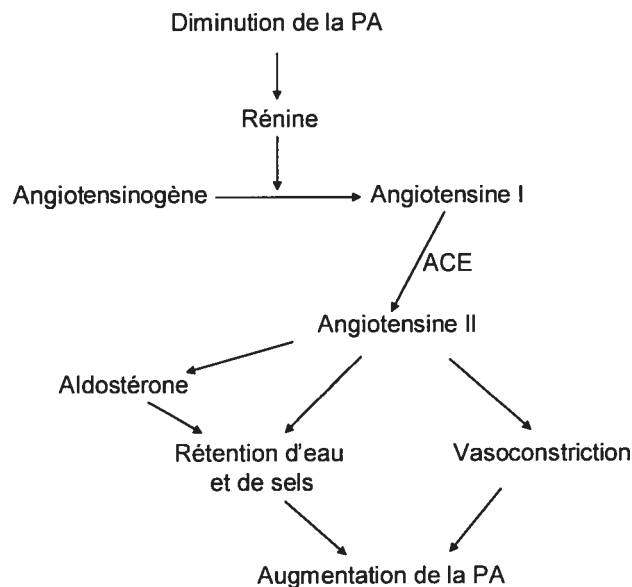


Figure 1.2 Système rénine-angiotensine dans la régulation de la PA.

La diurèse et la natriurèse sont aussi contrôlées par la vasopressine (AVP, ADH) et l'ANP (atrial natriuretic peptide). L'AVP est un peptide relâché par l'hypophyse en réponse à une diminution de PA ou à une augmentation de l'osmolalité plasmatique (4). L'AVP agit via au moins deux types de récepteurs, V_1 et V_2 . Ces récepteurs sont exprimés dans le rein mais sont couplés à des voies de signalisation différentes. Le récepteur V_1 est lié à l'activation de la PLC (phospholipase C), la génération d' IP_3 (inositol 1,4,5-triphosphate), l'augmentation de calcium intracellulaire et l'activation de la PKC (protéine kinase C). Le récepteur V_2 est quant à lui couplé à

l'adénylyl cyclase mais peut aussi induire une augmentation de calcium intracellulaire indépendamment de la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). Dans les cellules épithéliales du tubule collecteur, la voie de signalisation AMPc/PKA (protéine kinase A) est stimulée principalement par l'AVP (2). Dans le tubule collecteur, la fonction principale de l'AVP c'est d'augmenter la perméabilité de la membrane apicale à l'eau via l'expression de l'aquaporine-2 mais aussi de stimuler la réabsorption de sodium et la sécrétion de potassium (1;2). L'AVP favorise la réabsorption de sodium en augmentant l'activité de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ainsi que son expression. De plus l'AVP contrôle la synthèse, le recrutement à la membrane et l'activité du canal ENaC (canal sodique épithélial)(2).

L'ANP est synthétisé par les myocytes auriculaires mais aussi par de nombreux autres tissus dont le rein. L'ANP peut augmenter le taux de filtration glomérulaire, inhiber le système rénine-angiotensine-aldostérone et la sécrétion d'AVP. Sa fonction principale est d'inhiber le transport du sodium dans les tubules rénaux. Dans le rein, les effets de l'ANP sont médiés principalement par la formation de GMPc (guanosine monophosphate cyclique) et la stimulation de la protéine kinase G (PKG) (5;6). Le principal site d'action de l'ANP est le tubule collecteur où il inhibe la réabsorption du NaCl et la perméabilité à l'eau induite par la vasopressine. Du côté apical, l'ANP empêche l'entrée de sodium en diminuant l'activité d'un canal sodique sensible à l'amiloride (6;7). Au niveau de la membrane basolatérale, l'ANP inhibe l'activité de la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ via la PKG mais son mode d'action est

encore inconnu. L'urodilatine, un autre membre de la famille des peptides natriurétiques, est synthétisé dans les tubules distaux et sécrété dans le fluide tubulaire. L'urodilatine reproduit les mêmes effets que l'ANP au niveau de la réabsorption du sodium (6).

1.1.3 Néphropathies

L'hypertension peut être une cause ou une conséquence des maladies rénales et en contrepartie, l'hypertension systémique est un des facteurs de risques importants dans la perte progressive de la fonction rénale. D'autre part, lorsque la fonction rénale devient anormale, les patients ayant jusque-là une PA normale deviennent hypertendus. Il existe donc un cercle vicieux entre la perte de fonction rénale et l'hypertension.

Insuffisance rénale aiguë

L'insuffisance rénale aiguë (IRA) est une perte brutale et en général réversible de la fonction rénale, empêchant le maintien de l'équilibre interne de l'organisme (8). L'IRA implique des facteurs vasculaires et tubulaires et l'ischémie en est souvent la cause (9). Les anomalies vasculaires se traduisent par une perte d'autorégulation et une augmentation de la vasoconstriction rénale. L'augmentation de calcium cytosolique suivant l'ischémie pourrait contribuer à la vasoconstriction du rein ischémique (8).

La réponse métabolique des tubules à une ischémie inclut la perte d'ATP (adénosine triphosphate), l'expansion du volume cellulaire, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} (calcium) cytosolique et l'activation de phospholipases et de protéases (9). Les changements structuraux sont caractérisés par une dysfonction des tubules ce qui cause une diminution de la réabsorption de sodium et d'eau. Les membranes de la bordure en brosse du tubule proximal se dissocient et sont excrétées et les cellules épithéliales se retrouvent dans l'urine. On observe aussi la perte de polarité des cellules. La pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, les intégrines et les protéines du cytosquelette se dissocient de la membrane basolatérale, sont redistribuées dans le cytoplasme et sont transloquées à la membrane apicale. Ceci peut expliquer l'augmentation de la sécrétion de sodium dans l'IRA (8;9).

L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire suite à l'ischémie active une protéase, la calpaïne. Cette dernière dégrade les protéines impliquées dans l'interaction du cytosquelette avec la membrane plasmique ou la pompe $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (8;9).

La diminution du taux de filtration glomérulaire peut aussi s'expliquer par l'obstruction des tubules distaux par les débris cellulaires et les membranes de la bordure en brosse. De plus, les cellules viables relâchées pendant l'ischémie peuvent adhérer à d'autres cellules tubulaires et à la matrice extracellulaire et causer une obstruction intra-luminale. Les effets tubulaires de l'ischémie rénale sont résumés à la figure 1.3.

Effets tubulaires de l'ischémie rénale

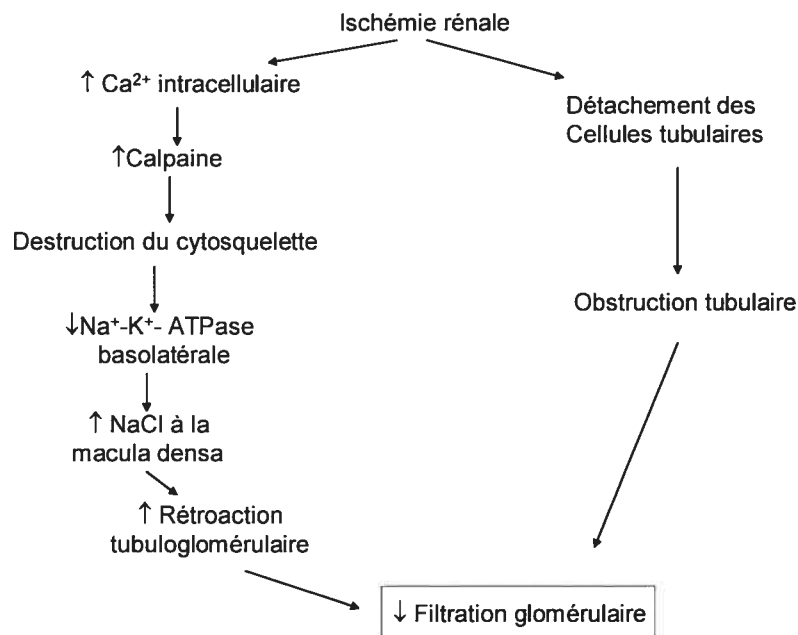


Figure 1.3 L'ischémie rénale entraîne des conséquences néfastes au niveau des tubules qui se traduisent par une diminution de la filtration glomérulaire.

Dans le rein normal adulte, les cellules tubulaires sont très différenciées. Cependant, après une lésion aigue, certaines cellules de la région endommagée survivent. Ces cellules épithéliales tubulaires se différencient, se répliquent et migrent vers la lésion épithéliale. Elles s'attachent alors à la membrane tubulaire et rétablissent leur phénotype différencié avec une polarisation fonctionnelle, permettant ainsi au tubule

de retrouver son intégrité (9-11). Le processus de migration cellulaire pendant la réparation du rein est discuté plus en détails à la section 1.5.5 de ce chapitre.

Insuffisance rénale chronique

L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une atteinte progressive, importante et définitive de la fonction rénale et donc de la filtration glomérulaire. L'IRC est associée à une perte du nombre de néphrons. La réponse adaptative des néphrons se traduit par une dilatation pré-glomérulaire et une hyperfiltration, ce qui cause des dommages glomérulaires progressifs et une perte de la fonction rénale (12). Dans l'IRC, l'hypertension est secondaire à la rétention d'eau et de sels causée par une diminution de la fonction excrétrice du rein. Une augmentation du volume extracellulaire, de la résistance périphérique totale et de l'activité du système rénine-angiotensine est observée. L'élévation soutenue de la PA entraîne des dommages glomérulaires, une perte progressive de la fonction rénale et une augmentation de la PA (4;12;13).

1.2 Introduction sur les ions

La régulation de la composition ionique dans les fluides extracellulaires est critique pour les organismes vivants. Le maintien des fonctions cellulaires normales requiert des concentrations de cations et d'anions quasi constantes. Généralement, les ions ont d'importantes fonctions intracellulaires et extracellulaires, comme c'est le cas pour le calcium et le sodium. Dans les deux prochaines sections, la régulation de l'homéostasie calcique et osmotique seront traitées de façon indépendante mais seront discutés ensemble un peu plus loin étant donné leur interdépendance dans une pathologie comme l'hypertension.

1.2.1 *Le calcium*

Le calcium (Ca^{2+}) est un élément essentiel pour l'organisme et est impliqué dans de nombreux processus physiologiques. Ses actions sont primordiales tant au niveau extracellulaire qu'intracellulaire. Au niveau extracellulaire, le Ca^{2+} joue un rôle dans le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique, dans la coagulation sanguine, le métabolisme osseux et l'adhésion cellulaire. La concentration extracellulaire de Ca^{2+} se situe entre 1 et 1,3 mM, ce qui permet un apport suffisant de Ca^{2+} pour ses nombreuses fonctions extracellulaires.

Au niveau intracellulaire, le calcium exerce un rôle de premier plan dans le contrôle de la contraction cellulaire, de la sécrétion endocrine et de la fonction rénale. De fait, la résistance vasculaire périphérique, la relâche des hormones neuronales, rénales et surrénaliennes ainsi que le système rénine-angiotensine sont tous

dépendants du calcium. Plusieurs de ces fonctions sont accomplies via l'interaction du Ca^{2+} intracellulaire avec les protéines liant le calcium, comme la calmoduline. La concentration de Ca^{2+} cytosolique libre est 10 000 fois plus faible que celle du Ca^{2+} extracellulaire. Elle est régulée par divers canaux, pompes et autres mécanismes de transport qui contrôlent les mouvements du calcium à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule et entre les différents compartiments intracellulaires.

1.2.2 Métabolisme du calcium

L'apport de calcium alimentaire peut varier entre 200 et 2500 mg par jour. Pour chaque gramme de calcium, 300 mg sont absorbés mais étant donné que, de cette quantité, 150mg se retrouvent sécrétés dans la lumière intestinale, l'organisme en conserve 150mg par jour au total. L'absorption se fait de façon paracellulaire au niveau de l'intestin grêle et transcellulaire au niveau du duodenum. La quantité de calcium soluble ne représente qu'une fraction du calcium total dans l'organisme puisque l'on retrouve la majorité du Ca^{2+} (90%) sous forme d'hydroxyapatite dans le squelette. La calcémie est généralement conservée à 100mg/L ou 2,5mM. On retrouve 40% du calcium (1mM) lié aux protéines (albumine), donc non-diffusible et 10% (0,2mM) diffusible mais complexé par des ions citrate ou phosphate. L'autre fraction, soit 50% (1,2mM), représente le calcium ionique, donc le calcium libre, impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires. Lorsque la concentration de calcium est plus faible que 88mg/L on parle d'hypocalcémie alors que le seuil d'hypercalcémie est à 105mg/L (1).

Au niveau du rein, seulement 1% du calcium est excrété puisque 99% du calcium filtré par le glomérule est réabsorbé par les tubules. Ainsi, 65% du calcium est réabsorbé par le tubule proximal, 25-30% par l'anse de Henlé et 4-9% par le tubule distal et le tube collecteur. Dans le tube proximal, la réabsorption du calcium est parallèle à celle du sodium et de l'eau (1). La réabsorption du calcium au niveau du tubule distal et du tube collecteur est sélective et dépend de la concentration de calcium dans le sang. C'est aussi la partie distale qui est influencée par les hormones calcitropiques.

1.2.3 Régulation de l'homéostasie calcique par les hormones calcitropiques

Étant donné l'important champ d'actions du calcium, le maintien de l'homéostasie calcique est primordial pour la survie de l'organisme et un mécanisme de régulation fine impliquant les hormones calcitropiques a été conservé au cours de l'évolution. Le terme "hormones calcitropiques" se réfère en fait à l'hormone parathyroïdienne (PTH), la calcitonine et la $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferole. Ces trois hormones régulent l'homéostasie calcique via leurs effets sur les fonctions des organes effecteurs soit, l'intestin, le rein et les os.

La parathormone est en grande partie responsable d'un retour à la calcémie normale (figure 1.4). Une diminution de la concentration de calcium extracellulaire est le principal stimulus pour la production et la sécrétion de PTH par la glande parathyroïde. Les niveaux de PTH en circulation augmentent donc rapidement en réponse à une diminution, même faible, de calcium extracellulaire (14). Au niveau

rénal, les effets rapides (en terme de minutes) de la PTH incluent une réduction de la réabsorption du phosphate dans les tubules proximaux et une augmentation de la réabsorption du Ca^{2+} dans les tubules distaux (15). La PTH affecte le transport paracellulaire du Ca^{2+} via la production de l'AMPc et l'activation du cotransporteur NKCC (co-transporteur sodium-potassium-2 chlores).

Les os, plus particulièrement les ostéoblastes, sont aussi une cible de la PTH. Les os représentent le plus grand réservoir de calcium disponible dans l'organisme. Les os sont en constant remodelage, leur formation étant assurée par les ostéoblastes et leur résorption par les ostéoclastes. La production d'ostéoclastes à partir des cellules progénitrices est sous l'influence de facteurs de croissance, d'hormones et de cytokines (16). Leur différenciation demande un contact cellule-cellule entre les ostéoblastes/cellules stromales et les précurseurs des ostéoclastes (17). Le facteur RANKL (receptor activator of NF- κ B-ligand) est nécessaire pour la différenciation des ostéoclastes. De son côté, le facteur OPG (ostéoprotégérine) inhibe la formation des ostéoclastes en altérant la signalisation cellule-cellule et en inhibant leur différenciation. La PTH et le facteur FGF-2 (fibroblast growth factor 2) augmentent la formation de RANKL et inhibent l'expression de OPG. Or, la PTH possède aussi la capacité d'augmenter l'expression de FGF-2. En plus, de son effet sur la différenciation des ostéoclastes, le FGF-2 augmente la prolifération de leur précurseur. La PTH a aussi un effet positif sur l'expression de ICAM-1 (molécule d'adhésion intercellulaire-1) dans les ostéoblastes, ce qui favorise l'adhésion cellulaire et conséquemment, la différenciation des ostéoclastes. Récemment, des

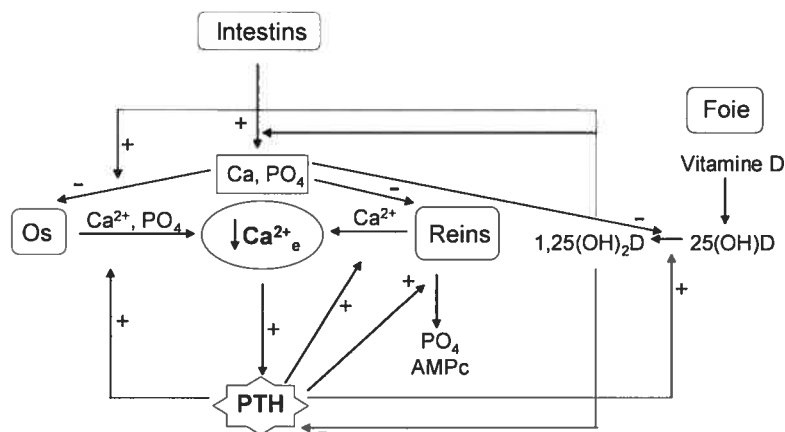
études de microarray ont démontré que 125 gènes étaient régulés par la PTH dans les ostéoblastes. De ce nombre, la PTH stimule l'expression de la collagénase-3 et de TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase), tous deux impliqués dans la dégradation des os. La PTH agit aussi en inhibant des gènes importants pour la formation des os dont BMP-3, 4 et 7 (bone morphogenetic factor). D'autres part, la PTH peut moduler la différenciation des ostéoblastes stimulée par l'endothéline-1 (ET1) en diminuant le récepteur à l'ET1 (ET_B), en augmentant la clairance de ce récepteur grâce à une augmentation de l'expression d'une protéase (enkephalinase) et en inhibant la synthèse de ET1 (18). Les actions de la PTH sont donc très variées et visent la résorption des os. La réponse rapide à l'hypocalcémie est finalement une redistribution du Ca²⁺ emmagasiné en grande quantité dans le squelette vers le fluide extracellulaire.

Si l'hypocalcémie est prolongée (plusieurs heures), la persistance des niveaux élevés de PTH stimulera la 25-hydroxyvitamine D₃-1 α -hydroxylase. Cette enzyme, présente dans les tubules proximaux du rein, convertira la 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D) en son métabolite actif, la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25-(OH)₂D) (19). Cette dernière agit principalement au niveau de l'intestin et favorise la réabsorption du calcium. Du côté apical, la 1,25-(OH)₂D favorise l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule en augmentant la transcription du canal ECaC (epithelial calcium channel). Il a été démontré que le taux d'absorption du calcium était directement proportionnel à la quantité de protéines liant le calcium (calbindines) (1). Ces protéines facilitent le transport du calcium dans le cytosol vers la membrane

basolatérale. La 1,25-(OH)₂D possède la capacité d'augmenter la synthèse de la calbindine-D_{9k}. Enfin, la 1,25-(OH)₂D favorise l'expulsion du calcium de la cellule en augmentant la transcription du gène codant pour la pompe située à la membrane basolatérale, la pompe Ca²⁺-ATPase. Il s'en suit une augmentation de la calcémie. Au niveau rénal, l'effet de la 1,25-(OH)₂D sur la réabsorption calcique mime un peu celle observée dans l'intestin. En effet, la 1,25-(OH)₂D augmente la réabsorption du Ca²⁺ dans le tubule distal en activant l'échangeur Ca²⁺/Na⁺ et en stimulant l'expression des calbindines (20). Comme la PTH, la 1,25-(OH)₂D exerce aussi un effet sur la résorption osseuse en stimulant la formation de RANKL (receptor activator of NF-κB-ligand) et de ICAM-1 (17).

Si l'hypocalcémie persiste plus longtemps (jours ou semaines) ou est plus sévère, la sécrétion de PTH sera augmentée entre autres à cause de la prolifération des cellules de la parathyroïde (21).

PTH et homéostasie calcique



Adaptée de Brown et coll, 1996

Figure 1.4 Effet de la PTH sur différents organes impliqués dans l'homéostasie calcique.

De façon opposée, en hypercalcémie, la production de calcitonine par la thyroïde sera augmentée. La fonction principale de la calcitonine est de diminuer la calcémie. Elle agit en inhibant la résorption des os et en favorisant l'excrétion urinaire de Ca^{2+} (22). La calcitonine inhibe directement l'activité des ostéoclastes. Dans le rein, la calcitonine est responsable de l'inhibition de l'échangeur Na^+/H^+ , de la pompe Na^+/K^+ -ATPase et du cotransporteur NKCC. La diminution de la réabsorption de sodium qui en découle diminue aussi la réabsorption paracellulaire de calcium.

1.2.4 CaR

Le maintien de l'homéostasie calcique est complexe et primordial. De façon à pouvoir ajuster leurs fonctions cellulaires en fonction des niveaux de calcium, les cellules doivent pouvoir déceler les faibles variations de la calcémie. Les cellules de la glande parathyroïde sont très sensibles à des changements de concentration calcique. Le mécanisme par lequel ces cellules réussissent à détecter et répondre aux changements de calcium est demeuré une énigme pendant plusieurs années. Cependant, en 1993, le clonage d'un récepteur sensible au calcium extracellulaire (CaR) et présent à la surface des cellules parathyroïdiennes a permis de clarifier ce processus et de confirmer ce qu'on soupçonnait, soit que le calcium pouvait agir en tant que premier messenger extracellulaire. Le CaR était le premier récepteur décrit ayant un ion comme ligand naturel.

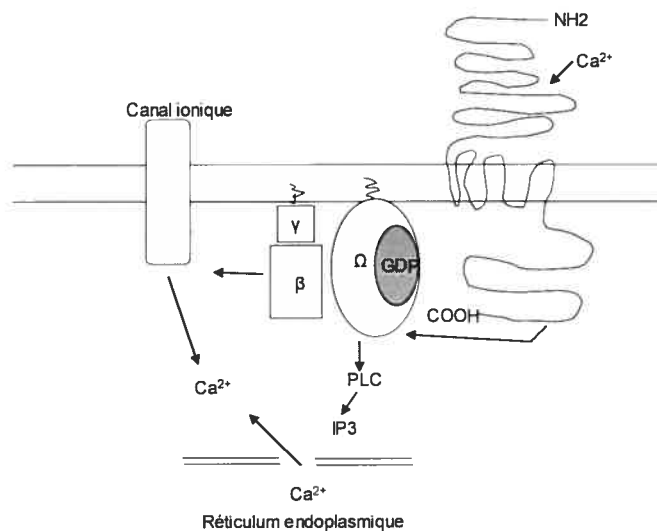
Structure du CaR

Le CaR est un membre de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. Faisant partie du groupe III de cette famille, il est voisin des récepteurs activés par le glutamate (RGM). Le CaR est composé de trois domaines fonctionnels, soit un premier grand domaine extracellulaire, une deuxième région comprenant sept segments transmembranaires et un troisième domaine cytoplasmique (23;24). En plus du Ca^{2+}_e , le CaR répond à d'autres agonistes capables de moduler son activité tels que le Mg^{2+} (ion magnésium), la spermine, les changements de force ionique et les acides aminés (23).

Voies de signalisation empruntées par le CaR

Au niveau des cellules de parathyroïdes bovines, on a observé que des concentrations élevées de Ca^{2+}_e , de Mg^{2+}_e ou d'autres cations induisaient un pic initial de Ca^{2+}_i suivi d'une augmentation plus progressive de Ca^{2+}_i et qu'il y avait accumulation intracellulaire d'inositol phosphate. Le pic initial de calcium a été attribué à une relâche des pools intracellulaires alors que l'entrée de Ca^{2+}_e serait responsable de l'augmentation progressive (24). Ces observations ont mené à l'identification des voies de signalisation intracellulaires utilisées par le CaR. Ainsi, la stimulation du CaR résulte en l'activation de la PLC via la protéine Gq conduisant à la formation d' IP_3 et de DAG (diacylglycérol). L' IP_3 stimule à son tour la mobilisation du calcium du RE (réticulum endoplasmique) et facilite l'entrée de calcium par des canaux ioniques (figure 1.5). L'activation du CaR mène aussi à l'inhibition de l'adénylyl cyclase par une protéine G_i et ainsi à une baisse d'AMPc (25). Enfin, notons aussi que le CaR influence les voies MAPK (mitogen-activated kinase) et les phospholipases A_2 , C et D (26;27).

Stimulation du CaR



Adaptée de Hory, 1999

Figure 1.5 L'activation du CaR résulte en une augmentation du calcium intracellulaire.

Régulation de l'expression du CaR

L'expression du CaR peut être modifiée tant dans un contexte physiologique que pathologique. En conditions physiologiques normales, la forme active de la vitamine D ($1,23(\text{OH})_2\text{D}$) possède la capacité d'augmenter l'expression du CaR dans la parathyroïde et le rein (28). Cette augmentation viserait à faciliter l'inhibition des fonctions de la parathyroïde par le Ca^{2+}_e . Pendant le développement du rein chez le rat, les niveaux de CaR augmentent pendant la période post-natale et persistent chez

l'adulte (29). Dans le cerveau, l'augmentation se produit une semaine après la naissance et n'est que transitoire puisque deux semaines plus tard, les niveaux diminuent et demeurent stables à l'âge adulte (30). L'expression du CaR peut être également diminuée dans les pathologies telles que l'insuffisance rénale et l'hyperparathyroïdie (31;32).

Rôle du CaR dans le maintien de l'homéostasie calcique

Des mutations du récepteur du calcium sont responsables de désordres héréditaires de l'homéostasie calcique. Ainsi, l'hypercalcémie hypocalciurique familiale (FHH) et l'hyperparathyroïdisme néonatal (NSHPT) résultent de mutations inactivant le CaR alors qu'une forme d'hypocalcémie héréditaire est causée par des mutations activant ce récepteur (hypocalcémie autosomique dominante, ADH) (33). Le CaR participe au maintien de l'homéostasie calcique en agissant sur la sécrétion d'hormones calciotropiques (PTH et calcitonine) et en régulant son excrétion.

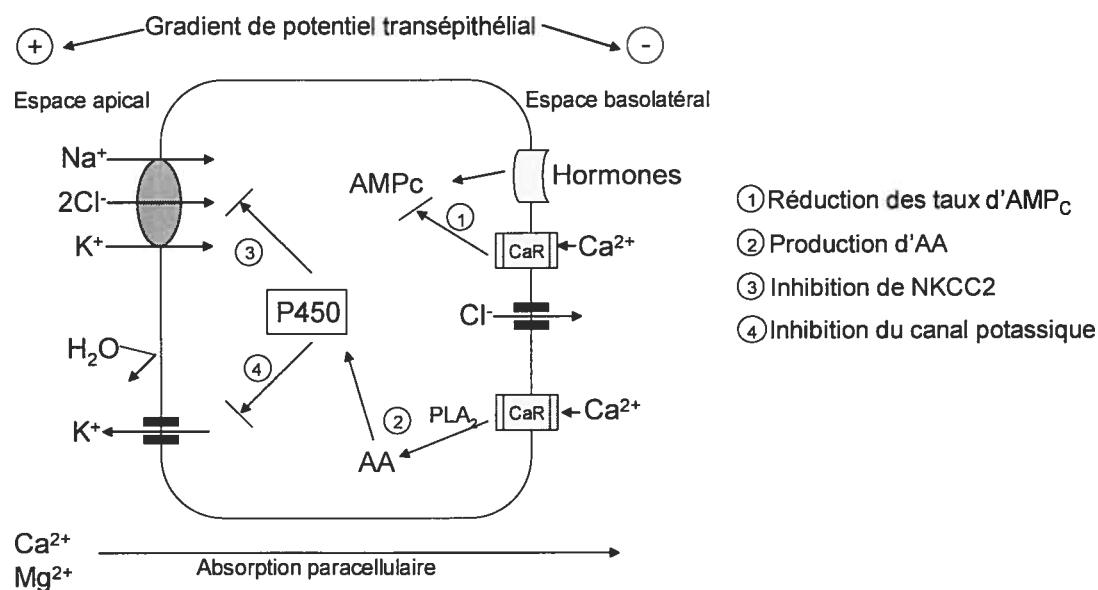
Comme il en a été discuté précédemment, les hormones calciotropiques sont intimement liées au contrôle de la calcémie. Le CaR est le principal médiateur des effets inhibiteurs du calcium circulant sur la sécrétion de PTH. De fait, la sécrétion de PTH est inversement proportionnelle à la calcémie. Le CaR inhibe aussi l'expression du gène de la PTH en agissant au niveau transcriptionnel (23). Le CaR localisé au niveau des cellules C de la glande thyroïde permet à cette dernière d'adapter sa sécrétion de calcitonine selon la concentration calcique extracellulaire. Au niveau de ces cellules cependant, l'effet du calcium est diamétralement opposé à

son effet sur les cellules de la parathyroïde. En effet, les cellules C répondent à une augmentation de Ca^{2+}_e en augmentant la sécrétion de calcitonine (21).

Le CaR est présent essentiellement dans toutes les parties du néphron et participe à la réabsorption du calcium par la portion corticale ascendante large de l'anse de Henle et à celle de l'eau par le tubule collecteur (24;34). Les concentrations élevées de Ca^{2+}_e ou de Mg^{2+}_e ont les effets suivants sur la fonction rénale : inhibition du transport du NaCl dans le CTAL (portion corticale ascendante large de l'anse de Henle), réduction de la réabsorption de calcium dans le MTAL (portion médullaire ascendante large de l'anse de Henle) et inhibition de l'action des hormones antidiurétiques (35). La réabsorption du Ca^{2+}_e ou du Mg^{2+}_e dans le CTAL se fait principalement par voie paracellulaire. Dans ce type de transport, la réabsorption de ces ions est possible grâce au gradient de potentiel positif transépithélial généré par le transport du Na^+ , du K^+ (ion potassique) et des 2Cl^- par le co-transporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ de la membrane apicale ainsi que par le recyclage du K^+ via les canaux potassiques. Le Ca^{2+}_e affecte le transport de l'eau et du NaCl dans le TAL et le tubule collecteur en inhibant l'accumulation d'AMPC stimulée par les hormones ou via des voies de signalisation influencées par le Ca^{2+}_i . Le modèle proposé pour expliquer le rôle du CaR dans cette régulation est présenté à la figure 1.6. La réabsorption du NaCl et du calcium dans le TAL est sous l'influence d'hormones générant de l'AMPC, dont la PTH. Ainsi, l'accumulation d'AMPC stimule l'activité du cotransporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$. Le CaR couplé à la protéine Gαq réduit les niveaux d'AMPC, ce qui mène à une réduction du transport du NaCl et du calcium par

processus paracellulaire. De plus, l'activation du CaR conduit à la production d'acide arachidonique (AA) via la stimulation de la PLA₂. Le métabolite de l'AA (20-HETE) produit par le cytochrome P-450 inhibe le canal potassique et le cotransporteur Na⁺-K⁺- 2Cl⁻. Conséquemment, la réabsorption du calcium (et du Mg²⁺) est aussi diminuée.

Réabsorption du calcium par voie paracellulaire dans le rein



Adaptée de Hebert *et coll.*, 1997

Figure 1.6 Dans la voie de transport paracellulaire, la réabsorption de calcium et celle de sodium sont intimement liées.

Fonctions de CaR indépendantes de l'homéostasie calcique

La présence du CaR à la surface de nombreuses cellules ne participant pas à la régulation du calcium extracellulaire laissait entrevoir la possibilité que ce récepteur pouvait moduler d'autres fonctions cellulaires. Le but ici n'est pas d'en faire une description exhaustive mais plutôt de prendre conscience de l'étendue des actions du CaR dans l'organisme. Ainsi, le CaR serait le médiateur des effets positifs du calcium sur la sécrétion de la gastrine, de l'ACTH (adrenocorticotrop hormone), des facteurs de croissance et de l'insuline et de ses effets négatifs sur la sécrétion de glucagon et probablement de rénine (36-40). Le CaR contrôle aussi trois fonctions cellulaires majeurs, soient la prolifération, la différenciation et la mort par apoptose. Le CaR a un effet positif sur la prolifération des fibroblastes mais négatif sur celle des kératinocytes, des cellules de la glande parathyroïde et du colon (26;41-43). De même, le CaR stimule la différenciation des kératinocytes et des cellules mammaires et protège les fibroblastes de l'apoptose (43-45). De son côté, la chimiotaxie des ostéoblastes, des cellules stromales et des macrophages sera favorisée par une concentration élevée de Ca^{2+}_e (46-48). Enfin, au niveau de l'expression des gènes, notons que le CaR diminue l'expression de la PTH mais augmente l'expression de la calmoduline et de la calcitonine (49;50).

1.2.5 Autres récepteurs de calcium

La capacité de certaines cellules de répondre à des changements de Ca^{2+}_e même en absence de CaR suggérait la présence d'autres récepteurs calciques. Parmi les candidats, on retrouve un type de récepteurs faisant partie de la même famille que le

CaR, soit les mGluRs (récepteurs métabotropiques du glutamate), qui peuvent réagir au Ca^{2+}_e en plus de leur principal agoniste, le glutamate. Un autre candidat sérieux est une protéine de la famille des récepteurs des LDL (lipoprotéine de basse densité), la mégaline/gp330. Des niveaux élevés de mégaline/gp330 sont entre autres retrouvés dans les cellules de la parathyroïde, des tubules proximaux et du placenta (23;24;51). Elle a été associée à la réabsorption de l'albumine, de l'insuline et du rétinol entre autres (52-55). La fonction de ce récepteur dans la réponse au calcium n'est pas encore claire, mais il pourrait interagir avec le CaR ou participer à son internalisation (23). Des anticorps dirigés contre la mégaline/gp330 interfèrent avec l'inhibition la sécrétion de PTH par le Ca^{2+}_e (56). Une diminution de l'expression de la mégaline/gp330 dans les parathyroïdes de patients atteints d'hyperparathyroïdie (HPT) pourrait donc contribuer à la baisse de sensibilité au Ca^{2+}_e sur la sécrétion de PTH observée dans cette pathologie (57).

1.2.6 Le nCARE (negative Calcium Responsive Element)

Jusqu'à présent, très peu de gènes répondant négativement au calcium extracellulaire ont été clonés. C'est dans le promoteur du gène codant pour la parathormone (PTH) que des éléments de réponse négative au calcium extracellulaire (nCARE-A et nCARE-B) ont d'abord été identifiés. Le nCARE-B ou de type 2, qui consiste en une séquence palindromique de 12pb entrecoupée de trois paires de bases, a été identifié à -3,5kb de la région codante du gène de la PTH. Cette séquence palindromique est précédée d'une séquence riche en thymidines probablement importante pour la fonction du nCARE puisque l'élimination de quatre thymidines

en amont de l'élément empêche la liaison de protéines (58). Des expériences de retard sur gel ont montré qu'un complexe protéique pouvait lier les 12pb du palindrome et la séquence riche en thymidines. Il a été proposé que la séquence palindromique favorisait la liaison de dimères ou de multimères de protéines à l'ADN. D'autre part, il a été suggéré que le rôle des thymidines était d'éliminer les séquences d'ADN empêchant les protéines liant le nCARE d'interagir directement avec la machinerie transcriptionnelle de base ou encore, de faciliter l'accès de la machinerie transcriptionnelle au palindrome, site de liaison des protéines. Une variation dans la concentration de Ca^{2+} extracellulaire aussi modeste que 1mM est capable non seulement d'augmenter la liaison des protéines au nCARE mais aussi de supprimer la transcription de gènes possédant cet élément dans leur promoteur, dont la PTH (59).

L'endonucléase APE1 (APEX, HAP-1, Ref-1) est une protéase multifonctionnelle impliquée dans la réparation de l'ADN et qui, grâce à son activité redox, participe aussi à l'activation de facteurs de transcription. APE1 a également été identifié comme étant un des composants du complexe protéique nucléaire liant le nCARE (60). Le calcium extracellulaire a différents effets sur APE1 (figure 1.7). Une augmentation de l'expression de APE1 a été rapportée en présence d'une concentration de Ca^{2+} extracellulaire élevée (59). D'autres auteurs ont rapporté une augmentation de la translocation de APE1 au noyau en présence d'une concentration élevée de calcium intracellulaire (61). Un autre modèle a aussi été proposé pour expliquer l'effet répresseur de APE1. Ce modèle propose qu'*in vivo*, une certaine

quantité de protéines APE1 non-acétylées soit liée à des HDACs (histones deacetylases). Une augmentation de Ca^{2+} stimule l'activité acétyltransférase du co-activateur transcriptionnel p300, possiblement via la CaMKIV (calmoduline kinase IV). p300 acétyle alors APE1, augmentant ainsi son affinité de liaison au nCARE. La transcription du gène est alors diminuée à cause des HDACs présent dans le complexe protéique liant le nCARE (59;62). Fait intéressant à noter, le promoteur du gène codant pour APE1 possède lui-même un nCARE-A et deux nCAREs-B. Un de ses nCARE-B serait responsable de l'autorégulation de l'expression de APE-1 par le calcium (60;63).

 Modulation de la protéine APE1 par le calcium extracellulaire

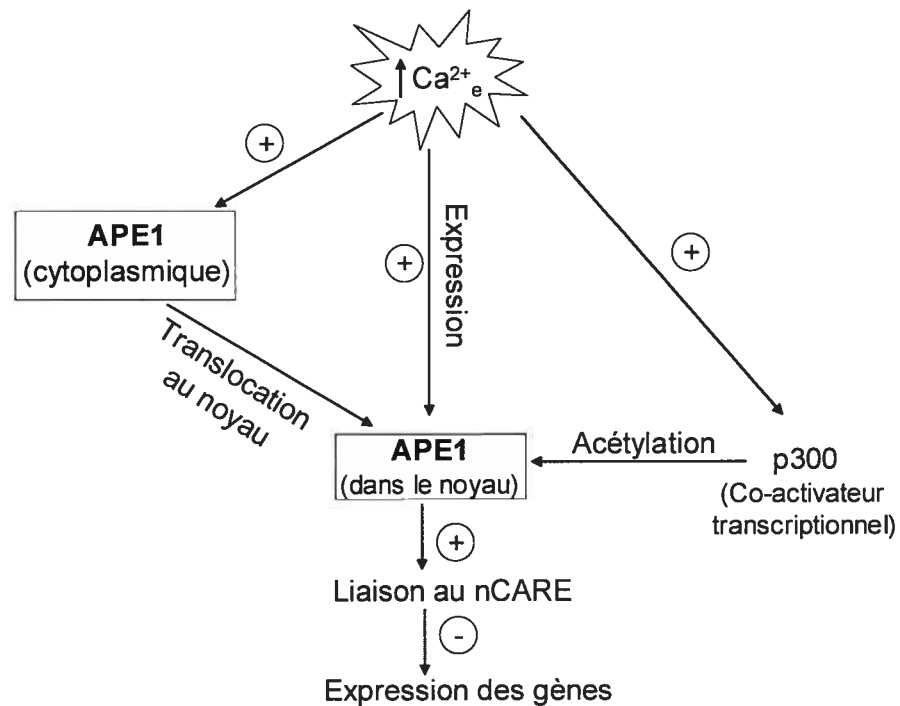


Figure 1.7 La présence de concentrations élevées de calcium extracellulaire favorise d'une part l'expression de la protéine APE1 et d'autre part sa translocation au noyau. Dans le noyau, le co-activateur transcriptionnel p300, aussi activé par le Ca^{2+}_e , acétyle APE1, ce qui augmente sa liaison au nCARE. En conséquence, l'expression des gènes possédant un nCARE est diminuée.

La présence de deux bandes dans les expériences de retard sur gel et l'incapacité pour APE1 de lier seul le nCARE-B suggérait la présence d'autres protéines dans le complexe. Le groupe de Kuninger a démontré que le complexe nucléaire se liant au nCARE-B du gène de APE1 contenait les protéines APE1 et hnRNP-L (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L) (60). Dans leurs expériences, les extraits nucléaires des cellules HeLa avaient une meilleure efficacité de liaison que les protéines recombinantes APE1 et hnRNP-L seules, suggérant que d'autres petites molécules soient également nécessaires pour la formation optimale du complexe ou que APE1 et/ou hnRNP-L soient modifiées de façon post-traductionnelle *in vivo* (60).

Une étude a suggéré qu'il pouvait exister 111 copies du nCARE dans le génome humain. Étant donné la nature ubiquitaire du complexe protéique liant le nCARE, il est possible que cet élément puisse se retrouver dans la région 5'UTR d'autres gènes et réguler ainsi leur expression. Des gènes jouant un rôle dans le métabolisme calcique et possédant un nCARE dans leur région promotrice ont été identifiés (64). Ces gènes sont ceux de la calmoduline, de la β -myosine, de l'érythropoïétine, de la gastrine et du récepteur aux oestrogènes (64). Le groupe d'Okazaki a de plus démontré la présence d'un nCARE dans cinq autres gènes; la myeloperoxydase chez la souris, l'unité β de l'ATP synthase humaine, le (HuERS-P1-2) 5'-LTR (human endogenous retrovirus-like sequence), la vasopressine et l'ANP chez le rat (59). Récemment, la rénine a aussi été incluse dans ce groupe de gènes possédant un

nCARE (61). L'homologie entre les séquences est très élevée mais la localisation du nCARE dans les régions promotrices varie beaucoup d'un gène à l'autre.

1.2.7 Le calcium et l'hypertension artérielle

L'hypertension artérielle est associée à des anomalies du métabolisme calcique tant dans l'hypertension expérimentale que dans l'hypertension essentielle chez l'humain (65). Plusieurs problèmes reliés soit à la régulation de l'homéostasie calcique ou à la réponse de l'organe au signal calcique intracellulaire ont été identifiés dans les modèles expérimentaux. Les organes impliqués incluent le duodénum, les reins, les os, la glande parathyroïde et le muscle lisse vasculaire (66).

Une augmentation de l'apport calcique dans la diète permet de réduire la pression artérielle des rats génétiquement hypertendus (67). Cet effet s'explique par un retour à la normale des anomalies calciques et des changements hormonaux caractéristiques de ces modèles d'hypertension. Ainsi, on croit que l'augmentation nutritionnelle de calcium conduit à une augmentation de calcium dans le sérum, ce qui entraîne une réduction du taux de PTH (67;68). Ceci altérerait la perméabilité au calcium de la membrane des VSMC (cellule du muscle lisse vasculaire) et sa contractilité, résultant en une réduction de la résistance vasculaire périphérique et finalement de la pression sanguine par un mécanisme encore méconnu, mais impliquant probablement le CaR (67).

Les transports nets du calcium intracellulaire et extracellulaire sont anormaux dans certaines formes d'hypertension, conduisant en un équilibre calcique négatif. Cet équilibre négatif se traduit par une concentration de calcium intracellulaire élevée en présence d'une concentration de calcium extracellulaire faible (69;70). Comme le calcium est responsable de la contraction des cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC), ce déséquilibre calcique pourrait mener à une contractilité accrue des vaisseaux sanguins que l'on retrouve dans l'hypertension.

Des études ont aussi montré que la fluidité membranaire chez les hypertendus était diminuée (71;72). Or, pour le bon fonctionnement des récepteurs, de la sécrétion hormonale, de la régulation du volume cellulaire et de la composition ionique du milieu intracellulaire, l'intégrité des protéines membranaires et leur insertion dans la membrane doivent absolument être conservées. La présence d'une membrane cellulaire rigide pourrait expliquer les anomalies du transport ionique observées dans l'hypertension. En effet, l'activité de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et la pompe Ca^{2+} ATPase, responsables de la sortie du calcium des cellules, est diminuée dans l'hypertension, augmentant ainsi la contraction des VSMC et part le fait même, le tonus vasculaire (73;74).

L'augmentation de la concentration calcique dans le cytosol se produit grâce au relâchement de calcium par le réticulum sarcoplasmique (RS). Or, il semble que cette libération de calcium par le RS soit accentuée dans les VSMC des SHR, expliquant ainsi l'augmentation de calcium dans ces cellules (75).

Des protéines directement impliquées dans le métabolisme calcique présentent des niveaux anormaux dans l'hypertension artérielle. Il s'agit de la calmoduline, des protéines CaBP9K et CaBP28K (calbindines-D), de IMCAL (Integral membrane calcium-binding protein), des hormones calciotropiques (la PTH et la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (le métabolite actif de la vitamine D)) et du PHF (Parathyroid Hypertensive Factor) (76).

1.3 Le sodium

Le sodium est le principal cation des liquides extracellulaires. Chez un adulte de 70kg, la quantité totale de sodium dans l'organisme est de l'ordre de 100g. L'apport alimentaire de sodium est d'environ 1 à 4 g/jour et est principalement sous forme de chlorure. Son absorption digestive est très rapide et quasi complète.

La concentration plasmatique de sodium est de 140mmole/L. Lorsque la concentration de sodium est inférieure à 136mmole/L, on parle d'hyponatrémie due soit à une diminution de sodium dans un volume aqueux normal, soit à une augmentation du volume aqueux. De façon opposée, une augmentation de sodium ou une diminution de volume aqueux mène à une hypernatrémie si la concentration de sodium est supérieure à 144mmole/L. Au niveau cellulaire, on retrouve très peu de sodium comparativement à une grande quantité de potassium. C'est en fait dans les os que l'on retrouve la plus grande quantité de sodium, soit 40% du sodium total.

Le sodium est en grande partie éliminé dans l'urine alors que l'élimination digestive, par la sueur ou les larmes est faible. Après la filtration rénale, le Na^+ est réabsorbé au niveau du tube contourné proximal et dans la branche ascendante de l'anse de Henlé, au niveau du tube contourné distal et du tube collecteur (figure 1.8).

Sites de réabsorption du sodium dans le rein

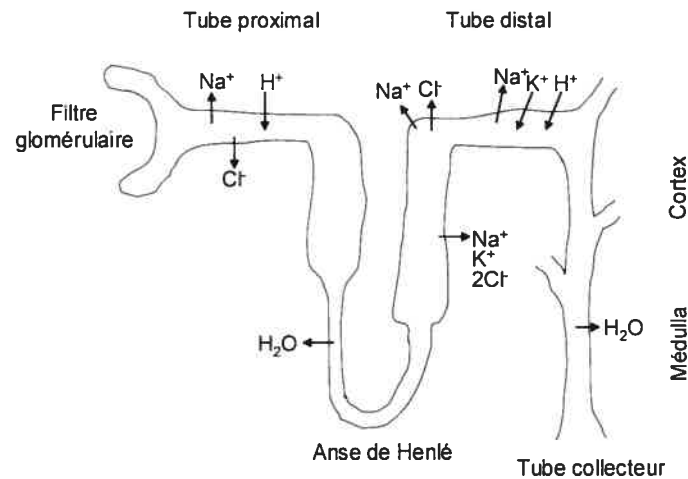


Figure 1.8 Le sodium est réabsorbé au niveau du tubule proximal, du TAL, du tubule contourné distal et du tube collecteur.

Le transfert du sodium entre la cellule et le milieu extracellulaire est dépendant de l'activité de divers transporteurs membranaires. Ainsi, l'entrée de Na^+ est assurée par des canaux dépendants du voltage, des échangeurs et des cotransporteurs alors que sa sortie s'effectue grâce à la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$. La capacité des échangeurs et des transporteurs de faire entrer les ions monovalents dans la cellule dépend du gradient de concentration ionique produit par la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$

qui favorise la sortie de trois ions Na^+ contre deux ions K^+ . L'échange Na^+/Ca^+ est bidirectionnel et permet la sortie d'un ion Ca^{2+} contre l'entrée de trois ions Na^+ . Par contre, si la concentration de Na^+ intracellulaire est trop élevée, l'échange se fera de façon opposée. De son côté, l'échangeur électroneutre Na^+/H^+ a pour rôle de contrôler le pH intracellulaire en permettant l'entrée d'un ion Na^+ et la sortie d'un proton.

1.3.1 Stress osmotique

Au cours de l'évolution, plusieurs organismes vivants dont les bactéries, les levures, les plantes et les animaux ont conservé la capacité de s'adapter à un stress hyperosmotique (77). Ce type de stress entraîne une réduction du volume cellulaire, ce qui peut avoir des effets délétères pour la cellule. En effet, une réduction de volume amène entre autres une modification du cytosquelette et une altération des réactions métaboliques causées par la modification de la concentration d'enzymes et de leurs substrats (78).

La régulation de l'osmolarité du fluide extracellulaire et la concentration de sodium sont intimement liées puisque le sodium représente l'ion le plus abondant du compartiment extracellulaire. Généralement, chez les mammifères, peu de cellules sont soumises à un stress hyperosmotique, la concentration de NaCl dans le fluide extracellulaire étant contrôlée de façon très efficace (79). Cependant, des changements d'osmolarité de l'ordre de 3 à 4% peuvent être détectés par différents types de cellules de façon à maintenir un volume cellulaire normal (80). Au niveau

rénal, cette capacité d'adaptation devient primordiale et permet aux cellules de la médulla d'assurer leurs fonctions et de répondre à des concentrations de fluide extracellulaire variant de 300 à 1 200 mOsmol (unité de mesure de l'osmolarité exprimée en millimole par litre) chez les humains (81). Ainsi, un des rôles clés du rein, est de régler de façon très précise la composition corporelle d'eau et d'électrolytes de façon à conserver une homéostasie constante (82). C'est en fait la médulla, qui, en diluant ou en concentrant l'urine, permet le maintien de la balance osmotique chez les mammifères (83). La plupart des cellules du corps sont exposées à une osmolalité normale d'environ 290 mOsmol/kg même si l'absorption d'eau varie énormément. Au niveau de la médulla rénale, les cellules sont exposées à de grandes concentrations de NaCl et d'urée, dépendamment si l'urine est concentrée ou diluée. Chez le rat par exemple, pendant la diurèse, quand l'osmolalité de l'urine est de moins de 100 mOsmol/kg, la concentration de NaCl dans le fluide interstitiel de la médulla est élevée, produisant une osmolalité d'environ 600 mOsmol/kg. À l'opposé, pendant l'antidiurèse, quand l'osmolalité de l'urine est de 1700 mOsmol/kg, la concentration de NaCl et d'urée augmente beaucoup dans le fluide interstitiel de la médulla (83). L'humain peut produire de l'urine ayant une osmolalité aussi faible que 50 mOsmol/kg et aussi élevée que 1200 à 1400 mOsmol/kg pour répondre à ses différents besoins (1).

Pendant l'antidiurèse, même si les cellules de la médulla rénale du rat sont exposées à des concentrations de 500mM ou plus de NaCl et de 1000mM ou plus d'urée, elles survivent et continuent de fonctionner (83). Pour ce faire, elles utilisent plusieurs

mécanismes qui leur permettent de s'adapter à ces variations osmotiques. À court terme (minutes), les cellules s'arrêtent en phase G2M du cycle cellulaire alors qu'à long terme (heures et jours), c'est l'accumulation de sels inorganiques et l'induction des protéines de chocs thermiques (HSP) qui prennent la relève (84). Il sera question de ces différents mécanismes dans les sections qui suivent.

1.3.2 Mécanismes de réponse à un stress osmotique

Arrêt des cellules en phase G2M du cycle cellulaire par le stress hyperosmotique

Des concentrations élevées de NaCl et/ou d'urée auront pour conséquence de retarder le début du cycle cellulaire réduisant ainsi le taux de prolifération (85). L'arrêt rapide des cellules en G2 en conditions hypertoniques permet de les protéger en diminuant les dommages à l'ADN que causerait une entrée trop rapide en mitose (84). En conditions hyperosmotiques, les cellules mIMCD (murine inner medullary collecting duct cells) s'accumulent en fait dans la phase G2M du cycle cellulaire (86). Il est intéressant de noter que bien que l'urée et le NaCl (de façon plus marquée que l'urée) ralentissent l'entrée des cellules en phase S et causent un arrêt en G2M, la combinaison des deux n'a pas d'effet additif (85). Il semble effectivement que la présence d'urée réduise l'effet de concentrations élevées de NaCl et permette une certaine progression des cellules mIMCD en phase S. L'urée agit probablement en activant de façon spécifique les mécanismes de réparation et/ou de synthèse de l'ADN contrecarrant ainsi l'inhibition de la synthèse d'ADN causée par le NaCl (85).

Cette réponse à l'hyperosmolarité implique évidemment l'augmentation de l'expression ou l'activation de certaines protéines de réponse au stress. Parmi ces protéines, on retrouve les protéines GADD (growth arrest and DNA damage-inducible protein) induites par une variété de stress comme les radiations UV ou les carcinogènes chimiques en plus de l'hyperosmolarité (86). Le stress osmotique amène donc une augmentation de l'expression de GADD45 et GADD153. Ces protéines sont associées à un arrêt du cycle cellulaire et à la réparation de l'ADN dans plusieurs types cellulaires. Au niveau de GADD45, les trois isoformes de cette protéine sont augmentées suite à un stress hyperosmotique par la stabilisation de leur ARNm (87).

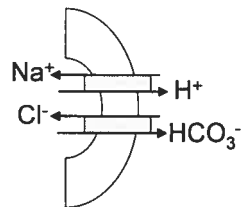
RVI et accumulation de sels inorganiques

La réponse initiale des cellules dont le volume est diminué par l'hypertonicité est l'entrée de sels inorganiques (K^+ et Na^+) et l'influx d'eau dans ces cellules (figure 1.9). Ce processus, appelé RVI (regulatory volume increase), aide à restaurer le volume cellulaire diminuant ainsi les conséquences mécaniques de la diminution de volume des cellules et permet aussi de diminuer l'encombrement moléculaire (79). Le RVI met principalement en jeu le cotransporteur NKCC1 et l'échangeur Na^+/H^+ (88-90). L'activité de l'échangeur Na^+/H^+ entraîne une alcalinisation cellulaire, ce qui active l'échangeur Cl^-/HCO_3^- (91). Dans certains types cellulaires, l'activation de canaux sodiques et/ou de canaux cationiques non-sélectifs est responsable de l'accumulation d'électrolytes pendant le RVI (92-95). La dépolarisation ainsi créée par le Na^+ favorise l'entrée de Cl^- dans la cellule. D'un autre côté, la diminution du

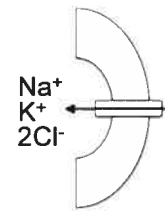
volume cellulaire peut inhiber les canaux K^+ et Cl^- de façon à prévenir la perte de ces électrolytes (96). La pompe $Na^+-K^+-ATPase$ peut aussi être activée et remplacer le sodium accumulé par du potassium (91).

Systèmes de transport ionique impliqués dans le RVI

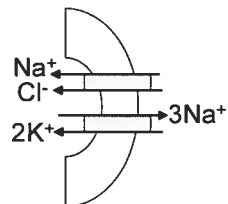
Activation parallèle
des échangeurs Na^+/H^+ et Cl^-/HCO_3^-



Activation du cotransporteur NKCC1



Activation de canaux Na^+ et
de la pompe $Na^+/H^+-ATPase$



Inhibition des canaux K^+ et Cl^-

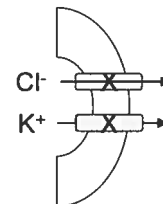
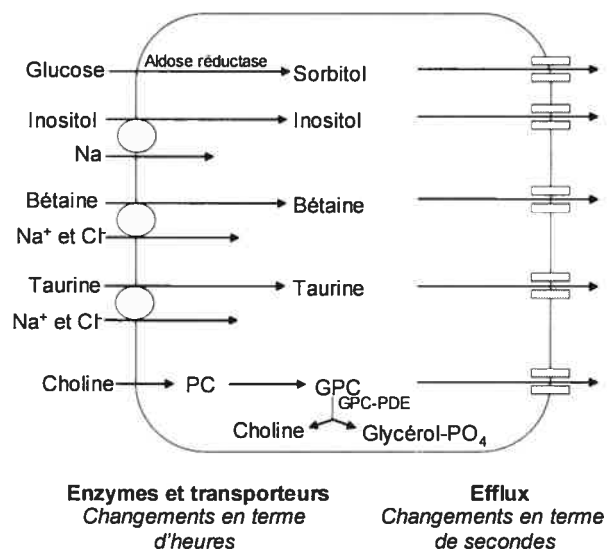


Figure 1.9 L'hypertonie active plusieurs systèmes de transport ionique de façon à restaurer le volume cellulaire.

Malgré le RVI, la concentration intracellulaire de sels inorganiques demeure élevée et peut altérer la structure et la fonction des protéines et de l'ADN, et perturber ainsi la fonction cellulaire. L'accumulation d'osmolytes organiques compatibles permet de rétablir la concentration intracellulaire de sels inorganiques vers les niveaux normaux. Les osmolytes organiques compatibles ont la propriété unique de ne pas perturber les macromolécules cellulaires. Ils peuvent donc être accumulés en grandes quantités à l'intérieur des cellules alors qu'une même concentration de sels inorganiques serait dommageable (79;97;98). Il existe trois classes d'osmolytes organiques : les polyols (sorbitol et inositol), les acides aminés et leurs dérivés (taurine, alanine et proline) et les méthylamines (bétaine et glycérophosphocholine) (79;97). Les cellules médulla interne (cellules épithéliales, cellules interstitielles des papilles, cellules des papilles des tubules collecteurs) accumulent les polyols et les méthylamines (99). La concentration de ces osmolytes varie avec la concentration de sels dans la médulla et aide à protéger les cellules de l'hypertonie (79).

Le processus d'accumulation d'osmolytes organiques est illustré à la figure 1.10. C'est un processus lent puisqu'il demande la transcription et la traduction de gènes codant pour les transporteurs et les enzymes qui catalysent la synthèse de ces osmolytes (97).

Accumulation d'osmolytes organiques



Adaptée de Burg et coll., 1997.

Figure 1.10 L'accumulation des osmolytes organiques en réponse à des changements de NaCl interstitiel dépend de la transcription d'enzymes et de transporteurs et de ce fait est très lente. Par contre, l'efflux contrôlé des osmolytes en réponse à l'hypotonicité est beaucoup plus rapide.

Induction des protéines de choc thermique (HSP)

Les protéines de choc thermique sont des chaperons moléculaires qui préviennent l'agrégation des protéines dénaturées en participant au repliement et à l'assemblage de ces protéines. L'augmentation d'osmolarité induit l'expression de plusieurs HSP dont HSP70, HSP25/27 et Osp94 (100). Les taux d'ARNm de hsp70 dans les

MDCK (Madin-Darby canine kidney) augmentent deux heures après le stress hyperosmotique. La réponse de l'hsp70 à l'hypertonie est donc plus rapide que l'accumulation d'osmolytes organiques (101). De plus, l'accumulation de bétaïne et d'inositol atténue l'augmentation de l'ARNm de hsp70 (102). Il est donc proposé que les HSP protègent l'intégrité des protéines intracellulaires jusqu'à ce que les osmolytes organiques s'accumulent et que les taux de Na^+ et K^+ soient réduits (101).

Régulation de l'expression des gènes par le stress osmotique

Étant donné son influence sur les canaux ioniques et les transporteurs localisés à la membrane plasmique, les altérations de volume cellulaire participent à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires comme le transport épithélial, le métabolisme, la contraction, la sécrétion hormonale, la migration, la prolifération et la mort cellulaire. De nombreux gènes sont sensibles à des altérations de volume cellulaire incluant les éléments du cytosquelette, les molécules de signal, les protéines de transport et les enzymes (103). Diverses voies de signalisation sont impliquées dans la détection et la réponse des cellules au stress hyperosmotique ou au changement de volume cellulaire et l'expression de plusieurs gènes s'en trouve altérée (79). L'expression de gènes impliqués dans l'osmorégulation comme l'aldose réductase (catalyse la production de sorbitol à partir du glucose), le transporteur de l'inositol (SMIT), de la bétaïne et de la taurine est alors augmentée pour permettre l'accumulation d'osmolytes organiques (77;79). L'augmentation de la transcription de ces gènes serait dépendante de l'augmentation intracellulaire de Na^+ et K^+ plutôt que du changement de volume cellulaire. En effet, l'addition d'urée ne stimule pas

leur transcription contrairement à l'addition de raffinose ou de NaCl. La différence principale entre l'urée et le raffinose, c'est que l'urée pénètre rapidement dans la cellule créant ainsi très peu de réduction du volume cellulaire. De son côté, le raffinose demeure à l'extérieur de la cellule et cause une réduction du volume cellulaire résultant en une augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ et de K^+ (79). Toutefois, des expériences effectuées avec la ouabaïne, un inhibiteur de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, indiquent que la transcription de ces gènes corrèle avec la concentration de Na^+ et de K^+ mais n'est pas significativement reliée au volume cellulaire (79;104). De plus, une grande concentration de bétaine dans le milieu inhibe la transcription de l'aldose réductase alors que la transcription du transporteur de la bétaine est inhibée autant par le sorbitol, l'inositol que la bétaine elle-même. Ces trois molécules étant chimiquement très différentes, il est peu probable qu'elles affectent la transcription directement et de la même manière. Elles agiraient plutôt indirectement en modifiant la concentration intracellulaire de sels (79).

L'hypertonie augmente aussi l'expression de HSP-70, GADD45 et GADD153 comme mentionné dans des sections précédentes de ce travail ainsi que de d'autres gènes codant pour des protéines non liées à l'osmorégulation comme par exemple le Sgk (serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase) et c-jun (98;105).

D'un autre côté, l'expression de certains gènes se trouve diminuée dans un milieu hyperosmotique, comme ceux codant pour la protéine CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) et pour VCAM-1 (Vascular cell adhesion

molecule-1) (106;107). Le CFTR est une protéine de transport membranaire, plus particulièrement un canal chlorique. Des mutations du gène codant pour le CFTR sont responsables de la mucoviscidose (cystic fibrosis, CF). Plusieurs anomalies ioniques ont été observées chez les patients souffrant de fibrose kystique et ont été associées à une dysfonction du CFTR entraînant la rétention des ions Cl^- à l'intérieure de la cellule et empêchant la sortie passive d'eau. Au niveau de la régulation du gène, une concentration élevée de NaCl diminue son expression dans les cellules HT-29, Calu-3, T84 et Hela. Comme l'urée et le mannitol ont le même effet que le NaCl, l'expression de CFTR serait dépendante de l'hyperosmolarité plutôt que des ions Na^+ et Cl^- (107). Il semble que la diminution de la transcription du CFTR fasse partie de la réponse générale de la cellule à un stress hyperosmotique.

De son côté, VCAM-1 est une molécule d'adhésion dont l'expression par les cellules endothéliales est induite lors d'inflammation chronique ou aiguë (106). L'expression de VCAM-1 est contrôlée par l'IRF-1 (interferon regulatory factor-1) qui est lui-même activé par le $\text{TNF-}\alpha$ (tumor necrosis factor alpha) et l' $\text{IFN-}\gamma$ (interferon gamma). En condition hyperosmotique, l'expression de l'IRF-1 et son activité de liaison, toutes deux induites par $\text{TNF-}\alpha$ et l' $\text{IFN-}\gamma$, sont inhibées. Par voie de conséquence, IRF-1 est responsable de la diminution de l'expression de VCAM-1 induite par les cytokines pro-inflammatoires en condition hyperosmotique (106). Des fluctuations pathologiques d'osmolarité plasmatique peuvent donc influencer la réponse inflammatoire et les mécanismes de défense de l'organisme.

1.3.3 Éléments de réponse au stress hyperosmotique

La présence d'éléments de réponse dans la région 5'UTR de certains gènes dont l'expression est modulée par l'osmolarité permet d'expliquer en partie leur régulation transcriptionnelle. Ainsi, la région promotrice de l'aldose réductase contient un élément de réponse au stress hyperosmotique nommé ORE (osmotic response element) (77). Cet élément de 12 pb a été identifié dans le promoteur du gène humain et de lapin de l'aldose réductase et 10 nucléotides sont conservés entre les deux espèces, permettant la liaison de protéines nucléaires en conditions hyperosmotiques (79). Un élément de réponse ayant un degré de similarité très élevé avec l'ORE a été retrouvé dans le promoteur du gène du transporteur de la bétaine (BGT1), de l'inositol et de Osp94. L'élément a été nommé TonE (tonicity-responsive enhancer element). Étant donné la grande similitude entre les séquences des éléments ORE et TonE, une séquence consensus a été établie et dans la littérature on réfère généralement à un élément commun ORE/TonE. En condition hyperosmotique, on observe une augmentation de la liaison du facteur de transcription TonEBP/OREBP à la séquence consensus. En effet, l'hypertonie cause une translocation rapide de TonEBP/OREBP au noyau de même que sa phosphorylation, alors qu'à plus long terme il y a augmentation de son abondance dans la cellule (108). De son côté, la région promotrice du gène codant pour l'échangeur Na^+/H^+ (NHE-2) contient un nouvel élément, OsmoE, qui agit de concert avec un TonE pour la régulation transcriptionnelle de NHE-2 par l'osmolarité (109).

Un autre élément, le nCARE, décrit précédemment dans cette thèse pour son implication dans le contrôle de l'expression des gènes par le calcium extracellulaire, se trouve lui aussi à jouer un rôle en conditions hyperosmotiques. Ainsi, l'hyperosmolarité causée par la présence de NaCl mais non d'urée dans le milieu augmente la transcription de la PTH. Le NaCl active des protéines kinases qui phosphorylent les protéines se liant au nCARE, dont la protéine APE1, ce qui diminue leur force de liaison et enlève ainsi l'inhibition de la transcription du gène de la PTH (80).

Le promoteur du gène de Sgk possède quant à lui un élément de 10pb riche en GC nécessaire à l'induction de la transcription en milieu hyperosmotique. Le complexe protéique se liant à cet élément comprendrait en autres le facteur Sp1 (105). D'autres éléments de réponse à l'hypertonicité demeurent à être caractérisés, comme celui retrouvé dans le promoteur du gène de l'aquaporine-1 (AQP1). Il ne serait pas surprenant non plus que d'autres séquences soient aussi identifiées dans la région 5'UTR de gènes régulés par le stress hyperosmotique.

1.3.4 Voies de signalisation impliquées dans la régulation des gènes d'osmorégulation

La question que l'on se pose est à savoir comment l'hyperosmolarité peut réguler l'interaction des facteurs de transcription avec leurs éléments de réponse sur l'ADN. Il semble que ce soit par la phosphorylation des protéines trans-activatrices via l'activation d'au moins trois voies des MAPK (79). Dans la voie ERK, Raf (une MAPKKK) active MEK (une MAPKK) qui à son tour active ERK (une MAPK). Dans les cellules en culture, il a été démontré que le stress hyperosmotique active rapidement Raf-1, MEK et ERK (79;110). Jusqu'à maintenant, on connaît peu de gènes régulés de cette façon, mais il faut souligner ici l'augmentation de l'AQP1 via l'activation de ERK en condition hypertonique (111).

De façon générale, ce sont les voies JNK (c-Jun N-terminal kinase) et p38 qui sont activées par l'hypertonie (112;113). Au niveau de JNK, celle-ci est activée par MKK4 et possède comme substrat direct c-Jun. En plus de ERK, l'expression de l'AQP1 en condition de stress osmotique est aussi sous le contrôle de JNK et de p38 (111). La protéine p38 est similaire à la HOG1 kinase, une enzyme nécessaire à l'osmorégulation de *S. cerevisiae* (112). C'est MKK6 qui active p38 et lui permet de stimuler la voie JAK/STAT (112;113). C'est d'ailleurs l'activation de p38 qui mène à la phosphorylation des facteurs de transcription responsables de l'augmentation de l'expression de Sgk par le stress osmotique (105). À l'opposé, p38 diminue l'expression du gène de CFTR en présence d'une concentration élevée de NaCl (107).

1.3.5 Pathologies associées à des anomalies ioniques

Lorsque les mécanismes d'osmorégulation sont perturbés, cela donne lieu au développement de plusieurs maladies. Ainsi, l'augmentation de l'osmolarité plasmatique est retrouvée dans l'hypertension, le diabète insipide, la déshydratation et l'insuffisance rénale (97).

Diabète insipide

Le diabète insipide est associé avec une concentration élevée de glucose plasmatique. Cette augmentation mime les effets d'une concentration équivalente de NaCl ou de raffinose et entraîne donc des événements associés à une réduction de volume cellulaire. Les niveaux d'ARNm de hSGK se trouvent augmentés dans cette pathologie. La protéine hSGK stimule le canal ENaC et le co-transporteur NKCC (BSC-1) situé dans la branche large ascendante de l'anse de Henle, induisant ainsi une rétention de Na⁺ dans la cellule et favorisant le développement de l'hypertension. L'activation de NKCC diminue la libération de NaCl dans la macula densa ce qui augmente le taux de filtration glomérulaire et participe ainsi à l'hyperfiltration observée chez le patient diabétique (114).

Hypertension artérielle

Les premières publications rapportant un lien étroit entre l'hypertension artérielle et la dysfonction rénale datent d'une soixantaine d'années (115). C'est cependant Guyton qui fut le premier à proposer que la relation pression-natriurèse, relation qui lie la balance sodée et la pression artérielle systémique dans des conditions

normotensives ou pathologiques, était perturbée dans toutes les formes d'hypertension (116). Ainsi, dans l'hypertension, la relation pression-natriurèse est anormale car l'excrétion de Na^+ est la même qu'en condition normotensive, même si la pression artérielle est élevée. Étant donné le caractère hétérogène de l'hypertension essentielle, plusieurs anomalies peuvent conduire à cette situation. Généralement, il est accepté que l'hypertension artérielle pourrait être causée par 5 ou 6 gènes et par des interactions complexes gène-gène et gène-environnement. Ainsi, n'importe quelle anomalie qui cause une augmentation de la réabsorption distale et du tubule collecteur, une diminution du coefficient de filtration glomérulaire ou la perte de néphrons peut influencer la relation pression-natriurèse et causer une hypertension dite sensible au sel. De façon réciproque, une augmentation à long terme de la pression artérielle mène à des changements pathologiques au niveau rénal (117).

Les formes monogéniques de l'hypertension artérielle sont rares mais ont permis de mettre en évidence l'implication de la réabsorption rénale de sodium dans les cas d'hypertension sensible au sel comme le syndrome de Liddle (expression constitutive du canal ENaC) et le syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes (mutation de la 11β -OH-hydroxystéroïde déshydrogénase de type 2). D'autres gènes associés à une augmentation de pression artérielle affectent aussi le transport rénal de sodium. Parmi eux on retrouve l' α -adducine dont les mutations amènent une activation de la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ (118;119). Le gène du récepteur du glucagon (GCGR) est impliqué dans la production hépatique d'AMPc qui, une fois

dans la circulation, affecte la fonction du tubule proximal. Une mutation de ce récepteur diminue la concentration d'AMPc et par conséquent diminue la natriurèse (120;121).

1.4 Interaction calcium/sodium dans l'hypertension artérielle

Les effets du calcium et du sodium sur la pression artérielle ont été discutés indépendamment dans des sections précédentes de ce travail. Nous avons vu cependant que la réabsorption de ces deux ions au niveau rénal était liée. Il est important de comprendre que de façon plus globale, l'hypertension peut être considérée comme étant une manifestation généralisée d'anomalies ioniques.

Ainsi, une diète élevée en sels aura un effet direct sur le calcium, diminuant sa concentration extracellulaire et par la suite, une augmentation du calcium intracellulaire (122). D'autre part, l'apport de calcium et de sodium dans la diète influencent tous les deux l'excrétion urinaire de calcium (123). Les effets hypertenseurs du sodium sont particulièrement importants chez les personnes ayant une diète faible en calcium (124). Les déterminants moléculaires de cette interaction entre le sodium, le calcium et l'hypertension sont encore peu connus.

1.5 La migration cellulaire

La migration cellulaire est présente et essentielle de la conception jusqu'à la mort. Ainsi, pendant le développement embryonnaire, les cellules doivent migrer à des endroits stratégiques où elles se spécialiseront de façon à former les différents organes. Le système immunitaire (leucocytes), le processus de réparation des lésions (fibroblastes, cellules épithéliales) et l'angiogénèse sont aussi des phénomènes physiologiques qui tirent profit de la capacité des cellules à migrer. Dans les prochaines sections il sera question des principaux joueurs impliqués dans le processus de motilité cellulaire, de sa régulation et de pathologies qui y sont associées.

1.5.1 Mécanisme général de la locomotion cellulaire

Les cellules migrent en suivant un processus cyclique dynamique qui met principalement en jeu les intégrines, la matrice extracellulaire (MEC) et le cytosquelette. Le cycle de migration est initié par des signaux externes qui sont captés par des récepteurs situés sur la membrane et qui, à leur tour, activent différentes voies de signalisation. La cellule répond à ces signaux par l'extension initiale de la membrane plasmique à l'avant de la cellule qui permettra à cette dernière de s'attacher au substrat de migration. L'extension de la membrane s'effectue via la polymérisation d'un réseau de filaments du cytosquelette d'actine et elle est stabilisée par la formation de complexes d'adhésion composés de récepteurs d'intégrines, de filaments d'actine et de protéines associées. Alors que le cycle continue, les complexes d'adhésion deviennent plus larges et organisés et servent de

point de traction pour permettre au corps de la cellule de se déplacer vers la protrusion. Enfin, l'adhésion à l'arrière de la cellule se détache pour permettre le mouvement de la cellule vers l'avant. Dans les prochaines lignes, les différentes étapes de la migration seront discutées.

1.5.2 Protéines de la famille Rho GTPases

Les protéines de la famille Rho GTPases étant des joueurs de premier plan dans la migration cellulaire, il est important ici de faire une brève introduction de cette famille. Son implication dans les différentes étapes de la migration sera précisée dans les sections suivantes.

Les Rho GTPases sont des membres de la superfamille Ras de protéines monomériques qui lient le GTP. Une dizaine de Rho GTPases ont été identifiées chez les mammifères dont les mieux caractérisées sont Rho (isoformes A, B, C), Rac (isoformes 1, 2, 3) et Cdc42 (isoformes Cdc42Hs, G25K). Elles agissent comme des interrupteurs moléculaires et sont présentes sous forme active liant le GTP ou inactive liant le GDP. Dans leur conformation liée au GTP, les protéines Rho sont capables d'interagir avec leurs effecteurs ou leurs molécules cibles. Leur activité GTPase intrinsèque les ramène à un état lié au GDP pour compléter le cycle et terminer la transduction de signal. La fonction majeure des GTPases Rho est de réguler l'assemblage et l'organisation du cytosquelette d'actine. Les protéines Rho, Rac et Cdc42 régulent trois voies de signalisation menant respectivement à

l'assemblage des filaments actine-myosine, des lamellipodes et des filipodes (125;126).

1.5.3 Étapes de la migration cellulaire

Stimulation de la migration

Les signaux externes qui stimulent la réorganisation de l'actine et la motilité cellulaire sont perçus par la cellule grâce à la présence de récepteurs membranaires de la famille des RTKs (receptor tyrosine kinase) dont EGF-R (epidermal growth factor receptor), PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor), bFGF-R (fibroblast growth factor receptor), VEGF-R (vascular endothelial growth factor receptor) et Met/HGF-R (hepatocyte growth factor receptor). La discussion portera essentiellement sur l'influence du EGF-R sur la migration cellulaire.

La sous-famille erb des RTKs est composée de quatre membres : EGF-R (ErbB1), HER2 (ErbB2/neu), HER3 (ErbB3) et HER4 (ErbB4). Il existe six ligands connus pour le EGF-R, soient EGF (epidermal growth factor), TGF- α (transforming growth factor alpha), l'amphireguline, la bettacelluline, l'épiréguline et l'héparine se liant à EGF (127). La liaison du ligand au domaine extracellulaire du EGF-R conduit à la dimérisation du récepteur. Le principal partenaire de l'hétérodimérisation de EGF-R est l'erbB-2. La dimérisation du récepteur cause l'activation des sentiers de signalisation via l'activation des domaines kinases cytoplasmiques des RTKs et l'autophosphorylation réciproque des récepteurs. Ainsi, la phosphorylation des résidus tyrosine des EGF-R crée des sites de liaison pour des protéines ayant un

domaine SH2 (Src-homology 2) ou PTB (phosphotyrosine binding). Parmi ces protéines, on retrouve celles qui mènent au contrôle de la polymérisation de l'actine comme PLC- γ (phospholipase C γ), Grb2, Grb7, Src, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), Shc et Nck (hackel et feldner). Aux sites d'adhésion à la matrice extracellulaire, les RPTKs coopèrent aussi avec les intégrines de façon à réguler, entre autres, la migration cellulaire (128).

L'activation du EGF-R est particulièrement importante pour les cellules participant à la réparation d'une lésion mais est aussi fréquemment associée à plusieurs types de cancers. La liaison de EGF ou de TGF- α au EGF-R peut activer les voies MAPK, PI3K et PLC- γ . Ces dernières ont toutes été impliquées dans le processus de migration cellulaire mais leur rôle est variable et dépend du modèle étudié (129). Les voies PLC- γ et MAPK ont été les plus fréquemment associées à la motilité cellulaire (figure 1.11). L'activation de la PLC- γ et l'hydrolyse subséquente de PIP₂ (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) en DAG et en IP₃ a plusieurs conséquences. Ainsi, cette hydrolyse relâche les protéines de modification de l'actine (gelsoline, profiline) liées à PIP₂, entraînant de ce fait une réorganisation du cytosquelette (130;131). De son côté, l'IP₃ mobilise le calcium intracellulaire alors que le DAG active la PKC (131;132). La PKC, possiblement via l'activation de la MLCK (myosin light chain kinase), permet la phosphorylation de la MLC (myosin light chain) et la formation de fibres de stress (133). La PKC utilise FAK (focal adhesion kinase) pour moduler l'adhésion focale (132). L'activation de Cdc42 et de Rac par la PLC- γ mène à la formation de lamellipodes et au turnover des complexes

d'adhésion focale (132;134). D'autre part, la voie MAPK la plus connue comme étant impliquée dans la migration est celle menant à l'activation de ERK1,2 (extracellular signal-regulated kinases 1 and 2), suivie de la phosphorylation de la MLC (129;132).

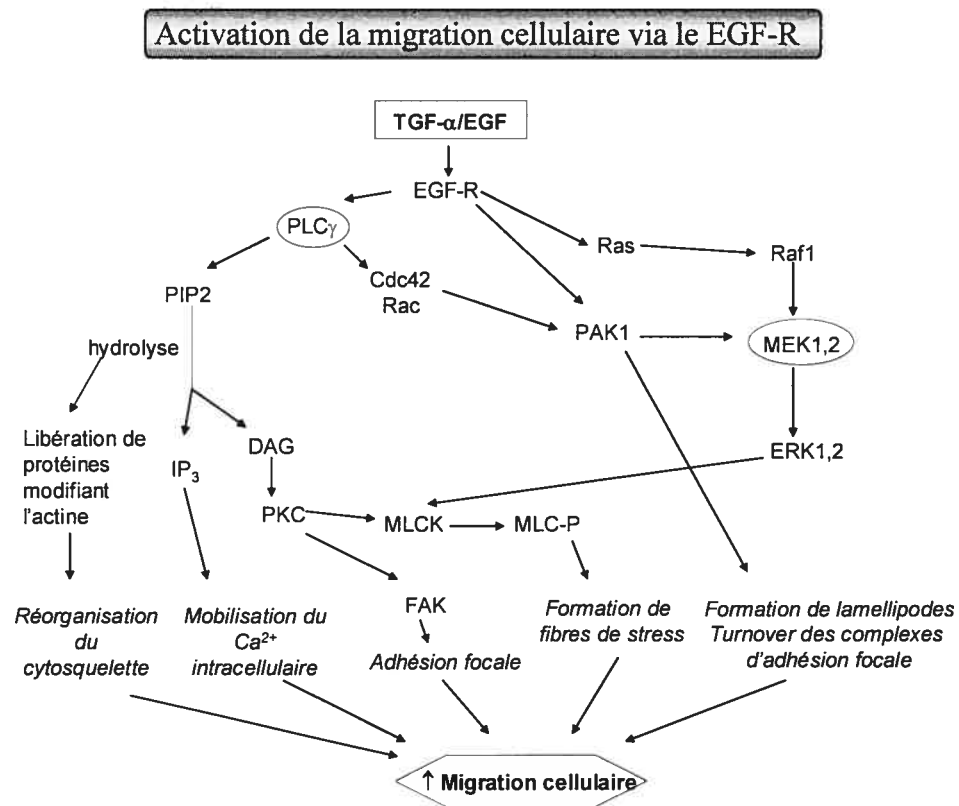


Figure 1.11 L'activation du EGF-R par le TGF- α ou le EGF entraîne une augmentation de la migration cellulaire via deux voies de signalisation principales, les voies PLC et MAPK.

Extension de la membrane plasmique

C'est à cette étape que la cellule se polarise, que l'actine se polymérise et que l'on observe la formation de pseudopodes. Les pseudopodes sont morphologiquement divers et se réfèrent à une extension cytoplasmique. Ils incluent les lamellipodes qui sont des extensions plates de forme lamellaires et les filipodes qui sont des protrusions pointues (135). Une des fonctions importantes du cytosquelette d'actine des cellules eucaryotes, c'est de permettre la locomotion via la formation de pseudopodes. De ce fait, l'extension des pseudopodes requiert l'assemblage d'un réseau spécialisé de filaments d'actine à l'avant de la cellule (leading edge).

La polymérisation de l'actine globulaire (G-actine) de 43 KDa mène à la formation de longues molécules fibreuses appelées F-actine (actine filamenteuse). Ces fibres s'enroulent l'une autour de l'autre formant une structure flexible et polaire (127). L'extrémité de croissance rapide est appelée barbelée (+) alors que celle où s'effectue la dépolymérisation est appelée pointue (-). C'est l'élongation de l'extrémité barbelée des filaments d'actine qui est responsable de la formation de la protrusion membranaire. Dans la majorité des cellules, l'actine représente 5% des protéines totales et est présente à environ 50% sous forme de F-actine et 50% sous forme de G-actine. Le maintien de cet équilibre demande la présence de protéines qui se lient à l'actine et empêchent l'assemblage spontané de tous les monomères d'actine en filaments (127). Ainsi, pour générer une migration dirigée en réponse à un signal externe, les voies de signalisation doivent être en mesure de contrôler la

polymérisation et la dépolymérisation de l'actine. La réponse de la cellule à un stimulus par la migration dirigée est très rapide et quand un stimulus cesse ou change de direction, l'extension des pseudopodes s'arrête tout aussi rapidement (136). Un modèle appelé nucléation dendritique a été proposé pour expliquer le mécanisme d'assemblage et désassemblage des protrusions (figure 1.12).

Modèle de nucléation dendritique

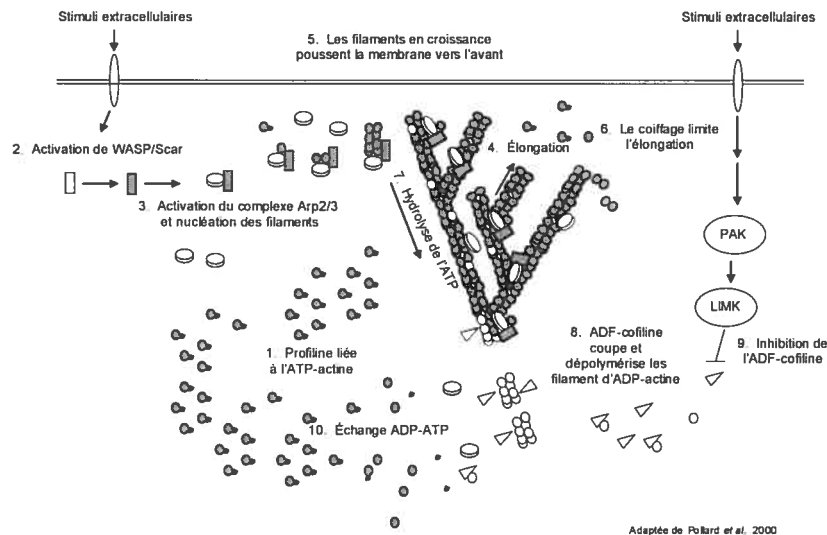
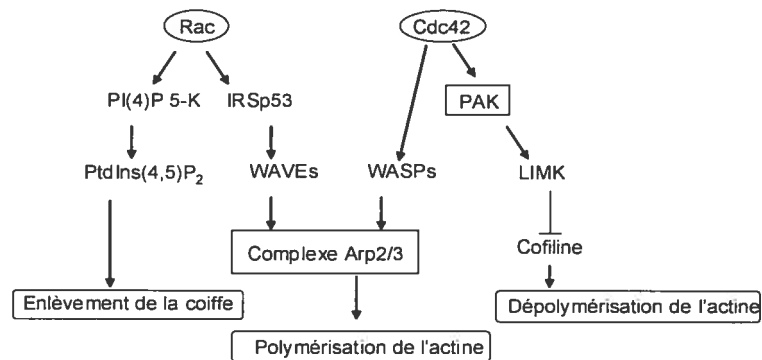


Figure 1.12 Formation de nouveaux filaments d'actine et protrusion de la membrane. En absence d'extrémité libre, les composants du cytosquelette sont dans un état stable (étape 1). L'activation des protéines de la famille WASp (étape 2) active le complexe Arp2/3 (étape 3) qui initie alors de nouveaux filaments. La croissance de ces filaments par l'addition de complexes actine-cofiline est rapide (étape 4) et pousse la membrane en avant (étape 5). L'élongation se termine par l'ajout de la coiffe (étape 6). L'hydrolyse de l'ATP et la dissociation du phosphate (étape 7) amène la dépolymérisation des filaments par la ADF (actin depolymerizing factor)/cofiline (étape 8) à une vitesse contrôlée par la LIM/kinase (étape 9). La profiline permet le recyclage de l'ADP-actine qui rejoint le pool d'ATP-actine (étape 10).

La nucléation se définit comme étant l'initiation d'un nouveau filament d'actine par l'assemblage de monomères (136). Le modèle de nucléation dendritique est donc le suivant: Les filaments d'actine des cellules qui ne sont pas en mouvement possèdent une coiffe à leur extrémité barbelée (figure 1.12, étape 1). Les protéines de la coiffe préviennent la polymérisation spontanée des filaments d'actine. Par contre, suite à la liaison d'un stimulus extracellulaire (facteur chimiotactique) aux récepteurs membranaires, des protéines de signalisation sont activées, dont celles de la famille des Rho GTPases. Ces GTPases se lient et activent les protéines de la famille WASP (Wiskott-Aldrich-syndrome protein)/Scar (figure 1.12, étape 2) qui, à leur tour activent le complexe Arp2/3 (actin-related protein) (figure 1.12, étape 3). Le complexe Arp 2/3 est composé de sept sous-unités comprenant deux protéines "actin related". Une fois activé, il initie la croissance de nouveaux filaments d'actine qui forment en quelque sorte des branches sur les filaments déjà présents. La croissance de l'extrémité barbelée s'effectue rapidement par l'addition de complexes actine-cofiline (figure 1.12, étape 4). Au fur et à mesure de sa croissance, le filament pousse sur la membrane plasmique (figure 1.12, étape 5). L'élongation se termine après quelques secondes (1 ou 2) par l'ajout de protéines de la coiffe (figure 1.12, étape 6). Conséquemment, le système requiert une activation continue de nouveaux complexes Arp2/3 puisque ce dernier est utilisé dans un réseau qui croît pour une période limitée. Si la nucléation s'arrête, la polymérisation s'arrête aussi par l'ajout de la coiffe. L'hydrolyse constitutive de l'ATP des filaments d'actine (figure 1.12, étape 7) et la dissociation du phosphate amène la coupure et la dépolymérisation des filaments plus vieux par la ADF/cofiline (figure 1.10, étape 8).

L'échange de nucléotides catalysé par la cofiline recycle l'ADP-actine au pool de monomères d'ATP-actine. La profiline se lie alors aux monomères ATP-actine (figure 1.12, étape 10). Les protéines de la famille Rho GTPases activent aussi PAK qui, à son tour, stimule la LIM kinase à phosphoryler la ADF/cofiline (figure 1.10, étape 9) et ralentit la vitesse de dépolymérisation des filaments. Ce mécanisme permet aux signaux qui agissent via les Rho GTPases de coordonner l'initiation de nouveaux filaments (via WASp et Arp 2/3) avec la vitesse de leur dépolymérisation (via PAK, LIM-kinase et ADF/cofiline). La vitesse de ces réactions permet d'expliquer comment une cellule peut changer de direction si rapidement et pourquoi, en absence de signal, les pseudopodes tendent à s'effondrer (126;136). La figure 1.13 résume l'implication de Rac et de Cdc42 dans l'extension de la membrane plasmique.

Implication des RhoGTPases dans l'extension de la membrane plasmique



Adaptée de Ridley *et al.*, 2001

Figure 1.13 La contribution de Rac et de Cdc42 dans l'extension de la membrane plasmique se fait au niveau de la polymérisation et la dépolymérisation de l'actine.

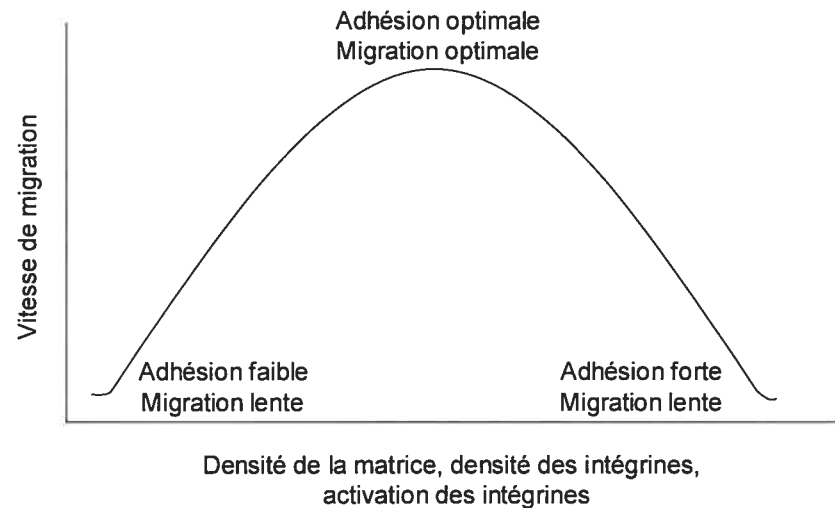
IRSp53: insulin receptor tyrosine kinase substrate p53, WAVES: WASP family verprolin-homologous proteins.

En plus, du cytosquelette d'actine, les microtubules sont aussi polarisés dans les cellules motiles. Trois hypothèses principales ont été émises pour expliquer la contribution des microtubules à la polarisation et à la migration. La première suggère que les microtubules servent de voies qui permettent de diriger le transport des composants moléculaires nécessaires à la formation des pseudopodes à l'avant de la cellule (135;137). La deuxième hypothèse propose que la croissance des

microtubules pourrait promouvoir directement la formation de protrusions et qu'elle serait requise pour la stabilisation sélective d'une protrusion en particulier permettant ainsi de conserver une migration dirigée. La croissance des microtubules enverrait donc un signal qui stimulerait la formation de pseudopodes. La troisième hypothèse vient s'opposer à la deuxième et suggère plutôt que les microtubules ne participent pas à la formation de la protrusion mais régulent l'adhésion et la contraction. La contribution exacte des microtubules à la migration cellulaire n'est pas encore clairement établie et il faut noter que certains types de cellules (neutrophiles, lymphocytes, kératocytes) ne requièrent pas de microtubules pour leur migration (137). Il a été démontré qu'en plus de réguler la polymérisation du cytosquelette d'actine, les protéines de la famille Rho GTPases déterminaient la polarité du cytosquelette des microtubules (135;137).

Formation et turn-over des adhésions entre les cellules et le substrat

L'adhésion est une étape critique dans la capacité des cellules à migrer. Cependant, la relation entre adhésion et motilité est un peu complexe. Une relation mathématique, exprimée par une courbe en forme de cloche, a été définie par Palecek *et coll.* pour établir le lien entre la vitesse de migration et la force d'adhésion (figure 1.14) (138).

Relation entre adhésion et vitesse de migration

Adaptée de Holly *et al*, 2000

Figure 1.14 La vitesse de migration est dépendante de la force d'adhésion des cellules. Cette dernière est, quant à elle, influencée par la composition de la matrice, la densité et l'activité des intégrines.

La force d'adhésion dépend de la concentration de la MEC, de l'abondance des intégrines ou encore de leur état d'activation. Un changement de l'un de ces paramètres aura une influence sur la vitesse de migration de la cellule. S'il y a peu de substrat immobilisé ou si l'expression des intégrines est faible, la migration sera très lente puisque les cellules, faiblement attachées à la MEC, ne génèrent pas assez

de traction pour avancer de façon significative. L'adhésion doit être augmentée pour atteindre une vitesse de migration optimale. Cependant, si l'adhésion augmente encore, la migration sera retardée ou très lente car les cellules ne sont plus capables d'effectuer le turnover des sites d'adhésion (139).

L'adhésion à la MEC est médiée par des régions spécialisées de la membrane plasmique appelées adhésion focale, contact focal ou plaque d'adhésion. À ce site, on retrouve un complexe multi-moléculaire de protéines responsables de faire le lien entre les filaments d'actines et les récepteurs transmembranaires de la famille des intégrines. Certains composants de la plaque d'adhésion participent au lien structurel entre les récepteurs et l'actine alors que d'autres sont impliqués dans la signalisation (protéines kinases, phosphatases, protéines adaptatrices) (140). La composition des plaques d'adhérence est modulée par des facteurs externes solubles ou par la nature ou l'état physique de la MEC.

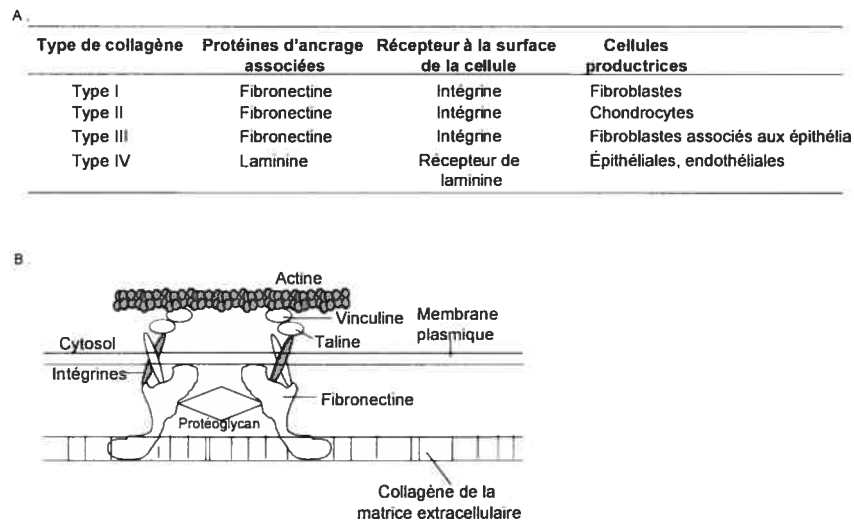
Matrice extracellulaire

Les cellules en migration doivent traverser un tissu conjonctif appelé matrice extracellulaire. La MEC est constituée d'un maillage complexe composé principalement de protéines structurales (collagène et élastine), de protéines spécialisées (fibronectine, laminine) et de protéoglycans. Les cellules ont une interaction dynamique avec la MEC environnante et la composition de cette dernière influence le phénotype cellulaire.

Le collagène est la principale protéine de la MEC. Il existe douze types de collagène et parmi eux les types I, II et III sont les plus abondants et forment des fibres résistantes alors que le type IV forme le réseau de la membrane basale sur laquelle repose les épithéliums.

La laminine et la fibronectine forment des réseaux et servent de ligands pour le collagène et les intégrines. La laminine fait partie de la membrane basale et peut se lier par ses différents domaines au collagène de type IV, à l'héparine sulfate et aux récepteurs cellulaires. La fibronectine est une glycoprotéine extracellulaire ubiquitaire sécrétée par les fibroblastes et certaines cellules épithéliales. Son rôle est d'attacher les cellules à toutes les MEC sauf au collagène de type IV qui se lie à la laminine. La fibronectine présente donc plusieurs sites de liaison différents pour les protéines de la MEC et les intégrines (141). La figure 1.15 résume la composition de la matrice extracellulaire.

Interaction de la matrice extracellulaire avec les récepteurs membranaires



Adaptées de Darnell *et al*, 1993

Figure 1.15 La matrice extracellulaire interagit avec différents récepteurs situés à la surface de la cellule. A. Exemples de types de matrices produites par les cellules. B. Modèle de liaison entre l'actine, les intégrines et la fibronectine de la MEC.

Composition des plaques d'adhésion

L'assemblage des plaques d'adhésion ne se fait pas de façon aléatoire et un modèle hiérarchique pour le recrutement séquentiel des molécules structurales et de signalisation a été proposé (figure 1.16).

Les intégrines

Les récepteurs d'adhérence cellulaire sont des glycoprotéines qui se lient à la MEC ou à un contre-récepteur sur d'autres cellules et déterminent la spécificité d'interaction. Les intégrines constituent une grande famille de récepteurs qui médient les propriétés adhésives des cellules et sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires via leurs interactions avec les autres récepteurs d'une part et le cytosquelette d'autre part (142).

Les intégrines sont des hétérodimères composés de deux sous-unités transmembranaires, α et β . Jusqu'à maintenant dix-huit chaînes α et huit chaînes β ont été identifiées et peuvent se combiner pour former 24 combinaisons de récepteurs (140). Certaines combinaisons sont spécifiques pour un ligand en particulier (fibronectine, laminine, collagène) alors que d'autres combinaisons sont communes à plusieurs ligands. Le domaine extracellulaire des sous-unités α et β participe à la liaison avec les protéines de la MEC ou à la reconnaissance du contre-récepteur. De leur côté, les queues cytoplasmiques interagissent directement ou indirectement avec le cytosquelette (140).

Les intégrines doivent leur nom au fait qu'elles servent en quelque sorte "d'intégrateurs" et interprètent les signaux entre la MEC et le cytosquelette d'actine. Ainsi, suite à leur liaison à la MEC, les intégrines se regroupent à la membrane cellulaire et s'associent avec le complexe de signalisation qui favorise l'assemblage des filaments d'actine. À son tour, la réorganisation des filaments d'actine en fibres

de stress stimule le regroupement des intégrines à la membrane et augmente donc la liaison des cellules à la MEC via les intégrines par un système de boucle rétroactive positive (128;143).

Les intégrines participent à la migration cellulaire de différentes façons : Premièrement, suite à leur liaison à la MEC, les intégrines subissent un changement conformationnel, ce qui permet à leurs domaines cytoplasmiques d'interagir avec les protéines de signalisation et le cytosquelette via des molécules adaptatrices (outside-to-inside signaling). Deuxièmement, l'affinité des intégrines pour la MEC peut être modulée par des signaux intracellulaires, ce qu'on appelle la signalisation "inside-to-outside". Troisièmement, le pont que forme les intégrines entre le cytosquelette d'actine et la MEC permet aux cellules d'exercer une force sur leur environnement (128;139).

Protéines qui se lient directement avec le domaine cytoplasmique des intégrines

Malgré le fait que les domaines cytoplasmiques des intégrines soient courts, plusieurs protéines peuvent interagir directement avec ces derniers. Ces protéines, qui seront décrites dans les prochaines lignes, sont aussi représentées à la figure 1.14. La paxilline est une de ces protéines et s'associe directement et spécifiquement avec le segment cytoplasmique de l'intégrine $\alpha 4$ et facilite la migration cellulaire (140).

Les protéines qui interagissent directement avec le domaine cytoplasmique de l'intégrine β peuvent être séparées en deux groupes. Le premier groupe contient les protéines du cytosquelette comme la taline, l' α -actinine et la filamine. La taline et l' α -actinine participent à l'assemblage de l'adhésion focale, l'adhésion et la migration. Le deuxième groupe de molécules inclut des protéines régulatrices. On retrouve entre autres la p125FAK (focal adhesion kinase) et la paxilline qui s'associent directement au domaine cytoplasmique de l'intégrine β 1 (140).

Protéines qui se lient indirectement avec le domaine cytoplasmique des intégrines

En plus des protéines capables de s'associer directement avec les domaines cytoplasmiques des intégrines, de nombreuses protéines structurales ou régulatrices sont localisées de façon stable ou transitoire aux sites d'adhésion focale (142). Ces protéines, en interagissant entre-elles, forment un réseau complexe.

Comme la filamine et de l' α -actinine, la vinculine est une autre *protéine structurale* très importante localisée dans les plaques d'adhésion. La vinculine interagit avec plusieurs composants du cytosquelette comme l' α -actinine, la paxilline, l'actine, la taline et la vinexine (140).

Le site d'adhésion focale contient aussi des protéines qui peuvent contrôler la dynamique de l'actine, les *protéines régulatrices*. La formation et le maintien des fibres de stress sont régulés par des protéines qui affectent la coiffe, le "cross-linking" ou la nucléation des filaments d'actine. Parmi ces protéines on retrouve la

gelsoline, la tensine, la radixine, VASP (Vasodilator phosphoprotein) et la zyxine (140).

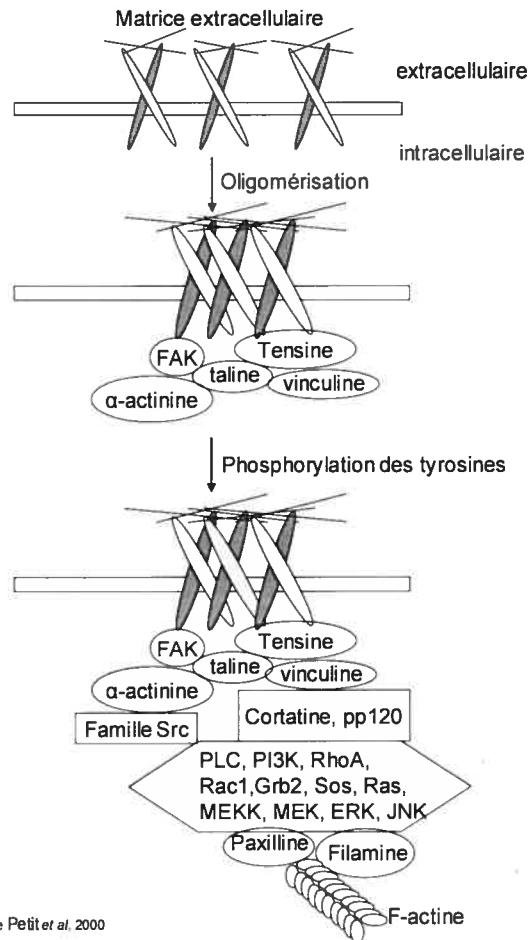
Les *protéines adaptatrices* sont des molécules ayant de nombreux motifs de liaison aux protéines et qui ont comme fonction de recruter les protéines structurales et de signalisation à des endroits précis de la cellule, permettant ainsi la formation de complexes. La paxilline possède un motif LD lui permettant d'interagir avec FAK et la vinculine. Il semble qu'elle soit aussi impliquée dans la réorganisation du cytosquelette via son interaction avec le complexe PAK (p21 GTPase-activated kinase)/PIX (PAK-interacting exchange factor) et dans la migration en recrutant la molécule adaptatrice Crk (140). La protéine p130Cas (Crk-associated substrate) est aussi présente dans les plaques d'adhésion et suite à sa phosphorylation, elle peut former des complexes avec Crk et Src. Cas peut aussi interagir avec la protéine FAK et stimuler la migration (140). La calpaïne est une enzyme protéolytique dépendante du calcium capable de cliver plusieurs composants des adhésions focales comme FAK, les intégrines, la taline et la vinculine (144). Il n'est cependant pas clair si la calpaïne est impliquée dans l'étape initiale d'adhésion ou plutôt dans le désassemblage des plaque d'adhésion pendant la migration (140;144).

Plusieurs *protéines kinases* qui participent aussi à la signalisation médiée par les intégrines sont présentes dans les plaques focales. FAK est une protéine cytoplasmique ubiquitaire qui constitue un des points centraux du complexe d'adhérence (145). Suite à son activation par les intégrines, on observe une

autophosphorylation du résidu Tyr397, ce qui crée un site de liaison pour Src, PTEN (phosphatase and tensin homologue) et PI3K. FAK serait impliquée dans le turnover des adhésions plutôt que dans leur formation (140). Les autres kinases présentes et importantes pour l'adhésion sont p60Src, Csk, PKC, PI3K et p59ILK.

De façon à conserver un niveau de phosphorylation adéquat, l'activité des kinases doit être contrebalancée par celle des *phosphatases*, dont Shp-2 (SH2 containing protein tyrosine phosphatase 2), PTP-PEST (Protein-tyrosine phosphatase, non-receptor type 12), PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten) et PTP1B (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) (140).

Recrutement des protéines présentes aux sites d'adhésion focale



Adaptée de Petit et al. 2000

Figure 1.16 Recrutement séquentiel des protéines structurales et de signalisation aux sites d'adhésion focale.

La régulation des interactions entre les différents composants joue un rôle clé dans l'élaboration de la structure et la fonction des adhésions focales. Certains des composants sont spécifiques à un type cellulaire particulier et d'autres comme FAK par exemple, peuvent se lier à plusieurs protéines via des domaines de liaison connus, soient SH2 et SH3 (146). Cependant, il s'avère que la vinculine, la taline, l' α -actinine et FAK soient requises pour la formation et le turn-over des plaques d'adhésion (140).

La formation des adhésions focales est sous le contrôle des membres de la famille Rho. Ainsi, Rho est impliqué dans la formation des fibres de tension de l'actine et des plaques d'adhérence alors que Rac1 et cdc42 participent respectivement à la formation des lamellipodes et des filipodes ainsi que des adhésions focales (126;140).

Dissociation des plaques d'adhérence

La régulation du turnover des plaques focales est primordiale pour la migration cellulaire. Les mécanismes qui permettent la dissociation du cytosquelette sont autant physiques que biochimiques. Ainsi, au cours de la migration des fibroblastes, une grande partie des intégrines se détache de la membrane cellulaire et demeure associée au substrat. La tension créée par l'élongation de l'arrière de la cellule lorsque celle-ci avance et par la contraction du cytosquelette pourraient expliquer ce phénomène. Dans ce cas, le lien plus faible du complexe cytosquelette-intégrine-substrat est brisé, indiquant un lien plus fort entre les intégrines et le substrat

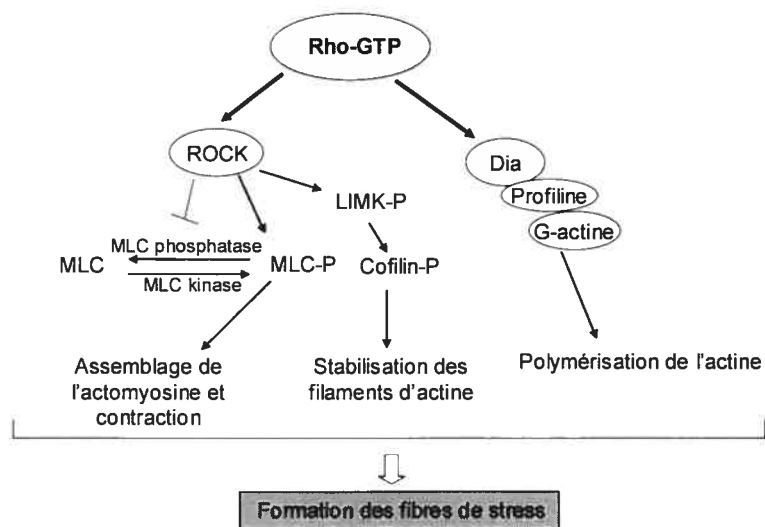
qu'entre les intégrines et le cytosquelette (147). Des mécanismes de contrôle cellulaire comme la phosphorylation de protéines associées au cytosquelette pourraient aussi modifier les propriétés de liaison du complexe cytosquelette-intégrine-substrat. Lors du détachement de la cellule, d'autres intégrines se dispersent dans la membrane ou se déplacent et s'oligomérisent pour former un autre site d'adhésion focale (140;147). Certains facteurs de croissance comme le EGF par exemple, induit la dissociation des adhésions focales des fibroblastes, une diminution de la force d'adhésion et une augmentation de la migration (126). Rac peut aussi participer au turn over des adhésions focales directement via PAK ou indirectement en ayant une activité antagoniste par rapport à Rho (126). FAK et Src sont essentiels et interrompent la maturation des adhésions en favorisant leur dissociation (148).

Contraction du corps cellulaire

Encore une fois Rho est impliquée dans cette étape de la migration cellulaire et régule la contractilité de l'actomyosine. En activant ROCK (Rho kinase), Rho stimule la phosphorylation de la MLC (myosin light chain) puisque ROCK possède la capacité d'inactiver la MLC phosphatase et de phosphoryler directement la MLC. Une fois phosphorylée, la MLC est en mesure de générer la force nécessaire au mouvement via son association avec le cytosquelette d'actine. ROCK peut aussi phosphoryler d'autres protéines qui contribuent à la ré-organisation du cytosquelette comme la LIMK. De plus, Rho agit via Dia et induit la formation de fibres de stress (figure 1.17) (125;126;139). En plus de Rho, l'engagement des intégrines active la

voie Ras. L'activation de la MAPK entraîne aussi un état de phosphorylation continu de la MLC (139).

Implication de Rho dans la formation de fibres de stress



Adaptée de Bishop et coll, 2000

Figure 1.17 Rho favorise la formation de fibres de stress en stimulant l'assemblage de l'actomyosine et la contraction de même que la stabilisation et la polymérisation de l'actine.

Détachement de la queue

Le détachement de la queue est souvent vu comme étant l'étape limitante à la migration cellulaire. Les mécanismes qui régulent le détachement de la queue dépendent du type de cellule et de la force d'adhésion. Ainsi la calpaïne, Src, FAK et PAK peuvent toutes amener la dissociation des plaques d'adhésion et donc participer au détachement de la queue (126). Alors que l'activation des intégrines stimule RhoA, un engagement prolongé de ces intégrines résulte en une diminution graduelle de l'activité de RhoA et favorise ainsi le détachement de la cellule. L'engagement des intégrines peut aussi stimuler PAK qui inhibe la kinase MLC résultant en une diminution de la phosphorylation de la MLC et de la tension cellulaire. PAK agit aussi en brisant les fibres de stress (139).

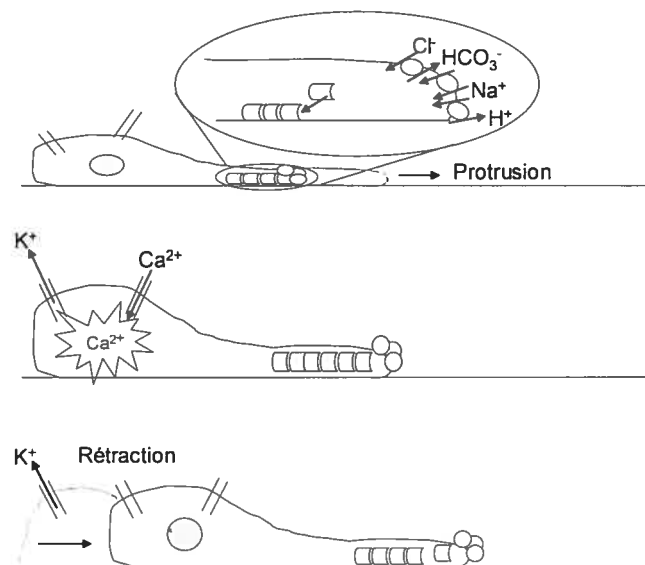
1.5.3 Implication des canaux ioniques dans le processus de migration

L'importance du cytosquelette d'actine dans la migration cellulaire ne peut être niée. Or, le cytosquelette d'actine est intimement lié aux canaux et aux transporteurs ioniques. En effet, les canaux et transporteurs ioniques peuvent être régulés par l'actine. Ainsi, la capacité des cellules de restaurer un volume cellulaire normal par l'activation des canaux et transporteurs ioniques est dépendante de l'organisation du réseau de filaments d'actine et de son turnover. De façon réciproque, les changements de volume cellulaire peuvent eux aussi influencer le cytosquelette d'actine. Par exemple, l'augmentation du volume de la cellule est accompagnée par la désintégration des filaments d'actine alors que la diminution du volume cellulaire est suivie par un assemblage des filaments d'actine. Il y a donc une dépendance

mutuelle entre le cytosquelette d'actine et les canaux et transporteurs ioniques. L'activité de ces derniers doit être régulée de façon à maintenir un volume cellulaire adéquat et créer ainsi un milieu intracellulaire optimal pour que le cytosquelette d'actine soit en mesure de promouvoir la migration cellulaire (149).

Le modèle qui a été proposé pour expliquer cette interdépendance décrit la migration comme étant deux phases locales d'augmentation et de diminution du volume cellulaire, ces phases étant séparées au niveau temporel et spatial (figure 1.18). Quand les concentrations de calcium intracellulaire sont à leur niveau basal, l'activité du canal IK1 (calcium-sensitive K^+ channel) est minimale. L'augmentation de volume intracellulaire suite à l'entrée de sels et d'eau dans la cellule est médiée par les échangeurs Na^+/H^+ et Cl^-/HCO_3^- et le cotransporteur $Na^+-HCO_3^-$ situés à l'avant de la cellule. Ceci contribue à l'extension du lamellipode. La croissance du lamellipode et l'augmentation graduelle du volume cellulaire augmente la tension de la membrane plasmique et active les canaux cationiques mécanosensibles perméables au Ca^{2+} . L'augmentation de la concentration de calcium intracellulaire active les canaux IK1, entraînant un efflux massif de K^+ et une diminution locale de volume à l'arrière de la cellule, ce qui résulte en la rétraction de l'arrière de la cellule. Les mécanismes dépendants du calcium responsables de la rétraction cellulaire sont probablement ceux faisant intervenir le réseau cortical d'actomyosine et la relâche des intégrines de la matrice extracellulaire (149). Pour assurer leurs fonctions pendant la migration, les canaux et les transporteurs ioniques doivent être distribués de façon polarisée dans la cellule.

Changements de volume associés à la migration



Adaptée de Schwab *et coll.*, 2001

Figure 1.18 La migration est associée à des changements de volume de la cellule et nécessite l'activation de systèmes de transport ionique.

Dépendamment du type cellulaire, différents canaux ioniques seront impliqués dans leur migration. Le canal IK1 semble cependant être généralement requis pour la motilité de plusieurs types cellulaires (149). En plus de leurs effets directs sur le volume cellulaire, les canaux IK1 peuvent influencer l'adhésion des cellules en agissant sur la fonction des intégrines (149-151). De leurs côtés, les canaux K^+ dépendant du voltage sont impliqués dans la migration des lymphocytes, des cellules

nerveuses embryonnaires et des cellules épithéliales intestinales (149;152;153). La migration des granulocytes du cerebellum est dépendante de l'activité des canaux calciques de type N alors que les canaux Cl^- régulent la locomotion des cellules gliales et des cellules rénales (MDCK-F) (149;154).

Comme mentionné précédemment, les transporteurs ioniques sont aussi d'importants régulateurs de la migration cellulaire. L'échangeur Na^+/H^+ (NHE1), de par son rôle dans la régulation du pH intracellulaire et du volume des cellules, influence la motilité. Au niveau des neutrophiles, il est activé par une stimulation chimiotactique, ce qui lui permet d'augmenter le volume de la cellule et de favoriser la migration. L'activité de NHE1 est aussi impliquée dans la migration des kératinocytes, des mélanomes, des carcinomes mammaires et des cellules MDCK-F (149). Quant à lui, le co-transporteur $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ a été associé à la migration des cellules épithéliales et des cellules pariétales de la glande gastrique (149;155;156).

1.5.4 Migration cellulaire pendant la réparation du rein suite à un dommage

L'importance de la migration cellulaire sera exposée dans un contexte bien particulier, la réparation du rein suite à une insuffisance rénale aiguë. Contrairement au cœur ou au cerveau, le rein possède la capacité de recouvrer ses fonctions suite à un dommage causé par une ischémie ou un agent toxique (10;11). Ce processus est en grande partie dépendant de la restauration de l'intégrité et de la fonction des cellules du tubule proximal (157). La réparation rénale parallèle l'organogenèse et nécessite donc la repolarisation et/ou la dédifférenciation, la prolifération, la

migration et la différenciation des cellules (10;157). Bien que l'étape de dédifférenciation semble importante pour que les cellules épithéliales puissent migrer jusqu'au site de la lésion, les facteurs responsables de ce changement phénotypique et son lien avec la prolifération et la migration sont encore peu connus (11). L'étape de migration semble quant à elle critique et résistante à l'inhibition. En effet, seuls les agents néphrotoxiques causant une toxicité générale possèdent la capacité d'inhiber la migration cellulaire (10). Des modèles de lésions cellulaires *in vitro* ont servi à étudier le profil d'expression des gènes suivant un dommage. Ainsi, l'expression de plusieurs gènes, dont c-myc, HSP-70 (heat shock protein 70) et l'uPA (urokinase-type plasminogen activator) est augmentée quelques heures après une lésion (10;11). De son côté, le groupe de Counts a démontré que le EGF possédait la capacité de promouvoir la réparation des lésions en stimulant la migration et la prolifération cellulaire (158). Les molécules d'adhésion (intégrines, sélectines, NCAM (neural cell adhesion molecule)) sont d'importants régulateurs de la migration, de la différenciation et de la prolifération cellulaire et voient de ce fait, leur expression modulée suite à une lésion rénale. La production de cytokines ou de chemokines suite à une ischémie peut, elle aussi, influencer la migration et la prolifération cellulaire (11).

1.5.6 Pathologies associées à la migration cellulaire

Étant donné l'importance de la migration cellulaire, il n'est pas surprenant qu'elle soit contrôlée de façon très précise et qu'un dérèglement soit responsable de plusieurs pathologies. Ainsi, une migration inadéquate des trophoblastes associée

avec un remodelage insuffisant des artères en spirales amènent une perfusion insuffisante du placenta et conséquemment peuvent résulter en une restriction de croissance intra-utérine et même être responsables de la pré-eclampsie (159). De plus, des défauts des protéines impliquées dans la migration peuvent résulter en des malformations embryonnaires, ce qui entraîne soit la mort au niveau foetal soit des anomalies congénitales du développement du cerveau qui se manifestent par l'épilepsie ou le retard mental (160). Des anomalies de migration causent aussi des conditions d'inflammation chronique comme l'asthme ou l'arthrite rhumatoïde (161;162). Ici, deux pathologies ayant une incidence élevée dans la population et impliquant une migration cellulaire anormale seront discutées plus en détails.

Cancer: invasion, métastases et angiogénèse tumorale

La mortalité reliée au cancer est attribuable, dans 90% des cas, au développement des métastases plutôt qu'à la tumeur primaire en elle-même (163). L'acquisition de la capacité migratoire est un pré requis pour que les cellules cancéreuses puissent envahir les autres tissus, formant ainsi des métastases. Pour que la tumeur puisse se développer, de nouveaux vaisseaux sanguins doivent se former (angiogénèse) de façon à fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance et à éliminer les déchets métaboliques. La formation de nouveaux vaisseaux nécessite, entre autres, la migration des cellules endothéliales vers les facteurs angiogéniques sécrétés par les cellules tumorales ou les cellules stromales (164). Dans le cancer du sein et dans d'autres types de cancer aussi, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins corrèle avec un mauvais pronostic.

Au niveau du cancer, étant donné le nombre élevé de joueurs impliqués dans le processus migratoire et les différences selon le type cellulaire, plusieurs gènes peuvent présenter des anomalies d'expression ou d'activité. Ainsi, des altérations de l'expression et de la signalisation des intégrines ont été rapportées entre autre dans les cancers de la prostate et du sein (165;166). Une surexpression et/ou une hyperactivation des RhoGTPases ont été observées au niveau du cancer du sein alors que PAK se trouve surexprimé dans le cancer de cellules épithéliales (167;168). Les récepteurs de type tyrosine kinase sont aussi souvent associés aux cellules tumorales. C'est le cas du récepteur EGFR dont l'expression est élevée dans plusieurs carcinomes comme ceux du poumon, du colon et du rein ou de HGFR au niveau du carcinome rénal (169;170). Des agents anti-EGFR comprenant des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur sont en essais cliniques (169;171). Notons aussi que l'expression de la calpaïne est plus élevée dans les cellules d'un carcinome rénal qui feront des métastases que les cellules non-métastatiques et que son activité est plus importante dans les tumeurs mammaires comparativement aux cellules normales (172).

Hyperplasie néointimale

L'hyperplasie néointimale, bien qu'étant un phénomène physiologique, peut devenir pathologique dans certaines circonstances, comme dans le cas de l'athérosclérose, suite à une angioplastie ou encore après l'implantation d'une prothèse endovasculaire (stent). Les cellules du muscle lisse vasculaire (VSMC) retrouvées

dans les artères chez l'adulte sont différenciées, ont un faible taux de prolifération et sont rarement appelées à migrer pour rétablir l'intégrité vasculaire (173). Cependant, après une lésion de la paroi vasculaire, le phénotype des VSMCs change drastiquement au niveau de la morphologie, de la migration, du taux de prolifération et de l'expression des protéines (174). La migration des VSMCs de la média vers la néointima est stimulée par la production de PDGF (platelet-derived growth factor) qui agit comme facteur chimiotactique. Une fois dans la néointima, les VSMCs prolifèrent, ce qui cause la sténose vasculaire (173).

1.6 *Épigénétique et méthylation de l'ADN*

Le terme épigénétique réfère à la transmission d'informations basées sur l'expression d'un gène alors que la génétique réfère plutôt à la transmission d'informations basées sur la séquence d'un gène (175). L'épigénome contient les informations qui dictent quelles parties du génome sont exprimées en un lieu et un temps donnés. Alors que le génome est fixe et identique, l'épigénome est modelé pendant le développement de façon à permettre la présence de plusieurs programmes d'expression des gènes retrouvés dans un organisme complexe. L'épigénome est continuellement modifié pendant la vie en réponse à des changements physiologiques, environnementaux ou pathologiques (176). L'épigénétique peut donc être considéré comme étant un système ingénieux permettant d'utiliser sélectivement l'information du génome par l'activation ou l'inactivation des gènes fonctionnels (177).

La modification épigénétique principale est sans doute la méthylation des cytosines placées dans un contexte CpG. La méthylation de l'ADN est associée à de multiples processus biologiques dont le contrôle de l'expression des gènes pendant le développement, la limitation de l'expression et de toxicité des séquences répétées, l'inactivation du chromosome X et l'empreinte parentale (178). Cependant, des changements dans la méthylation des gènes sont aussi retrouvés dans des conditions pathologiques comme le cancer, l'athérosclérose ou l'insuffisance rénale (178-180). La prochaine section traitera du processus de méthylation de façon générale et de quelques pathologies qui y sont associées.

Méthylation de l'ADN

Dans le génome des vertébrés, le carbone en position 5 de la cytosine située dans un dinucléotide CpG est habituellement modifié par un groupe méthyle. Le résidu cytosine du brin complémentaire (GpC) est aussi méthylé de façon symétrique. Environ 50 à 70% de tous les sites CpG sont méthylés.

Système de méthylation de l'ADN

1) ADN méthyltransférases

Les ADN méthyltransférases de mammifères sont classifiées en deux groupes : l'ADN méthyltransférase de maintenance (DNMT1) et les ADN méthyltransférases *de novo* (DNMT3a et DNMT3b) (176;177;181). La méthylase de maintenance est responsable du patron de méthylation de l'ADN lors de la réplication. Sa fonction est de méthyler l'ADN hemiméthylé (ADN dont l'un des brins seulement est méthylé). Ainsi, le patron des CpG méthylés et non-méthylés du brin d'ADN sera copié, procurant une façon de transmettre l'information épigénétique entre les générations de cellules. Étant des méthyltransférases *de novo*, l'activité de méthylation de DNMT3a et DNMT3b n'est pas guidée par la méthylation du brin parental. Ces enzymes semblent impliquées dans la croissance et la différenciation cellulaires et dans l'altération du patron de méthylation pendant la tumorigénèse (176;177).

2) ADN déméthylases

La méthylation de l'ADN est en fait un phénomène réversible (182). L'acétylation des histones entraîne une déméthylation des gènes alors que l'inhibition des histones acétylases inhibe la déméthylation (183;184). La présence d'ADN méthylases a été suggérée et récemment, on a attribué une activité déméthylase à une protéine jusqu'ici associée à la répression transcriptionnelle, soit MBD2 (185;186). Ainsi, la protéine MBD2 possède cette capacité de déméthyliser l'ADN et d'activer la transcription (186).

3) Protéines de liaison aux CpG méthylés et répression transcriptionnelle

En théorie, il existe plusieurs mécanismes potentiels pouvant mener à la répression transcriptionnelle d'un loci méthylé. En effet, certains facteurs de transcription sont incapables de se lier à leur site de reconnaissance si ce dernier est dans une région méthylée (178;187). La méthylation de l'ADN peut aussi altérer la structure de l'architecture de la chromatine. Finalement, les effets répresseurs de la méthylation de l'ADN peuvent résulter de la reconnaissance sélective des CpG méthylés par une famille de protéines appelée MBD (methyl CpG-binding domain) (176;178;187).

La protéine MeCP2 est le premier membre de la famille des MBD à avoir été identifié (188). Les modèles proposés pour expliquer l'implication de MeCP2 dans la répression transcriptionnelle sont les suivants : 1) MeCP2 est recrutée aux régions méthylées du génome où ses interactions avec le complexe protéique contenant le co-répresseur Sin3 et des histones désacétylases (HDACs) amènent l'établissement

et le maintien de l'architecture répressive de la chromatine (187;189;190). 2) Un deuxième mécanisme proposé est indépendant des HDACs mais suggère l'occlusion du promoteur par la surexpression de MeCP2. 3) La troisième hypothèse suggère que MeCP2 interfère avec l'assemblage du complexe de pré-initiation via une interaction directe avec TFIIB (187;191). D'autres protéines soient MBD1, MBD2 et MBD3 peuvent aussi être impliquées dans la répression transcriptionnelle (178;187;192).

Pathologies associées à une méthylation aberrante des gènes

Le rôle central que joue la méthylation dans la régulation de l'expression des gènes entraîne des conséquences préjudiciables si des erreurs surviennent dans le profil de méthylation de l'ADN. Ces erreurs font partie des épimutations, c'est-à-dire des changements anormaux dans les modifications épigénétiques. Certaines pathologies comme l'athérosclérose et le cancer sont associées à des épimutations qui affectent le patron de méthylation. Pendant le développement de l'athérosclérose, le patron de méthylation change et contribue ainsi au développement de la lésion en affectant des gènes impliqués dans la prolifération et la migration des cellules du muscle lisse vasculaire (179;193;194).

Cancer

Possible toutes les tumeurs sont caractérisées par des altérations plus ou moins nombreuses du profil de méthylation. L'abondance relative des gènes ayant des altérations épigénétiques dans le cancer est en accord avec le modèle qui propose

que plusieurs gènes sont ciblés par des modifications génétiques ou épigénétiques pendant le développement et la progression d'une tumeur (195). Deux patrons de méthylation ont été observés dans les cellules cancéreuses : une hypométhylation globale du génome et une hyperméthylation à certains sites spécifiques qui survient très tôt dans le développement du cancer (175).

L'hyperméthylation des gènes dans les tumeurs est spécifique en ce sens qu'un gène n'est pas hyperméthylé dans tous les types de tumeurs. De même, dans une tumeur donnée, l'hyperméthylation peut inactiver plusieurs gènes et compromettre les fonctions associées à ces gènes. Un profil de méthylation spécifique à une tumeur peut donc être tracé (196). Les fonctions dans lesquelles sont impliqués les gènes hyperméthylés sont aussi variées que la régulation du cycle cellulaire, l'adhésion, la migration ou les récepteurs hormonaux (197-201).

1.7 HCaRG (*Hypertension-Related Calcium Regulated-Gene*)

Notre groupe de recherche s'intéresse aux déterminants génétiques des maladies cardiovasculaires et plus particulièrement, de l'hypertension. L'hypertension essentielle est une maladie polygénique avec un caractère hétérogène. Une des formes d'hypertension est caractérisée par une balance calcique négative, c'est-à-dire une concentration de calcium extracellulaire faible en présence d'une concentration calcique intracellulaire élevée. Étant donné son rôle important dans le maintien de l'homéostasie calcique et son implication dans certaines formes d'hypertension, la possibilité que la glande parathyroïde puisse sécréter des facteurs responsables des anomalies calciques observées dans l'hypertension a été soulevée. Notre groupe et celui de Lewanczuk à Edmonton ont indépendamment caractérisé deux facteurs qui sont régulés négativement par le calcium et démontrent une expression accrue dans l'hypertension. Les deux groupes ont amorcé une collaboration afin de cloner l'ADNc de ces deux facteurs afin de comprendre leur rôle pathophysiologique dans l'hypertension.

Le groupe de Lewanczuk a démontré qu'un peptide d'origine parathyroïdienne était capable d'augmenter le calcium intracellulaire, d'augmenter la pression sanguine chez des rats normotendus lorsqu'injecté et qu'il était en plus grande quantité chez les rats génétiquement hypertendus, SHR (Spontaneously Hypertensive Rat) comparativement aux rats normotendus WKY (Wistar Kyoto) (76). Ce facteur, qu'ils ont nommé PHF (Parathyroid Hypertensive Factor), est augmenté par une diète élevée en sodium mais diminué par une diète élevée en calcium (202).

De notre côté, nous avons préparé une banque d'ADNc à partir de glandes parathyroïdes de rats SHR, ce qui nous a permis de cloner un nouveau gène, HCaRG (Hypertension-Related Calcium Regulated-Gene), dont l'expression diminue en présence de calcium extracellulaire élevé (203). La séquence de l'ADNc de HCaRG chez le rat démontre une homologie de 80% avec la séquence humaine, clonée dans notre laboratoire. HCaRG a été localisé sur le chromosome 7 du rat et une analyse synténique a permis de le localiser sur le chromosome 8q24.3 humain, une région qui contient les loci impliqués dans plusieurs maladies rénales et osseuses. Le locus dans lequel HCaRG se situe sur le chromosome 7 de rat est aussi celui de l'excrétion urinaire de calcium (204).

La protéine intracellulaire codée par ce nouveau gène possède un poids moléculaire 27Kda. L'analyse de la structure en acides aminés de HCaRG démontre un contenu en hélice α de 67% et un motif qui s'apparente au EF-hand. Ce dernier est un motif de liaison au calcium retrouvé dans des protéines comme la calmoduline par exemple. Le contenu élevé en hélice α d'une protéine favorise les interactions et sa dimérisation. Nous avons aussi identifié des motifs habituellement retrouvés dans les protéines liant l'ADN, comme quatre motifs Leucine Zipper et le domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires, LXXLL (203).

L'expression de HCaRG est régulée négativement par le calcium extracellulaire. En effet, des cellules de parathyroïdes de WKY et SHR incubées dans un milieu faible

en calcium démontrent une expression plus élevée de HCaRG que les cellules incubées dans un milieu avec une concentration normale en calcium. HCaRG est exprimé dans tous les tissus mais avec une prépondérance dans le foie, les reins, les surrénales, l'estomac, le jéjunum et le cœur. Les taux d'ARNm de HCaRG sont plus élevés dans les tissus adultes que dans les tissus fœtaux (203).

Le processus de réparation tissulaire suivant une lésion partage plusieurs points communs avec le processus cellulaire impliqué dans le développement. En effet, la dédifférenciation et la régénération des cellules épithéliales de même que la différenciation sont activées suite à une ischémie-réperfusion. Après une ischémie-réperfusion, les taux d'ARNm de HCaRG sont d'abord réduits, puis augmentent jusqu'à un niveau supérieur à celui du contrôle 24h après l'ischémie-réperfusion. Le patron d'expression de c-myc, un gène associé avec la prolifération des cellules de mammifères, est régulé de façon opposée à celui de HCaRG (203). L'expression plus faible de HCaRG dans les cellules dédifférenciées, c'est-à-dire dans les tissus fœtaux et rapidement après une ischémie-réperfusion, laissait entrevoir un rôle pour la protéine codée par HCaRG dans l'établissement du phénotype de différenciation.

De façon à nous aider dans l'identification de la fonction de HCaRG, nous avons établi une lignée cellulaire stable surexprimant HCaRG. La surexpression de HCaRG dans les cellules HEK293 (human embryonal kidney cells) résulte en une réduction de la prolifération associée à un arrêt des cellules en G2M du cycle cellulaire (203;205). Des caractéristiques phénotypiques de différenciation ont aussi

été observées. Ces caractéristiques incluent une hypertrophie des cellules, la présence de microvilli et de jonctions différenciées (desmosomes). Les cellules transfectées ont de plus acquis un phénotype sécrétoire, comme le démontre l'augmentation de 8 fois des quantités d'ANP (atrial natriuretic peptide) ou d'urodilatine (forme rénale de l'ANP) sécrétées par les cellules surexprimant HCaRG (205).

1.8 Hypothèses et objectifs du travail

L'hypertension artérielle, une maladie polygénique complexe, peut être associée à une balance calcique négative. Nous avons observé que les taux d'ARNm de HCaRG étaient plus élevés chez les animaux hypertendus. De plus, l'expression de HCaRG est sous le contrôle négatif du calcium extracellulaire. Enfin, le gène codant pour HCaRG est situé dans un locus d'excrétion urinaire de calcium. Nous avons donc émis l'hypothèse que HCaRG pourrait jouer un rôle dans les anomalies calciques et/ou sodiques observées dans certaines formes d'hypertension artérielle.

La *prolifération* cellulaire, la *migration* et la *différenciation* sont des phénomènes observés pendant le processus de réparation rénale. Suite à une ischémie-reperfusion, l'expression de HCaRG est diminuée pendant la phase proliférative et est augmentée par la suite. Nos études ont aussi montré que la surexpression de HCaRG dans les cellules rénales HEK293 modifiait le phénotype des cellules de façon importante. En effet, les cellules surexprimant HCaRG ont vu leur taux de *prolifération* diminuer et elles ont acquis des caractéristiques de *cellules différenciées*. Ces observations nous ont amené à poser notre deuxième hypothèse selon laquelle HCaRG pourrait être impliqué dans les étapes permettant la réparation du rein suite à un dommage comme l'ischémie-reperfusion.

Afin de vérifier ces hypothèses, les objectifs de la thèse ont été divisés en trois grandes parties. La première partie visait à étudier l'expression de HCaRG et on y

retrouvera les études de clonage et de caractérisation de la région promotrice de HCaRG, l'effet de différentes concentrations de calcium et de sodium sur l'activité du promoteur (chapitre 2) et l'évaluation du profil d'expression de HCaRG en relation avec l'état de différenciation ou de prolifération des cellules (chapitre 3). La deuxième partie évaluera l'effet de la surexpression de HCaRG sur l'expression des gènes tel que montrée par microarray (chapitre 4). La troisième partie avait pour but de déterminer l'implication de HCaRG dans la réparation tissulaire, plus précisément dans le processus de *migration* cellulaire (chapitre 5).

Chapitre 2

Clonage et caractérisation de la région promotrice de HCaRG

2.0 Introduction du chapitre

L'expression de HCaRG est plus élevée dans les cellules de parathyroïdes incubées dans un milieu ayant une faible concentration de calcium que dans un milieu dont la concentration de calcium est normale. Jusqu'à maintenant, quelques gènes seulement ont été rapportés comme étant régulés négativement par le calcium extracellulaire. Parmi ces gènes, on retrouve celui de la PTH. Le promoteur du gène de la PTH contient un élément de réponse négative au calcium, le nCARE. Nous avons donc voulu cloner et caractériser la région promotrice de HCaRG de façon à identifier les éléments responsables du contrôle de son expression.

2.1 Méthodologie

2.1.1 Clonage et séquençage de la région 5'UTR de HCaRG

La technique de la marche génomique (Genome walker kit, Clontech) a été utilisée pour amplifier la région 5'UTR du gène codant pour HCaRG de rat. Deux amorces spécifiques à HCaRG ont été dessinées. Ces dernières étaient situées dans la région 5' de la séquence connue de HCaRG, de façon à pouvoir amplifier la région inconnue en amont du gène. La première amplification par PCR a été effectuée à partir de 10ng de la librairie d'ADN génomique du "Genome Walker" de rat, de l'amorce adaptatrice 1 fournie par Clontech et de l'amorce 1 spécifique à HCaRG (-400 pb à -426pb de la séquence de la figure 2.1): 5'GGTACAAATACAAACCAAGCCTTTACCGC 3'. Pour la deuxième amplification, 2uL de la réaction 1 ont été utilisés avec l'amorce adaptatrice 2 fournie par Clontech et de l'amorce 2 spécifique à HCaRG (-427pb à -450pb de la

séquence de la figure 2.1): 5' CCTCTGCACCTGGAGGAACCTAGC 3'. Les paramètres de PCR pour les 2 réactions étaient les suivants : (94°C/5min); (94°C/25sec; 72°C/4min) 7 cycles; (94°C/25sec; 67°C/4min) 32 cycles; (67°C/4min). Un premier fragment de 599 pb a été obtenu, séparé sur gel d'agarose, extrait par Qiaex II (Qiagen), cloné dans le vecteur pBluescript et séquencé avec la Sequenase version 2.0 selon les directives du manufacturier (United States Biochemical, Cleveland, U.S.A.). De cette séquence, 2 nouvelles amorces spécifiques à HCaRG ont été dessinées (5'AACGAACCAAAGTTCCCCGCAAG3' et 5'TGGTACATGCCTTATAACCTCATGAAGC3') et utilisées dans les mêmes conditions mentionnées plus haut. Un second fragment de 1019 pb a ainsi été obtenu, cloné dans le vecteur pUC19 et séquencé. L'analyse des séquences obtenues afin d'identifier des sites potentiels de liaison pour des facteurs de transcription a été effectuée à l'aide des programmes TESS (<http://www.cbil.upenn.edu/tess/>), TRANSFAC (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html#transfac>) et Alibaba2 (<http://www.witi.cs.uni-magdeburg.de/~grabe/alibaba2/>).

2.1.2 Extension d'amorce

L'extension d'amorce a servi à déterminer le site d'initiation de la transcription de HCaRG. Les réactifs du système de Promega "Primer Extension System-AMV Reverse Transcriptase" ont été utilisés dans les conditions suggérées par le manufacturier. Une amorce de 22 pb débutant à la position -408pb de HCaRG (figure 2.1) a été marquée à son extrémité 5' avec le [γ -³²P]ATP et la T4 polynucléotide kinase. L'amorce marquée (100fmol) et des quantités variables

(10ug à 100ug) d'ARN total extrait de rein de rat ont été incubés à 63°C pendant 20 minutes et laissés 10 minutes à la température de la pièce. L'extension a été effectuée à 42°C pendant 30 minutes avec la AMV reverse transcriptase. Le produit obtenu a été chauffé à 90°C pendant 10 minutes et déposé directement sur un gel contenant 8% acrylamide/7M urée. Le gel a été exposé dans une cassette de Phosphorimager.

2.1.3 Construction des plasmides pour les études d'activité luciférase

Un fragment de 1618pb correspondant à la séquence de -410 pb à -2073 pb du codon ATG de HCaRG a été sous-cloné dans le plasmide pGL3b contenant le gène luciférase. Le clonage a été effectué avec la technologie "Gateway" en suivant les recommandations du manufacturier (Canadian Life Technologies) et a été nommé pGL3b/HCaRGp-1618.

Le nCARE putatif de la région 5'UTR de HCaRG et celui de la PTH ont été sous-clonés dans le plasmide pGL3p contenant le promoteur de SV40 en amont du gène de la luciférase. Les oligonucléotides correspondant aux nCAREs ont été synthétisés : nCARE-HCaRG, l'oligonucléotide sens (5' CGCGTTTTTCCAGACAGGGTATGTAGTGC 3') et l'oligonucléotide antisens (5' TCGAGCACCATATACCCTGTGTCGAAAAA 3'), nCARE-PTH, l'oligonucléotide sens (5' CGCGTTTTTGAGACAGGGTCTCACTCTG 3') et l'oligonucléotide antisens (5' TCGACAGAGTGAGACCCTGTCTCAAAAA 3'). Les bases soulignées représentent des extrémités cohésives MluI et XhoI ajoutées

pour faciliter la ligation (T4 DNA ligase, Invitrogen) dans pGL3p préalablement digéré avec ces mêmes enzymes. Les plasmides ont été séquencés de façon à s'assurer de l'intégrité des fragments d'ADN clonés.

2.1.4 Transfections

Les cellules Hela ont été transfectées par la méthode utilisant un précipité calcique (calcium-phosphate) (203). Brièvement, 100 000 cellules Hela ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits et gardées en culture en présence de DMEM+/10%FBS/1X P/S. Quatre ug des constructions plasmidiques et 0,25 ug du plasmide pCMV- β gal ont été co-transfectés pendant 24 heures. Les cellules ont alors été stimulées avec le CaCl_2 , le NaCl, ou le mannitol pour différentes périodes de temps. Pour les expériences de CaCl_2 , au moment de la stimulation, le milieu de culture a été changé pour du milieu sans calcium, le HamF12/10% FBS/1X P/S, supplémenté ou non avec du CaCl_2 . Suite aux stimulations, les cellules ont été lysées et les essais luciférase et β -gal standards ont été effectués. Dans chaque expérience, les conditions ont été testées en triplicata. Les résultats présentent les données obtenues de 4, 5 ou 6 expériences indépendantes. Les erreurs standards ont été évaluées et des tests de t (Student) non-pairés ont été effectués. Pour ce dernier, une valeur inférieure à 0,05 ($p < 0,05$) était considérée significative.

2.1.5 Préparation des extraits nucléaires et retard sur gel

Les extraits nucléaires ont été préparés des cellules Hela traitées avec différentes concentrations de NaCl. Suite à leur stimulation, les cellules ont été lavées dans du

PBS 1X, centrifugées 5 minutes et les culots ont été resuspendus dans du tampon Tris (50mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM orthovanadate de sodium, 1X inhibiteur de protéases). Suite à une deuxième centrifugation à 5000 RPM pendant 4 minutes, les culots ont été resuspendus dans le tampon de lyse (20mM Hepes pH 7,9, 350mM NaCl, 20% glycérol, 1mM MgCl₂, 0,5mM EDTA pH 6,5, 0,1 mM EGTA pH 6,5, 1% NP-40, 1X inhibiteur de protéases, 1mM PMSF, 1mM orthovanadate de sodium) et incubés à 4°C pendant 30 minutes. La dernière centrifugation s'est effectuée à 13 000 RPM pendant 10 minutes et le surnageant a été récupéré. Les oligonucléotides complémentaires correspondent au nCARE putatif de HCaRG et à celui de la PTH ont été synthétisés (Canadian Life Technologies) et hybridés pour être ensuite utilisés dans les expériences de retard sur gel.

nCARE-HCaRGS :

5'(AAGGGGATCC)TTTTTCCAGACAGGGTATGTAGTGC3',

nCARE-HCaRGAS :

5'AAAAAGGTCTGTCCCATACATCA(CGTCTAGAAGA)3'

nCARE-hPTHs :

5'(AAGGGGATCC)TTTTTGAGACAGGGTCTCACTCTGAGTGC3'

nCARE-hPTHAS :

5'AAAAACTCTGTCCCAGAGTGAGACTCA(CGTCTAGAAGA)3'

Les bases entre parenthèses représentent des sites de digestion BamHI et BglII.

Les sondes ont ensuite été marquées avec le [γ -³²P] ATP par la T4 polynucléotide kinase (Canadian Life Technologies). Pour chaque réaction, 5 ug d'extraits

protéiques ont été incubés avec 20 000CPM de sonde et 1 ug de poly dI-dC. Pour la compétition, un excès molaire de 10 à 200 fois de sonde froide ou de sonde nCARE-PTH non-marquée a été ajouté à la réaction. Les réactions de liaison ont été effectuées pendant 30 minutes à la température de la pièce puis immédiatement déposées sur un gel non-dénaturant de polyacrylamide 4,5%. Après 90 minutes de migration à 250V, le gel a été séché puis exposé dans une cassette de Typhoon.

2.1.6 Modulation de l'expression de HCaRG par le calcium ou le sodium de la diète

Des rats SHR de 7 semaines ont été soumis à des diètes ayant un contenu différent en calcium ou en sodium. Le protocole utilisé a été décrit par notre groupe (68) mais sera brièvement expliqué dans les prochaines lignes. Les rats ont été nourris avec une diète normale pendant une semaine puis aléatoirement divisés en 4 groupes de 7 rats. Chaque groupe correspondait à une diète différente soit la diète 1, haute en Na⁺/faible en Ca²⁺ (1,5% Na⁺/0,15% Ca²⁺); diète 2, faible en Na⁺/haute en Ca²⁺ (0,2% Na⁺/2,5% Ca²⁺); diète 3, haute en Na⁺/haute en Ca²⁺ (1,5% Na⁺/2,5% Ca²⁺) et diète 4, faible en Na⁺/faible en Ca²⁺ (0,2% Na⁺/0,15% Ca²⁺). Les rats ont été maintenus à leur diète pendant 3 semaines. L'ARN a été extrait des reins et l'expression de HCaRG a été mesurée par une hybridation de type dot blot.

2.2 Résultats

2.2.1 Clonage de la région en amont du gène codant pour HCaRG

La technique de la marche génomique nous a permis d'amplifier un fragment de 1618pb correspondant à la région 5'UTR de HCaRG chez le rat. La figure 2.1 représente cette région et la séquence jusqu'au codon ATG. L'analyse de la séquence d'ADN de ce fragment a été effectuée afin d'identifier des éléments putatifs de réponse. La région promotrice de HCaRG ne possède pas de boîte TATA mais une boîte CCAAT inversée située à -588pb du codon ATG. On dénote aussi la présence de plusieurs sites de liaison pour le facteur Sp1. Parmi ceux-ci, 4 sont situés dans une région riche en GC (62%), plus précisément entre les bases -423 et -523. Fait intéressant à noter, 2 des sites Sp1 sont situés juste en amont d'un site putatif d'initiation de la transcription (voir section 2.2.4). La présence de plusieurs sites Sp1 fait partie des caractéristiques d'un promoteur ne possédant pas de boîte TATA, ces derniers étant particulièrement sensibles à Sp1 (206;207). Les facteurs Sp1 ne permettent pas seulement la transcription basale des gènes mais ils peuvent aussi jouer un rôle important dans la modulation des gènes. Ainsi, les sites Sp1 d'une région promotrice peuvent répondre à plusieurs signaux. Ces réponses peuvent être spécifiques à un type cellulaire et dépendamment du promoteur, les sites Sp1 peuvent avoir des fonctions différentes (208). Les autres sites Sp1 retrouvés dans le promoteur de HCaRG peuvent donc moduler l'expression de HCaRG, permettant à ce dernier d'influencer la croissance cellulaire, la différenciation ou le cycle cellulaire par exemple.

Un élément nCARE putatif a aussi été localisé à -861pb du site d'initiation de la traduction. Cet élément partage 10 des 15 pb du nCARE retrouvé dans le promoteur de la PTH, en plus de posséder une séquence riche en thymidines en amont du palindrome. Rappelons que le nCARE est responsable de la régulation négative de la PTH par le calcium extracellulaire et de sa régulation positive par le NaCl (voir section 1.2.6).

Parmi les autres éléments identifiés, on en retrouve deux typiquement associés aux gènes régulés pendant le cycle cellulaire. Ces éléments sont le CHR (cell-cycle homology region) et le CDE (cell-cycle dependant element) localisés respectivement à -741pb et -583pb du codon ATG. Ils sont responsables de la répression transcriptionnelle pendant les phases G0 et G1 du cycle cellulaire des gènes *cdc25C*, cycline A, cycline B et de la survivine (209;210). L'expression de ces gènes augmente donc en phase S et est à son maximum en G2 et M. Une des caractéristiques des promoteurs des gènes régulés pendant le cycle cellulaire, c'est qu'ils ne possèdent habituellement pas de boîte TATA et que le facteur se liant à la boîte CCAAT, soit NF-Y, est souvent l'activateur général de transcription. Ainsi, l'activité de liaison de NF-Y varie pendant le cycle cellulaire (211). L'élément CHR peut fonctionner de façon indépendante ou encore en tandem avec les sites CDE, E2F ou Sp1/3 (211;212). Les facteurs E2F, Sp1 et Sp3 agiraient en coopération avec la protéine de liaison au CHR. Cette dernière a été identifiée par le groupe de Koshore qui a démontré que le TNF- α inhibait la transcription de la cycline A via l'induction d'une nouvelle protéine de 84KDa liant spécifiquement la séquence du

CHR (213). Généralement, lorsque les éléments CDE et CHR sont présents, le CHR est situé à 6 nucléotides en 3' de CDE (210). Cependant, dans le promoteur du gène de HCaRG, on remarque que les deux éléments sont situés à environ 150 pb l'un de l'autre. Cela ne signifie pas que ces éléments soient inactifs puisque comme mentionné plus haut, le CHR peut fonctionner de façon indépendante. De plus, dans le promoteur de la survivine, l'espace entre les 2 éléments ne suit pas la règle, ce qui n'empêche pas qu'ils soient requis, en plus de 2 éléments Sp1, pour l'expression du gène en G2M (209). Des études ont montré que les niveaux élevés de survivine observés dans certains cancers étaient dus en partie à un polymorphisme dans sa région promotrice. Ce polymorphisme au niveau des éléments CDE/CHR cause la dépression de la transcription de la survivine (214).

D'autres éléments putatifs de réponse ont été identifiés dans la région 5'UTR de HCaRG dont 2 pour AP-1, 1 pour Oct-1, 3 sites de liaison pour IRF-1 (interferon regulatory factor-1), 8 sites pour les récepteurs des glucocorticoïdes (GRE), 2 sites pour NF-1 (nuclear factor 1), 2 pour AP-2 et 1 pour GATA-1.

Comme mentionné ci-haut, 2 sites de liaison pour AP-1 sont présents dans le promoteur de HCaRG. AP-1 est un facteur de transcription homodimérique ou hétérodimérique composé de membres des familles Jun, Fos, ATF (activating transcription factor) ou Maf (215;216). AP-1 est impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'angiogénèse et l'invasion tumorale (216;217). Dépendamment du type cellulaire et de son état de différenciation, du

stade et du type de tumeur, AP-1 peut soit favoriser la croissance de la tumeur ou plutôt être un suppresseur de tumeur (217). Un rôle dans la ré-épithélialisation suite à une blessure de l'épiderme lui a aussi été attribué (218).

Oct-1 est une protéine ubiquitaire qui fait partie de la famille POU (Pit-Oct-Unc) des facteurs de transcription (219;220). Suite à un stress génotoxique, on dénote une augmentation des niveaux protéiques de Oct-1, de même qu'une augmentation de son activité de liaison à l'ADN (221). GADD45 est un gène important au niveau de la réponse des cellules à un dommage à l'ADN et induit un arrêt du cycle cellulaire en G2M. Or, l'augmentation des niveaux d'ARNm de GADD45 suite à une lésion à l'ADN par différents agents (irradiations UV ou trichostatin A (TSA)) serait en partie dépendante de Oct-1 (222;223). En fait, Oct-1 et NF-Y peuvent augmenter de façon indépendante GADD45 mais la présence des 2 éléments dans la région promotrice aurait un effet additif sur l'expression du gène (219;222). Il est intéressant de rappeler que ces 2 éléments sont retrouvés dans le promoteur de HCaRG et que la surexpression du gène amène un arrêt des cellules en G2M.

Le facteur IRF-1 (interferon regulatory factor-1) est un inhibiteur de la croissance cellulaire et est induit par les interférons, les cytokines et les hormones (224-226). C'est un activateur transcriptionnel mais il possède un répresseur antagoniste, soit IRF-2. IRF-1 et IRF-2 reconnaissent la même séquence d'ADN et de façon constitutive, leur expression est faible. Étant donné que la protéine IRF-1 est un peu moins stable que IRF-2, les niveaux de IRF-2 sont plus élevés que ceux de IRF-1.

Cependant, la présence d'interférons amènera une augmentation de IRF-1 avant l'augmentation de IRF-2. Conséquemment, les niveaux de IRF-1 sont transitoirement plus élevés que ceux de IRF-2 (226). C'est la proportion de ces 2 protéines qui déterminerait la croissance des cellules. Il a été proposé que l'effet d'inhibition des interférons sur la croissance cellulaire serait d'abord dû à l'induction de IRF-1, puis à l'effet activateur de ce dernier sur l'expression de gènes impliqués dans le contrôle négatif de la croissance cellulaire (225). Parmi ces gènes, on retrouve p21, p53 et iNOS (inducible nitric oxide synthase) (227-230). Il serait tentant d'ajouter HCaRG à cette liste mais des études d'expression et d'activité promotrice seront nécessaires pour confirmer l'implication de IRF-1 dans la régulation de HCaRG.

Il est généralement reconnu que l'activation de la transcription par les GRs (glucocorticoid receptor) est possible grâce à la liaison de ces récepteurs en tant qu'homodimère à deux demi-sites GRE (glucocorticoid responsive element) organisés en palindrome et séparés par trois nucléotides (231). Il a été démontré que les GRs avaient la capacité de se lier à un demi-site GRE sous forme de monomère, sans toutefois affecter la transcription (232). On retrouve cependant plusieurs gènes dont l'activité transcriptionnelle est modulée par la présence de plusieurs GRE, ces derniers ayant la capacité de coopérer ensemble (233-236). La présence de plusieurs sites GRE dans la région promotrice de HCaRG (dont certains à proximité l'un de l'autre) suggère donc une régulation du gène par les glucocorticoïdes.

Séquence de la région 5'UTR de HCaRG

```

-2073 GREATCCGGACT CCTAAGGTTG CAGAACCTGA GAGTAAATGT GACACTATTT
-2023 AP-1GGAAAAATGG GATA-1TCTTGGCAAT TGAAGTTATT AGAGTGCTTA CAAGAAGGTG
-1973 GAAATTTAC ATAGAGACAG AGGCAGAGGG CCAGGCAGTG GTGGCATGGC
-1923 ATATGCTTTA ATTCACACAT TCAGGAGCGC AGAGGCAGTC TGATCTCCGA
-1873 AP-1GHCAGCCTG GATA-1ATCTAGGCCT ACAGAGAGAA ACCCTGTTTC CAAAAAAAAG
-1823 AP-1GAGTCA GAGA GATA-1TTAGAGAGAT ACATCCAAGC TAAGGAACAG TCAAGGATNG
-1773 TTAGAGCTAC AP-1AACTAATAG CTGCAAGAGG AATTGATAGA GREACATGGTCCT
-1723 AACACTTAAG AP-1AGCTGACTCC TACGGCACTT AGGCCTTTCG AATTGTTTTC
-1673 TGTGGAGTTG ATGAATATAG GGCTTCGAGA TTTTAGGCA AACCTAAAAA
-1623 TGGAGACTGA TTTTGTTTTA AGTCTCCAC TGACCTATAC CGTCACTCTT
-1573 GTAATTTAAA TTTAAAAATA GCAGTCTGGG CAGCTCTCC CAGAAGCTGC
-1523 TCTGCTTAC CTCCATAGG TAAGTACAAG TTTCAATTAC CGCACAGCAC
-1473 ACACAGCATC TGAGGTTGAG GTGGTNGTCT TGTTCCTTTA AP-2GGANTATGGA
-1423 GTATGGAGTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT CAGAGCTGGG AP-2GCCGAGCCC
-1373 AGGGCCTTGC ACTTGCTAGG CAAGAGCTCT ACCACTGAGC TAAATCCCCA
-1323 ACCCCGAGTT AGGAGTTTTT GTAATTGTGA GREGCAITGCTC CTATGTGGCG
-1273 GCGCGTGTGT GREGTGTGCTGT GTGCGTGTGT GTGTGTATT ATTTATTTAA
-1223 GACAGAATCT CTGTGTAGCC CTAACCTGCC TGGAACTCAC AGAGATCTGT
-1173 CTGCCTTGC CTCCCAATGG IRF-1/2AGGCCGAGGA ACTCACTCTG GAGCCGAGAA
-1123 TGCCCTTCT NF-1TGGCTTGTG GREATGATCCTGT GRECCAGGCTCT IRF-1/2TGGGATCACT
-1073 TGCTTGATC ACTAGGTTTG CTTCAATAGC CATTCAATAT ATCCTTGATG
-1023 Oct-1AAATATCTAT ATACACTTTT GCCCGCATAA TTACTCCCC ACCCTAAAAG
-973 CTTCATGAGG TTATAAGGCA TGTACCACAC AAATTTACGA CCCTCCTCCC
-923 CCTTGGCGGG AACTTTGGTT CGTGTGTTTG nCARETTTTGTTTTG TTTTTTTCC
-873 nCAREAGACAGGGTA TGTAGTGCTG GCTGTGCTGG AACTCTCTGT GTAGACTGGA
-823 GRECTGCTCTGA ATTCACAAG ATCCTCCTGC TCTGCTCC CAGTGTGTTG
-773 ATTAAGACG TGGGCCGCT CTTGGCCATC TATTTGABAA CHRTATGCAATTC
-723 GTTGAATCA ACTACAATAA TTCTGGCTTG TGTACCTCAC ACAGGACTGC
-673 CTGGCTCAG GREGAAAACAGAA Sp1GCCACGCATC CAACCCAGAA GCGGATTGCC
-623 TTCTGCTTCT AP-2GTCCCCAAA GTGTCAGAAG Inv. CCAAT box /CDEGCAAGCATT GGGGGCCGA
-573 TGCGCTCGT TCCGGGAACC ACAGAGACC TGTGCGCTTT NF-1TCCTAGAGCG
-523 GCCCGGAAGT Sp1/IRF-1/2GTCTCTGGTC Sp1ACTTCTGAG Sp1ACCCGCCAAC TCCAGCTGC
-473 Sp1ACGATCCATA Sp1GCCAGCTACC GCGGCTAGGT TCCTCCAGGT Sp1GCAGAGGGCG
-423 GTAAAGGCTT GGTTTGTATT TGTAAATGga ggtccggctc tcccttgcta
-373 tcatgaggat teagggttga ggggtctcag ctgcatgtc cagcttcaat
-323 aataactatt acgtaggact taegtgegeg cttctgttct ttggttcttt
-273 tccctgcaa ctgttaaate tctgggacgc ctccttctg ctagactcag
-223 gagggtcctc ttgccacacg gtctcagcgc cacctcccaa gcaacgcac
-173 ctgtttgcta tegtgtgtag ttatgtgtcc ggcgga tggg ggctccaatc
-123 cgaccccaa tttttagtac aggaagctcc tgaactagga gtaactgtc
-73 tctcctcaac cttctetagg tCAACTGTGG TTAGGACCTT CTCTCGGGAC
-23 TGGTCAAGAA ACGGGAAGAA AGGATG

```

Figure 2.1 Séquence du promoteur de HCaRG. La numérotation est définie par rapport au site d'initiation de la traduction, le codon ATG, auquel la position +1 a été assignée. La séquence intronique est en lettres minuscules et certains sites putatifs de reconnaissance pour des facteurs de transcription sont soulignés. Le nCARE putatif est quant à lui en caractères gras.

2.2.2 Homologie de la région 5'UTR de HCaRG chez le rat, la souris et l'humain

La séquence nucléotidique de la région codante de HCaRG de rat possède 93% d'homologie avec celle de HCaRG de souris et 79% avec la séquence humaine (237). Nous avons donc décidé de comparer les séquences des régions 5'UTR de HCaRG chez ces mêmes espèces. L'analyse montre que la séquence allant de -2073 pb jusqu'au codon ATG de HCaRG chez le rat possède des régions ayant une grande homologie avec celles de souris (figure 2.2). En fait, plusieurs petites régions du promoteur de HCaRG de rat partagent plus de 80% d'identité avec la souris. Cependant, la même région d'ADN (-2073 pb jusqu'au ATG) partage une homologie globale de seulement 40% entre le rat et l'humain et ne démontre aucune région particulière de grande homologie entre les deux espèces. Il faut toutefois mentionner que certains sites putatifs de liaison pour des facteurs de transcription sont communs au promoteur de rat et d'humain. L'analyse d'une séquence nucléotidique de 1665pb en amont du gène hHCaRG a ainsi montré la présence de nombreux sites Sp1, de sites potentiels CDE, GATA-1 (3), Oct-1 (1), NF-1 (8), AP-1 (3), AP-2 (2), GRE (6) et IRF (3). Le nombre de sites identifiés peut sembler élevé mais la région en 5'UTR de hHCaRG est riche en GC et plusieurs de ces sites se chevauchent. L'implication de chacun de ces sites peut être différente selon le type de cellule et le contexte cellulaire. De plus, certains de ces facteurs de transcription peuvent interagir ensemble et amener un autre niveau de régulation de la transcription. Notons toutefois l'absence dans cette région des éléments nCARE et CHR.

Homologie des séquences en 5' du codon ATG entre le rat et la souris

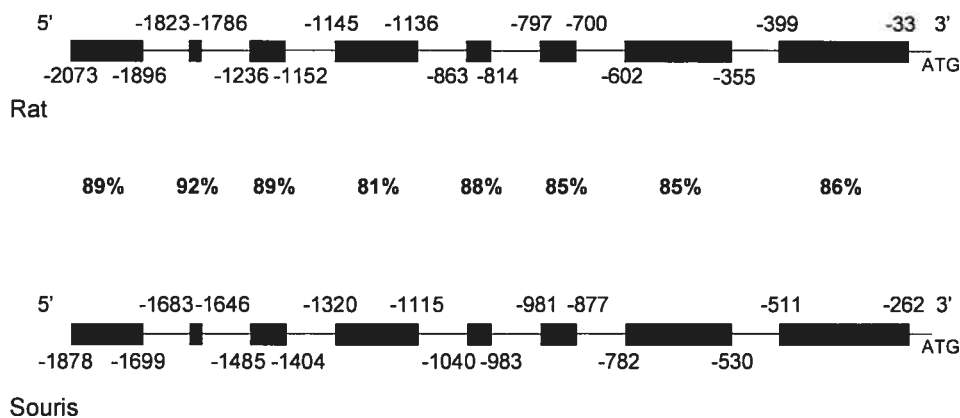


Figure 2.2 La séquence de 2073 pb en amont du codon ATG de HCaRG a été alignée avec celle de l'ADN génomique du chromosome 15 de souris contenant le gène HCaRG. Une représentation schématisée des régions homologues entre les deux espèces est présentée dans cette figure. Les barres noires représentent les régions homologues avec leur localisation par rapport au codon ATG, soit +1. Le degré d'homologie entre chaque petite région est indiqué par les pourcentages.

2.2.3 Comparaison des séquences du nCARE dans différentes espèces

La présence d'un nCARE putatif dans la région promotrice de HCaRG de rat est en accord avec la régulation négative du gène par le calcium extracellulaire. Nous avons postulé que si cet élément était effectivement important dans la régulation de l'expression de HCaRG, il serait conservé entre les espèces. Le génome de souris possède une séquence similaire au nCARE de rat situé à -1001 pb du codon ATG de HCaRG. L'élément partage 13 des 15 pb du nCARE putatif de HCaRG chez le rat et 12 pb avec le nCARE de la PTH (figure 2.3). Chez la souris, on observe aussi une région riche en thymidines en amont de la séquence. Dans le génome humain, la seule séquence ayant une similarité avec le nCARE partage seulement 7 des 15 pb avec celui de HCaRG de rat, ne possède pas de séquence riche en thymidines en 5' et est localisé dans le premier intron (-877 pb du codon ATG). L'absence d'un nCARE dans la région immédiate en 5'UTR du codon ATG chez l'humain n'exclut pas la possibilité que l'élément soit situé plus en amont. En effet, on retrouve le nCARE de la PTH à -3,5kb du site d'initiation de la transcription du gène (58). D'autre part, la présence d'un élément de réponse dans le premier intron d'un gène n'est pas inusitée. Par exemple, on peut noter la localisation intronique d'éléments importants pour la régulation de la transcription des gènes codant pour le cytochrome P450IA1, l'utrophine, c-fos et CFTR (238-241). Il est donc possible que le nCARE de HCaRG humain, situé dans l'intron 1, puisse être fonctionnel.

Comparaison des nCAREs

hPTH	<i>TCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT</i> GAGACAGGGTCTCA
rVasopressine	<i>TTTTTATTCTTTTAATATC</i> GAGACAGGGTCTCA
mVasopressine	<i>TTTTTTATGTTTTTTAATAT</i> GAGACAGTGTCTCA
hVasopressine	TAATCAGAAAGCT CAGAGATGGTCTCC
hEndotheline-1	TAATCAGAAAGCG GAGACAGAGTGAGA
rANP	<i>TTCTTTTTATTTTG</i> GAGACAGGGTCTCA
rHCaRG	<i>TTTGTGTTTGTTTGTTTGTTTGTTTTTTTCC</i> AGACAGGGTATGT
mHCaRG	<i>TTGTTTGGGTTTGTTTGTTTGTTTGTTT</i> GAGACAGGGTATGT
hHCaRG	CCATCCGG GAAGCCTCCGA

Figure 2.3 Comparaison des nCAREs retrouvés dans le promoteur de différents gènes et dans la région 5'UTR de HCaRG de rat et de souris. Les bases en caractères gras sont identiques à celles du nCARE de la PTH. La séquence riche en thymidines est montrée en italique.

2.2.4 Détermination du site d'initiation de la transcription

La technique d'extension d'amorces a été utilisée pour localiser le site d'initiation de la transcription. N'ayant pas été combinée à un essai de S1 nucléase, ceci nous a permis de déterminer de façon approximative la position de trois sites d'initiation de la transcription dans le promoteur du gène de HCaRG. Comme le démontre la figure 2.4, l'extension d'amorce a produit 3 bandes majeures d'environ 100 pb, 70 pb et 65pb. Ce résultat laisse supposer la présence de 3 sites putatifs d'initiation de la transcription situés à -473 pb, -478 pb et -507 pb du codon ATG. La présence de plusieurs sites d'initiation de la transcription n'est pas exceptionnelle et est même fréquemment observée dans les promoteurs des gènes régulés pendant le cycle cellulaire (209;242).

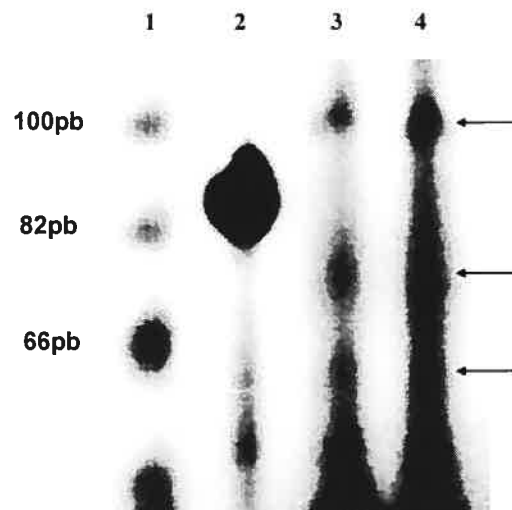
Localisation des sites d'initiation de la transcription

Figure 2.4 Extension d'amorces : le puits 1 montre le marqueur d'ADN ϕ 174, le puits 2 contient le contrôle positif à 82 pb, dans les puits 3 et 4, 10 ug et 50ug d'ARN de rein ont respectivement été utilisés dans la réaction.

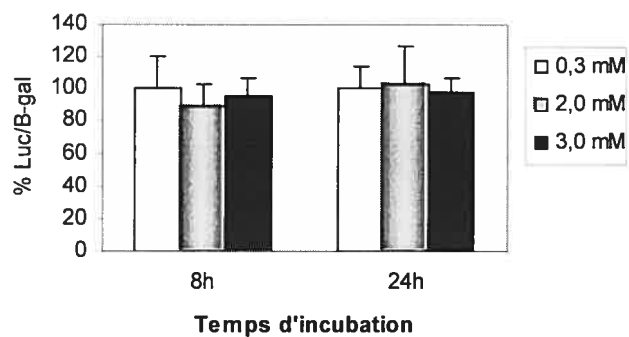
2.2.5 Effet du calcium sur l'activité promotrice de HCaRG

L'expression de HCaRG est régulée de façon négative par le calcium extracellulaire dans les cellules de parathyroïde en culture (203). Nous nous sommes donc attardés à savoir si le nCARE présent dans la région 5'UTR de HCaRG de rat pouvait être responsable de cette régulation. Les plasmides contenant un fragment de 1618pb de la région 5' UTR de HCaRG, celui contenant le nCARE de HCaRG et celui avec le nCARE de la PTH ont été utilisés dans des expériences de transfection. Les transfections ont été effectuées dans les cellules Hela, ces dernières exprimant HCaRG.

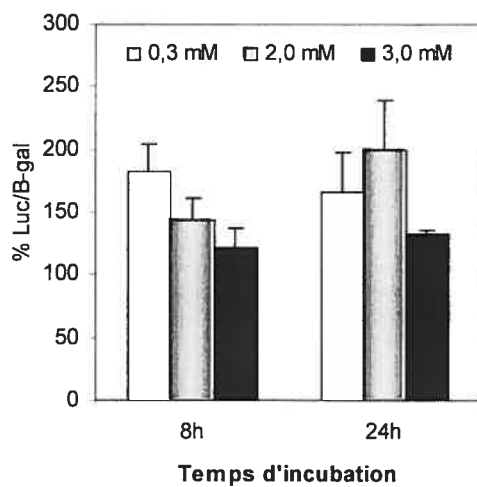
Le milieu de culture contenant une faible concentration de calcium (0,3 mM) n'a eu aucun effet sur l'activité du plasmide pGL3b/HCaRGp-1618 lorsque comparé aux milieux ayant une concentration normale (2 mM) ou élevée de calcium (3 mM) (figure 2.5A). Pour sa part, le plasmide pGL3p/nCARE-HCaRG a réagi en diminuant son activité après 8 heures d'incubation en présence de concentrations croissantes de calcium (figure 2.5B). Cependant, il semble que les conditions optimales pour l'étude de l'effet du calcium sur le nCARE ne soient pas atteintes puisque même le nCARE de la PTH ne réagit pas dans nos conditions (figure 2.5C). De façon à pallier à ce problème, il serait intéressant d'utiliser un ionophore de calcium comme la calcimycine (A23187) pour faciliter le transport du calcium à travers la membrane et ainsi augmenter la concentration de Ca_i .

Effet du calcium sur le promoteur de HCaRG

A) pGL3b/HCaRGp-1618



B) pGL3p/nCARE-HCaRG



C) pGL3p/nCARE-PTH

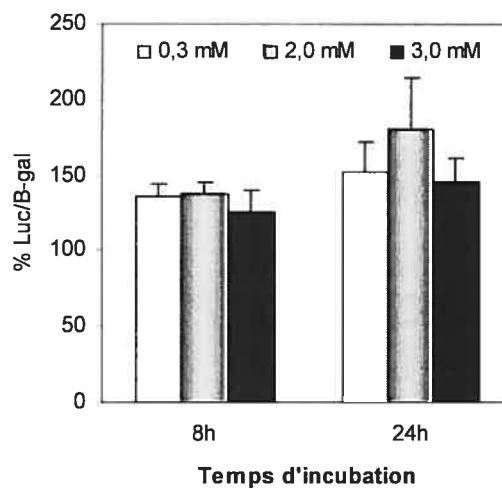


Figure 2.5 A) Activité luciférase du plasmide pGL3b/HCaRGp-1618. Une valeur de 100% a été attribuée à "l'activité luciférase/activité β -gal" du plasmide dans le milieu contenant 0,3 mM de calcium. B) Activité luciférase du plasmide pGL3p/nCARE-HCaRG. C) Activité luciférase du plasmide pGL3p/nCARE-PTH.

2.2.6 Effet du stress osmotique sur l'activité promotrice de HCaRG

NaCl

Comme mentionné dans la section 1.3.3 de ce travail, l'élément nCARE retrouvé dans le promoteur de la PTH est responsable de la régulation de l'expression du gène par le calcium, mais aussi par le NaCl. Nous avons donc voulu déterminer si le NaCl pouvait influencer l'activité du promoteur de HCaRG via son élément nCARE.

Nous avons d'abord étudié l'effet du NaCl sur l'activité de la région comprenant 1618pb en amont de HCaRG, région dans laquelle le nCARE est situé. Les cellules Hela ont donc été transfectées avec le plasmide pGL3b/HCaRGp-1618 puis incubées dans un milieu contenant 110,34mM de NaCl auquel on a ajouté ou non 50mM de NaCl pendant 4h, 8h, 16h ou 24h. Le graphique de la figure 2.6 montre bien l'effet négatif de l'ajout de NaCl sur l'activité du promoteur de HCaRG. Cette diminution est visible après seulement 4 heures et demeure présente même après 24 heures d'incubation. L'effet le plus important est observé après 8 heures où l'on retrouve seulement 32% d'activité luciférase avec l'ajout de 50mM de NaCl.

Effet du NaCl sur l'activité du promoteur de HCaRG

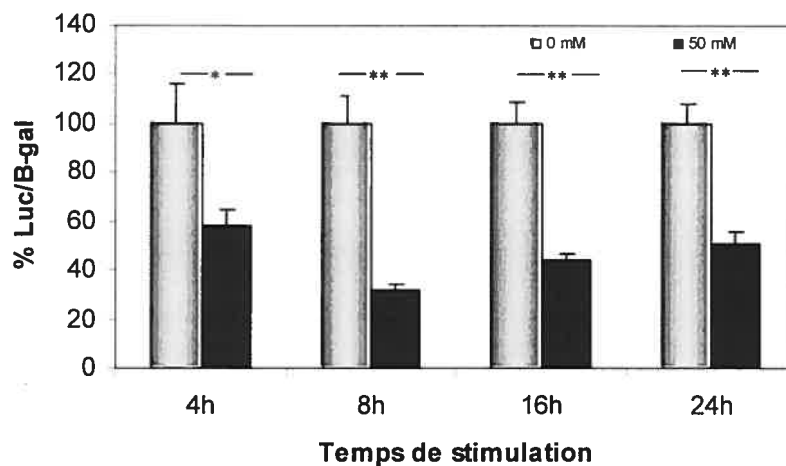


Figure 2.6 Activité luciférase du plasmide pGL3b/HCaRGp-1618. Une valeur de 100% a été attribuée à "l'activité luciférase/activité β -gal" du plasmide en condition basale pour chacune des conditions. Les résultats représentent les données obtenues de 3, 4 ou 5 expériences, chacune effectuée en triplicata. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

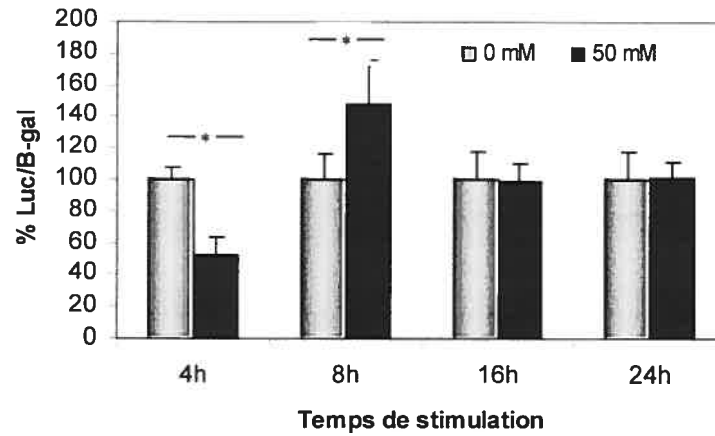
Par la suite, nous avons voulu savoir si l'effet négatif du NaCl sur l'expression du promoteur de HCaRG (pGL3b/HCaRGp-1618) était attribuable à la présence du nCARE. Cette fois, le vecteur pGL3p contenant le nCARE de HCaRG ou le nCARE de la PTH a été transfecté et incubé en présence de NaCl. Les résultats obtenus pour le nCARE de HCaRG sont présentés sur le graphique de la figure 2.7A. On peut constater qu'après 4 heures, l'ajout de NaCl diminue l'activité du nCARE de HCaRG d'environ 2 fois. Cet effet est cependant transitoire puisqu'après

8 heures, on note une augmentation de 1,5 fois de l'activité du nCARE en présence de NaCl. Toutefois, à partir de 16 heures, le NaCl n'a plus d'effet sur l'activité du nCARE.

Dans la littérature, il est rapporté que l'ajout de 50mM de NaCl pour une période de 20 ou 40 heures a un effet positif sur l'activité du nCARE de la PTH (80). Dans nos conditions, cette augmentation de l'activité du nCARE de la PTH en présence de NaCl n'a pas été observée et ce, peu importe le temps d'incubation (figure 2.7B). Cependant, les conditions expérimentales du groupe de Okazaki n'étaient pas identiques aux nôtres en ce qui a trait au vecteur utilisé et à la méthode de transfection entre autres (80). Par contre, ce qui est intéressant de noter ici, c'est la différence de réponse obtenue entre le nCARE de HCaRG et celui de la PTH. Une hypothèse pour expliquer cette différence c'est que les séquences des nCAREs ne sont pas identiques et pourraient donc lier des protéines distinctes.

Combinés ensemble, les résultats obtenus avec pGL3b/HCaRGp-1618 et pGL3p/nCARE-HCaRG suggèrent la présence d'autres éléments de réponse au NaCl en plus du nCARE dans la région promotrice de HCaRG. En effet, alors que le fragment de 1618pb de la région promotrice de HCaRG voit son activité diminuée par le NaCl et ce, peu importe le temps d'incubation, le nCARE de son côté réagit au NaCl par une diminution d'activité après 4 heures et une augmentation après 8 heures. Ces éléments restent cependant à être identifiés.

A. Effet du NaCl sur l'activité du nCARE de HCaRG



B. Effet du NaCl sur l'activité du nCARE de la PTH

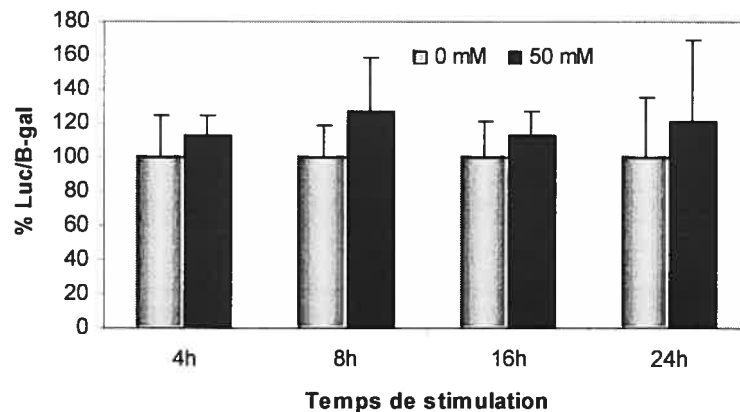


Figure 2.7 A) Activité luciférase du plasmide pGL3p/nCARE-HCaRG. B) Activité luciférase du plasmide pGL3p/nCARE-PTH. En A et B, la valeur de "l'activité luciférase/activité β -gal de pGL3p/nCARE" a été exprimée en fonction de l'activité du plasmide seul dans la condition correspondante. Une valeur de 100% a été attribuée à l'activité luciférase/activité β -gal du vecteur en condition basale. * $p < 0,05$

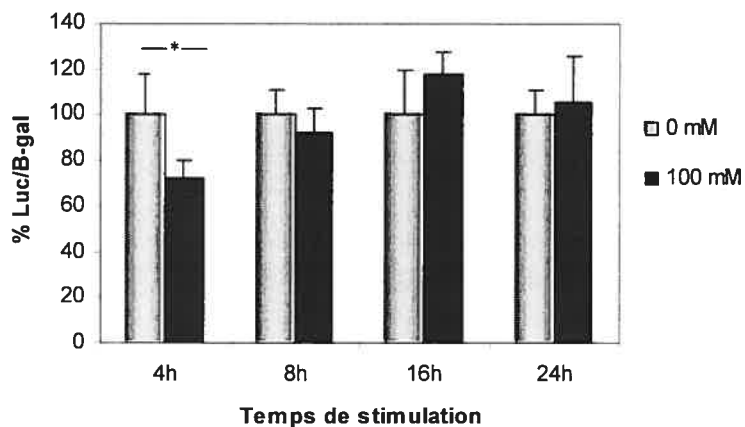
Mannitol

Afin d'établir si l'effet du NaCl sur l'expression de HCaRG était dû à l'hyperosmolarité du milieu extracellulaire ou plutôt à un effet spécifique des ions Na^+ ou Cl^- , le mannitol a été utilisé. Pour obtenir une osmolalité finale équivalente à celle obtenue après l'ajout de 50mM de NaCl, nous avons supplémenté le milieu de culture avec 100mM de mannitol.

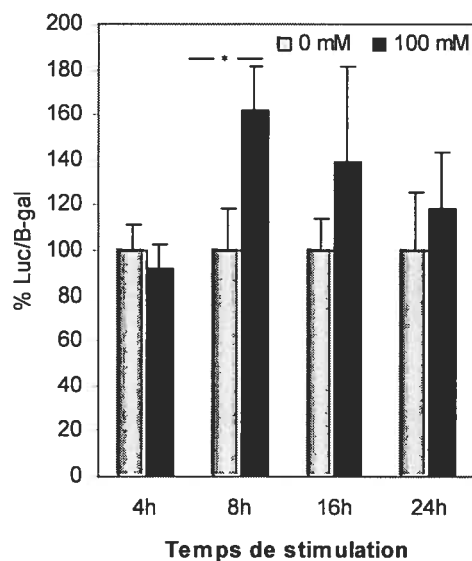
Le mannitol entraîne une diminution significative de l'activité luciférase du plasmide pGL3b/HCaRGp-1618 après 4 heures d'incubation, mais n'a pas d'effet important par la suite (figure 2.8A). Au niveau du nCARE de HCaRG, le patron d'activité ressemble un peu à celui retrouvé avec le NaCl (figure 2.8B). En effet, on observe une légère tendance à la diminution de l'activité du plasmide pGL3p/nCARE-HCaRG après 4 heures d'incubation en présence de mannitol, suivie d'une augmentation significative après 8 heures qui persiste de 16 à 24 heures. De son côté, l'activation du nCARE de la PTH par le mannitol n'est visible qu'après 24 heures d'incubation (figure 2.8C).

Effet du mannitol sur l'activité du promoteur de HCaRG

A) pGL3b/HCaRGp-1618



B) pGL3p/nCARE-HCaRG



C) pGL3p/nCARE-PTH

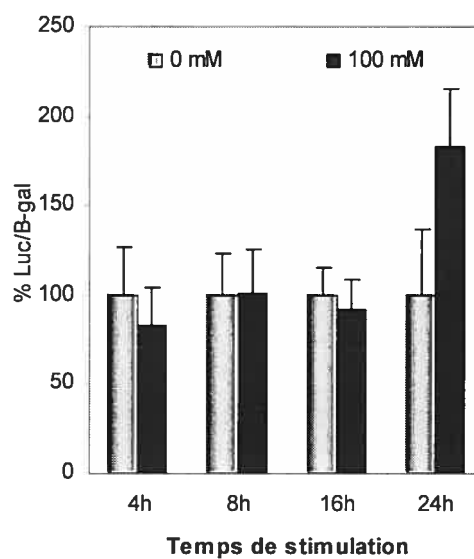


Figure 2.8 A) Activité luciférase du plasmide pGL3b/HCaRGp-1618 B) et C) Activité luciférase des plasmides pGL3p/nCARE-HCaRG et pGL3p/nCARE-PTH. Les calculs ont été effectués de la même façon qu'aux figures 2.6 et 2.7. * $p < 0,05$

Effet de l'hyperosmolarité ou réponse spécifique au NaCl?

Si l'on compare l'effet du NaCl et du mannitol sur l'activité des constructions plasmidiques, on remarque 2 choses principales : 1) le nCARE de HCaRG répond à l'hyperosmolarité de façon générale, donc au changement de volume, 2) le fragment de 1618pb du promoteur de HCaRG répond à l'hyperosmolarité et au NaCl spécifiquement. Ces 2 points seront discutés dans les prochaines lignes.

- 1) Le nCARE de HCaRG possède la capacité de répondre autant à un changement de concentration de NaCl que de mannitol par une diminution d'activité après 4 heures et une augmentation après 8 heures. Le stress hyperosmotique causé par ces 2 agents amène une variation du volume cellulaire et a probablement une influence sur l'expression ou la capacité de liaison des protéines nucléaires au nCARE. Ces dernières se retrouveraient ainsi liées en moins grande quantité au nCARE après 8 heures de stress osmotique. On remarque aussi que les patrons d'activité du nCARE de HCaRG et de la PTH ne suivent pas la même direction. En effet, le nCARE de la PTH montre une tendance à augmenter son activité en présence de NaCl et ce, peu importe le temps de stimulation alors que le mannitol produit le même effet après 24 heures seulement.

- 2) Le plasmide contenant 1618pb de la région 5'UTR de HCaRG ne répond pas de la même façon au NaCl qu'au mannitol. En effet, le NaCl cause une diminution d'activité peu importe le temps d'incubation alors que le mannitol

n'est efficace qu'après 4 et 8 heures. À ce moment, la diminution d'activité observée en présence du NaCl ou du mannitol est possiblement attribuable au stress hyperosmotique du milieu extracellulaire causé par ces 2 agents. Le nCARE présent dans cette région du promoteur joue probablement un rôle dans cette régulation (incubation de 4 heures) mais n'est pas le seul responsable puisqu'après 8 heures l'activité du nCARE isolé est augmentée. Après 16 heures d'incubation, le NaCl ou le mannitol pourrait influencer spécifiquement la disponibilité et/ou la capacité de liaison des protéines se liant à d'autres éléments de la région promotrice. Un des candidats potentiels, est l'élément de réponse à l'IRF-1. Comme mentionné dans la section 2.2.1 de ce travail, l'expression et l'activité de liaison de IRF-1 sont diminuées en condition hyperosmotique et conséquemment, l'expression des gènes régulés par l'IRF-1 est aussi diminuée (106). Le promoteur de HCaRG possède 3 sites de liaison pour l'IRF-1.

Basée sur ces résultats, une hypothèse est proposée pour expliquer comment le NaCl et le mannitol pourraient affecter le promoteur de HCaRG (figure 2.9).

**Hypothèse pour expliquer l'effet du stress hyperosmotique
sur l'activité du promoteur de HCaRG**

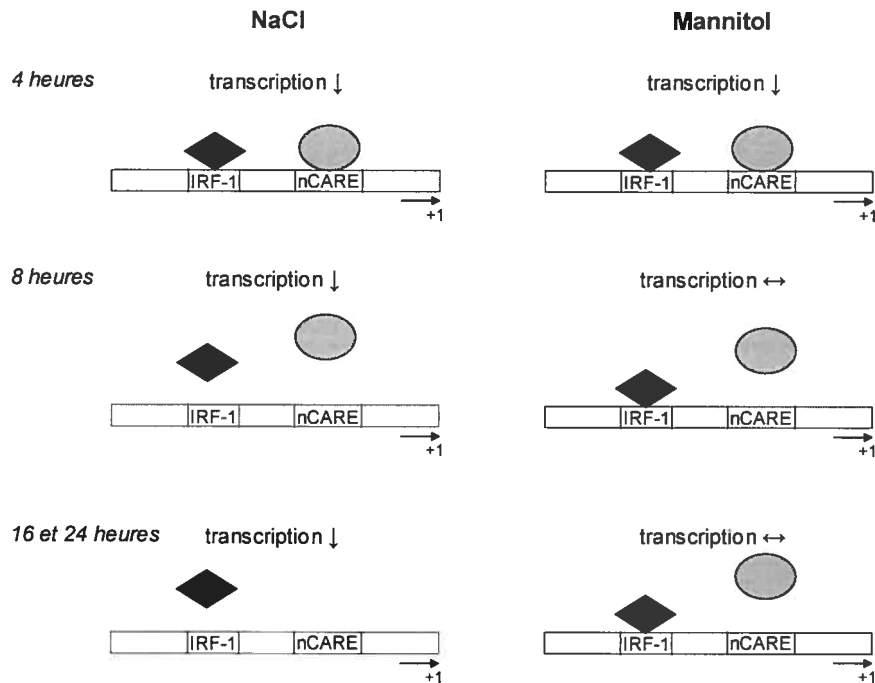


Figure 2.9 Cette hypothèse propose que le stress hyperosmotique causé par l'ajout de NaCl et de mannitol dans le milieu extracellulaire favorise la liaison des protéines nucléaires au nCARE après 4 heures d'incubation et de ce fait, diminue l'activité transcriptionnelle. Cependant, après 8 heures, la diminution d'activité amenée par le NaCl serait causée par une diminution de la liaison de IRF-1 à son élément puisque la liaison des protéines spécifiques au nCARE est diminuée. Après 16 et 24 heures, le NaCl n'affecterait que l'élément IRF-1, ce dernier semblant insensible au mannitol.

Effet du NaCl sur la liaison des protéines nucléaires au nCARE

Par retard sur gel, nous avons aussi regardé le profil de liaison des protéines nucléaires extraites des cellules Hela aux nCAREs de HCaRG et de la PTH. Le patron de migration entre les deux éléments n'est pas identique bien qu'une compétition réciproque partielle soit possible (figure 2.10). En fait, le nCARE-HCaRG permet de déplacer complètement les protéines nucléaires liées au nCARE-PTH (puits 6). À l'inverse, le nCARE-PTH ne déplace qu'en partie les protéines liées au nCARE-HCaRG (puits 3). Ceci suggère que des protéines supplémentaires lient le nCARE-HCaRG, protéines différentes de celles liant l'élément de la PTH.

Les protéines nucléaires ont été extraites des cellules Hela incubées pendant différentes périodes de temps dans un milieu auquel on avait ajouté du NaCl. Les conditions d'incubation des cellules transfectées étaient ainsi recrées, permettant de comparer les résultats de ces deux expériences. Nos résultats préliminaires montrent qu'après 4 heures d'incubation en présence d'un supplément de NaCl de 50mM, il y a diminution de la liaison des protéines nucléaires au nCARE-HCaRG (figure 2.11). Après 8 heures, on observe une augmentation de la liaison des protéines. Si l'on se rapporte à la figure 2.7, à 4 heures nous avons une diminution de l'activité luciférase du nCARE-HCaRG mais une augmentation à 8 heures. Pour ce qui est de l'effet du NaCl sur le nCARE-PTH, rappelons qu'on observait une tendance à une augmentation de l'activité de l'élément en présence de NaCl (figure 2.7) alors que dans les mêmes conditions, on observe une diminution au niveau de la liaison des protéines nucléaires.

Patron de liaison des protéines nucléaires à l'élément nCARE

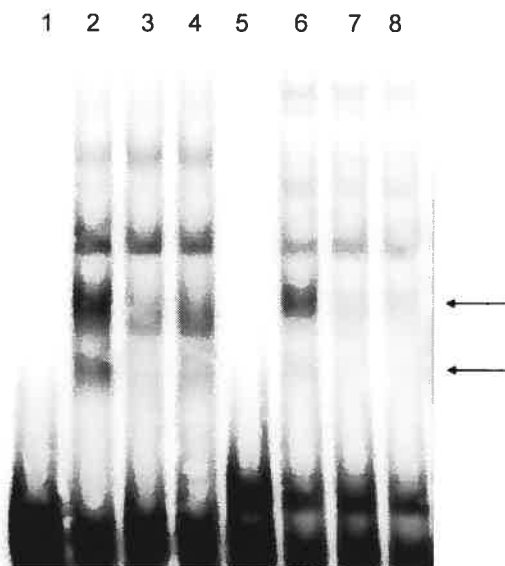
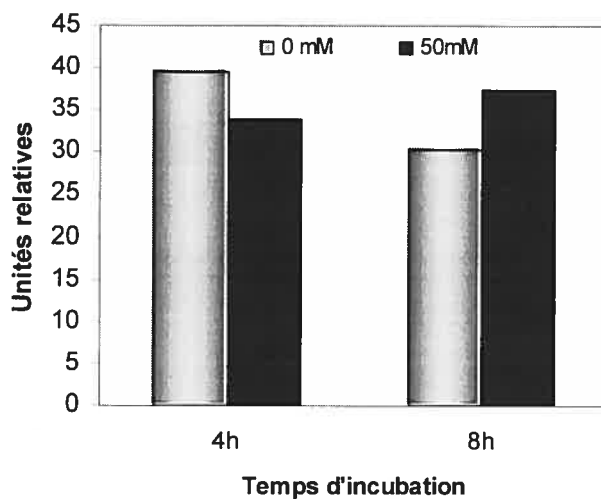


Figure 2.10 Retard sur gel : puits 1 : sonde nCARE/HCaRG, puits 2 : sonde nCARE/HCaRG + protéines, puits 3 : sonde nCARE/HCaRG + protéines + 200X sonde froide nCARE/HCaRG, puits 4 : sonde nCARE/HCaRG + protéines + 200X sonde froide nCARE/PTH, puits 5 : sonde nCARE/PTH puits 6 : sonde nCARE/PTH + protéines, puits 7 : sonde nCARE/PTH + protéines + 200X sonde froide nCARE/PTH, puits 8 : sonde nCARE/PTH + protéines + 200X sonde froide nCARE/HCaRG

Effet du NaCl sur la liaison des protéines nucléaires au nCARE

a) nCARE-HCaRG



b) nCARE-PTH

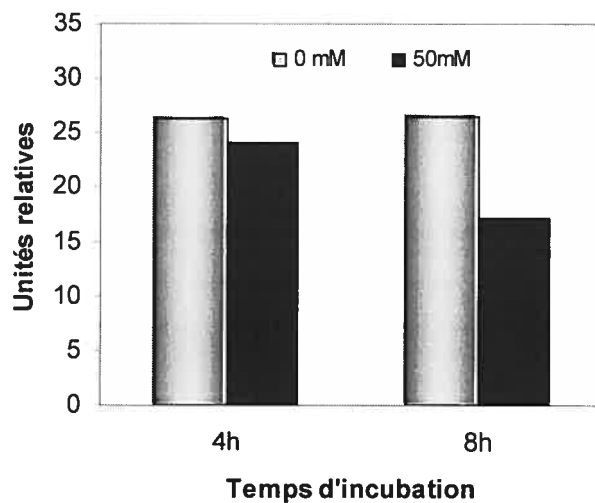


Figure 2.11 Effet du NaCl sur la liaison des protéines nucléaires à l'élément nCARE-HCaRG (a) et nCARE-PTH (b).

2.2.7 Expression de HCaRG dans les reins de rats soumis à différentes diètes

L'expression de HCaRG a été mesurée dans les reins de rats SHR soumis à différentes diètes en calcium et en sodium. Chez les rats ayant reçu une diète faible en calcium, les taux d'ARNm de HCaRG sont plus élevés par rapport à une diète élevée en calcium et ce, peu importe la quantité de sodium ingérée (figure 2.12). Ces résultats sont en accord avec la régulation négative de HCaRG par le calcium extracellulaire montrée avec les cellules de parathyroïde (203). Par contre, il n'y a pas de différence d'expression entre les groupes de rats nourris avec une diète faible ou haute en sodium. Donc chez ces rats, l'expression de HCaRG est modulée par le calcium alimentaire mais non par le sodium.

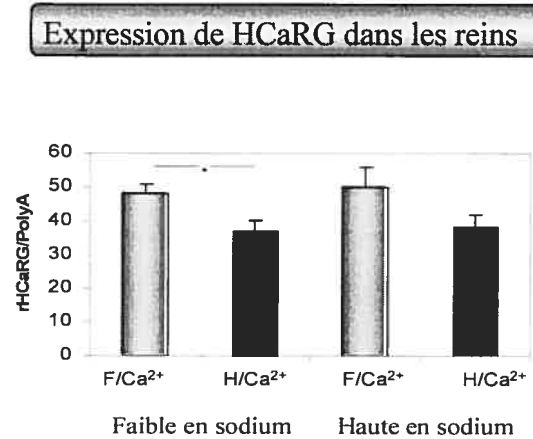


Figure 2.12 Expression de HCaRG dans les reins de rats ayant reçu des diètes faibles ou élevées en calcium et en sodium. * $p < 0,05$.

Chapitre 3

**Profil d'expression de HCaRG en
relation avec la prolifération
cellulaire**

3.0 Introduction du chapitre

Les résultats obtenus des études antérieures semblaient nous indiquer que l'expression de HCaRG était plus faible lorsque les cellules étaient dédifférenciées ou en prolifération, comme c'est le cas suite à une ischémie-reperfusion ou encore dans les tissus fœtaux comparativement aux tissus adultes (203). Dans ce chapitre, l'expression de HCaRG sera évaluée en relation avec l'état prolifératif ou de différenciation des cellules dans deux modèles, soit des tumeurs humaines et les cellules Caco-2. La dernière partie du chapitre proposera une hypothèse pour expliquer la modulation de l'expression de HCaRG.

3.1 Expression de HCaRG dans différentes tumeurs humaines

Dans des études précédentes, nous avons comparé les taux d'ARNm de HCaRG dans différents modèles de cancers et dans des tissus normaux. Nous avons démontré dans un premier temps que l'ARNm de HCaRG était moins abondant dans les lignées cellulaires cancéreuses lorsque comparées à des lignées normales. Dans un deuxième temps, nous avons constaté que l'expression du gène était aussi plus faible dans un glioblastome, dans un carcinome rénal partiellement différencié et dans une tumeur hépatique modérément différenciée lorsque comparé aux tissus normaux adjacents excisés du même site opérationnel (203). Cependant, cette étude comprenait la mesure d'un seul échantillon par type de tumeur. De façon à mener plus loin cette analyse, nous avons décidé d'utiliser une membrane de macro-array comprenant plusieurs échantillons d'ADNc de cancers ciblant différents organes.

3.2 Méthodologie

Une membrane commerciale (Matched Tumor/Normal Expression Array, Clontech, CA) contenant l'ADNc de 68 tumeurs humaines et le tissu normal correspondant provenant du même individu a été utilisé. Onze types de tumeurs étaient présents sur le macro-array. L'hybridation avec une sonde représentant l'ADNc de HCaRG et la quantification ont été effectuées selon les directives du fabricant. Sur les graphiques, l'expression de HCaRG dans les tumeurs est présentée en % de son expression dans les tissus normaux.

3.3 Résultats

Nous avons observé que les taux d'ARNm de HCaRG peuvent aussi bien être augmentés ou diminués, selon le type de cancer et le patient. C'est au niveau du carcinome rénal que l'expression de HCaRG semble être la plus homogène et suivre un patron bien particulier. Ainsi, les niveaux d'ARNm de HCaRG sont plus faibles dans 14 des 15 tumeurs évaluées lorsque comparés aux reins normaux (figure 3.1). On remarque que la diminution du message de HCaRG peut-être très prononcée dans certains cas et atteindre jusqu'à 16% de l'expression par rapport au rein normal chez le même individu. Rien dans les informations que nous possédons ne nous permet d'expliquer l'expression légèrement plus élevée de HCaRG dans la tumeur du sujet 3.

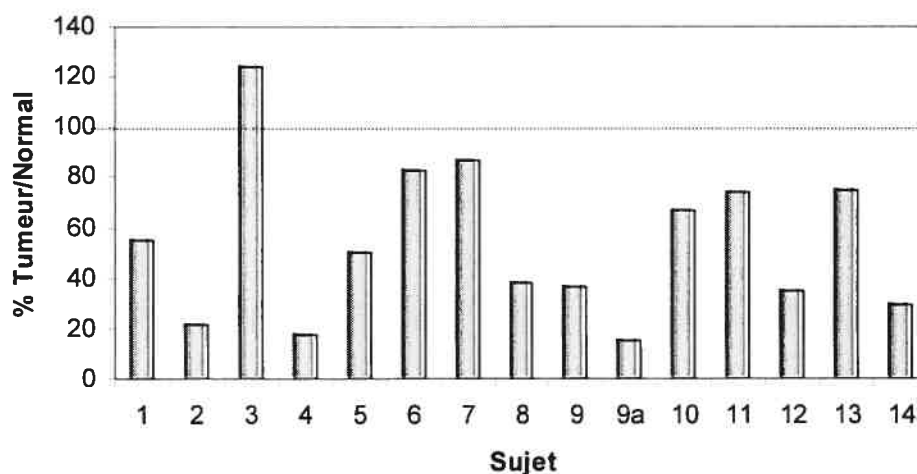
Expression de HCaRG dans les néphroblastomes

Figure 3.1 Expression de HCaRG dans 15 tumeurs rénales.

D'autre part, au niveau des tumeurs de l'estomac et de la prostate, les taux d'ARNm de HCaRG ont tendance à être plus élevés que dans les tissus normaux (figures 3.2 et 3.3). Plus de 90% des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes. Afin de classifier la tumeur, on utilise le score de Gleason, basé sur l'architecture glandulaire. Il corrèle avec le stade de la tumeur et la survie et a donc une valeur pronostique importante. Le score de Gleason varie de 2 à 10 et plus le chiffre se rapproche de 10, moins la tumeur est différenciée (243). Sur la figure 3.3, les deux tumeurs prostatiques présentant une expression de HCaRG plus élevée que leur contrepartie normale ont des scores de Gleason de 7, alors que la tumeur présentant une expression de HCaRG plus faible a un score de Gleason de 8. Les tumeurs

ayant un score de Gleason de 7 sont un peu plus différenciées que celles ayant un score de 8. Ici, l'expression de HCaRG pourrait corrélérer avec l'état de différenciation des cellules. Le bras long en entier du chromosome 8 présente un nombre de copies plus élevé dans les cancers de la prostate peu différenciés (244). Des gènes situés dans la région 8q sont ainsi amplifiés et ont été associés au cancer de la prostate (245-247). De plus, des aberrations du chromosome 8 et une hypométhylation ont tous deux été associées à ce type de cancer (248). Il sera question de méthylation plus en détails dans les sections 3.7 à 3.9. Une amplification du chromosome 8 peut aussi expliquer la hausse d'expression de HCaRG dans certaines tumeurs gastriques (249-251).

Expression de HCaRG dans les tumeurs de l'estomac

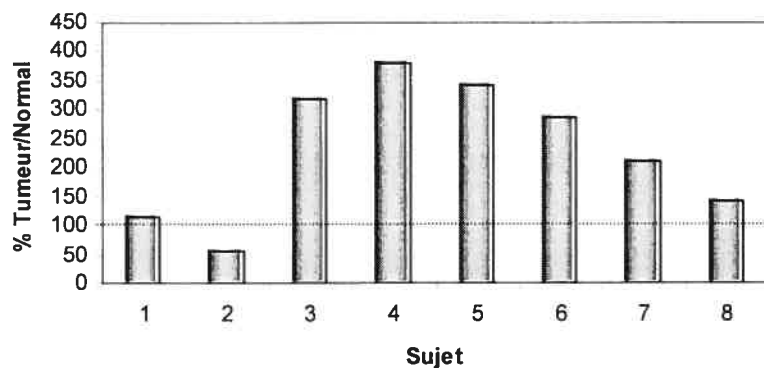


Figure 3.2. Niveaux d'ARNm de HCaRG dans 8 tumeurs de l'estomac.

Au niveau des tumeurs provenant du poumon (figure 3.3), ce qui différencie celle ayant un niveau d'expression de HCaRG plus élevée des deux autres c'est qu'il s'agit d'un adénocarcinome métastatique comparativement à deux carcinomes non-métastatiques. Il est donc difficile de comparer deux types de néoplasmes au niveau de l'expression de HCaRG. Au niveau chromosomique, des gains de 8q ont été dans certains cas associés aux adénocarcinomes et aux carcinomes et proposés comme étant des indicateurs de l'agressivité de la tumeur (252). On pourrait donc penser que l'adénocarcinome métastatique présente un gain de 8q contrairement aux deux carcinomes.

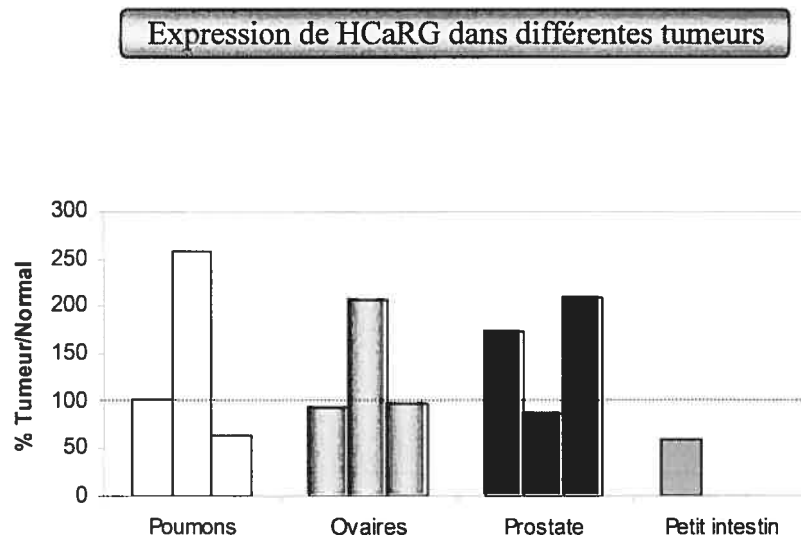
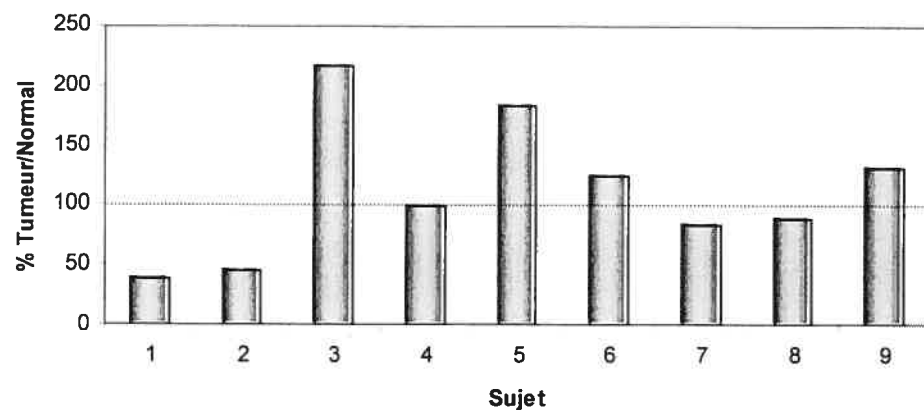


Figure 3.3 Niveaux d'ARNm de HCaRG dans cancers du poumon, des ovaires, de la prostate et du petit intestin.

Dans les tumeurs mammaires, de l'utérus, du rectum ou du côlon, le portrait est plus complexe et l'on ne peut tracer de tendance générale au niveau de l'expression de HCaRG. En effet, comme le démontre les figures 3.4 et 3.5, les niveaux d'ARNm de HCaRG peuvent aussi bien être stables, augmentés ou diminués pour un même organe touché. Si on s'attarde aux tumeurs mammaires (figure 3.4A), les sujets 3, 5, 6, 7 et 9 présentent tous des carcinomes canaux infiltrants. Ce type de tumeur hétérogène est le plus fréquent et 3 architectures sont possibles; bien différenciée avec tubules prédominants, moyennement différenciée et indifférenciée avec une absence de structure glandulaire (243). Bien qu'ayant tendance à être augmentée, l'expression de HCaRG est peut-être dépendante de l'état de différenciation des tumeurs. Cependant, les informations dont nous disposons sur les tissus utilisés ne contiennent pas de détails pertinents à ce sujet. Les autres échantillons présentaient des types de tumeurs variés. Ainsi, le sujet 1 avait une tumeur très peu différenciée, le sujet 2 un carcinome lobulaire invasif, le sujet 4 un carcinome médullaire non-métastatique et le sujet 8 un carcinome mucineux.

Au niveau du cancer du côlon, les niveaux d'expression de HCaRG sont variés. La tumeur du côlon qui présente une surexpression importante de HCaRG (sujet 2 de la figure 3.5) a comme particularité d'avoir formé des métastases au foie et est donc probablement plus agressive que les autres adénocarcinomes (sujets 3 à 11). Les taux d'ARNm de HCaRG les plus faibles ont été mesurés dans la tumeur bénigne (sujet 1).

A) Expression de HCaRG dans les tumeurs mammaires



B) Expression de HCaRG dans les tumeurs de l'utérus

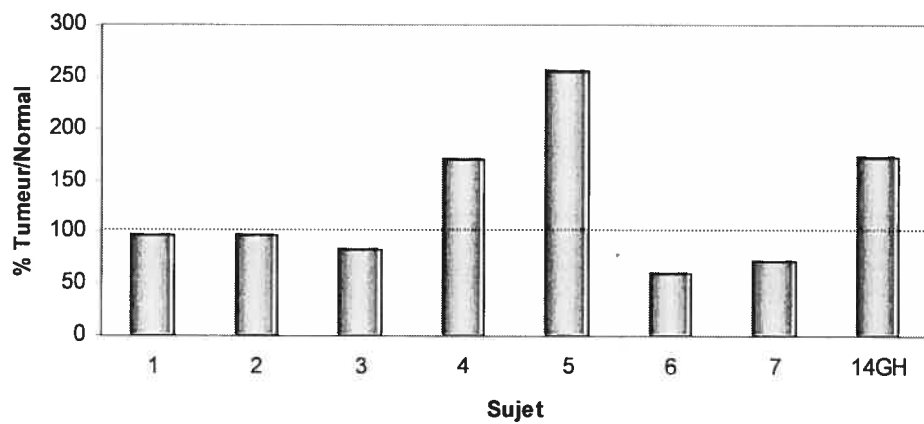


Figure 3.4 Taux d'ARNm de HCaRG dans 9 tumeurs mammaires et 8 cancers utérins.

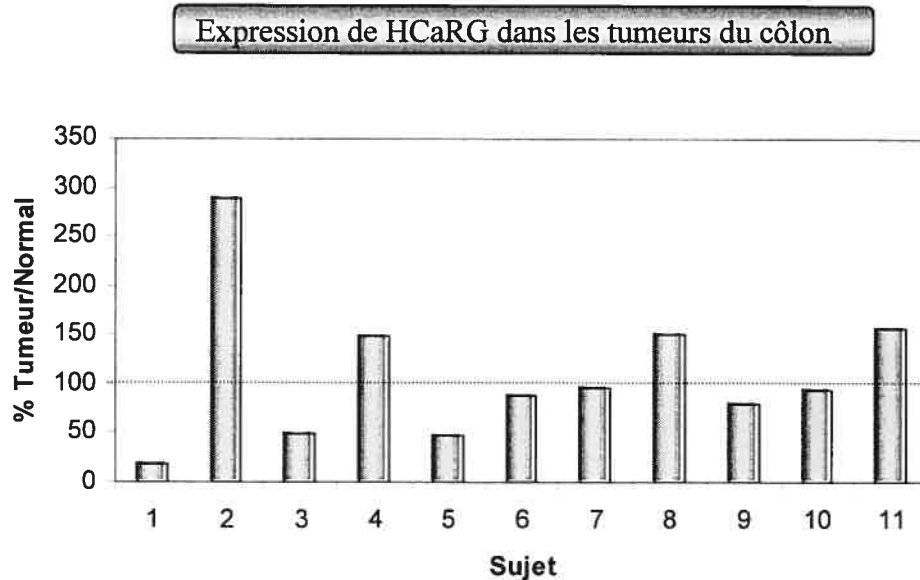


Figure 3.5 Taux d'ARNm de HCaRG dans 11 tumeurs du côlon.

En résumé, au niveau de l'expression de HCaRG dans différentes tumeurs, le tableau est beaucoup plus complexe que ce qu'on supposait. En effet, étant donné les résultats obtenus antérieurement, nous nous attendions à observer une diminution des taux d'ARNm de HCaRG dans la majorité des tumeurs. Or, si c'est vrai pour les néphroblastomes, les autres types de néoplasmes montrent que HCaRG peut aussi être plus exprimé dans les tissus cancéreux.

Il existe plusieurs mécanismes pouvant réguler l'expression d'un gène dans un tissu cancéreux. Un gain du chromosome 8q a été associé à de nombreux types de tumeurs et avec l'agressivité du cancer (252-256). HCaRG étant situé en 8q24, ceci pourrait expliquer que son expression soit élevée dans certains néoplasmes. Dans

ces tumeurs, de par son influence sur la migration cellulaire (voir chapitre 5), HCaRG pourrait être impliqué dans l'agressivité et la formation de métastases. D'autre part, l'hypo ou l'hyperméthylation pourrait être en partie responsable de l'élévation ou de la diminution de l'expression de HCaRG dans les différentes tumeurs (voir section 4.3).

Dans cette étude, les informations fournies par la compagnie (âge, sexe, présence de métastases, classification ICD) n'étaient généralement pas suffisantes pour établir de corrélation entre le niveau d'expression de HCaRG et les caractéristiques individuelles de chaque tumeur. Les résultats obtenus nous démontrent l'importance de poursuivre ces études mais en utilisant des tumeurs bien caractérisées.

3.4 Expression de HCaRG pendant le processus de différenciation des cellules Caco-2

Les Caco-2 sont des cellules humaines dérivées d'un cancer du côlon. C'est un excellent modèle pour l'étude de la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales intestinales. En effet, elles ont la propriété unique de se différencier spontanément en des cellules semblables à des entérocytes lorsqu'elles sont gardées dans des conditions normales de culture (257-259). Ainsi, une fois à confluence, les Caco-2 cessent de proliférer, se différencient et acquièrent même des marqueurs fonctionnels (sucrase isomaltase, alcaline phosphatase) au niveau de la bordure en brosse de la membrane apicale (257). On peut observer trois états de différenciation en culture, soit non-différenciées (sous-confluence), soit une population hétérogène

de cellules polarisées et différenciées (entre 0 et 20 jours post-confluence) ou encore complètement polarisées et différenciées (30 jours post-confluence) (259). Nous avons donc décidé d'utiliser ce modèle pour évaluer le profil d'expression de HCaRG pendant le processus de différenciation cellulaire des Caco-2.

3.5 Méthodologie

Les cellules Caco-2 ont étéensemencées dans des plaques de 6 puits à une densité de 200 000 cellules/puits et gardées dans du milieu MEM/20% FBS/1X P/S. Après 3, 5, 10, 15, 20, 25 et 30 jours de culture, l'ARN a été extrait des cellules et les taux d'ARNm de HCaRG ont été évalués par une hybridation de type dot blot. L'expression de l'alkaline phosphatase (ALKP) a été mesurée par RT-PCR. L'ARNm de GAPDH a aussi été amplifié et utilisé comme contrôle. La température d'hybridation des réactions de PCR était de 56°C et ce, pendant 32 cycles. Les amorces de la réaction de PCR étaient les suivantes :

ALKPS : 5'GGGGTACCACATAACAATGTGGACAGACAGG3'

ALKPAS2 : 5'GGGTCGACCTCTCATTACGTCTGGTCGCA3'

GAPDHS : 5'ATGGTGAAGGTCGGTGTCAACGGA3'

GAPDHAS : 5'GAGCCCTTCCACGATGCCAAAGTTGTCATG3'

L'incorporation en thymidine-³H a aussi été déterminée dans les mêmes conditions selon le protocole établi dans notre laboratoire (203). Chaque expérience a été menée en triplicata.

3.6 Résultats

L'expression de HCaRG dans les cellules Caco-2 est en relation avec l'état prolifératif des cellules pendant le processus de différenciation spontanée. Ainsi, comme démontré par la mesure d'incorporation en thymidine-³H dans l'ADN (figure 3.6A), lorsque les cellules prolifèrent l'expression de HCaRG diminue à son niveau minimal. En parallèle avec la diminution de prolifération et l'établissement d'un phénotype de différenciation, les taux d'ARNm de HCaRG augmentent. L'augmentation des niveaux de l'alkaline phosphatase entre le jour 5 et le jour 30 post-ensemencement montre que les cellules sont bel et bien en voie d'atteindre un phénotype de cellules différenciées (figure 3.6B). On peut supposer que HCaRG soit impliqué dans l'arrêt de prolifération et/ou la différenciation des cellules Caco-2. Il est important de rappeler que les HEK293 surexprimant HCaRG présentent un arrêt de prolifération et acquièrent des caractéristiques de cellules différenciées (203;205).

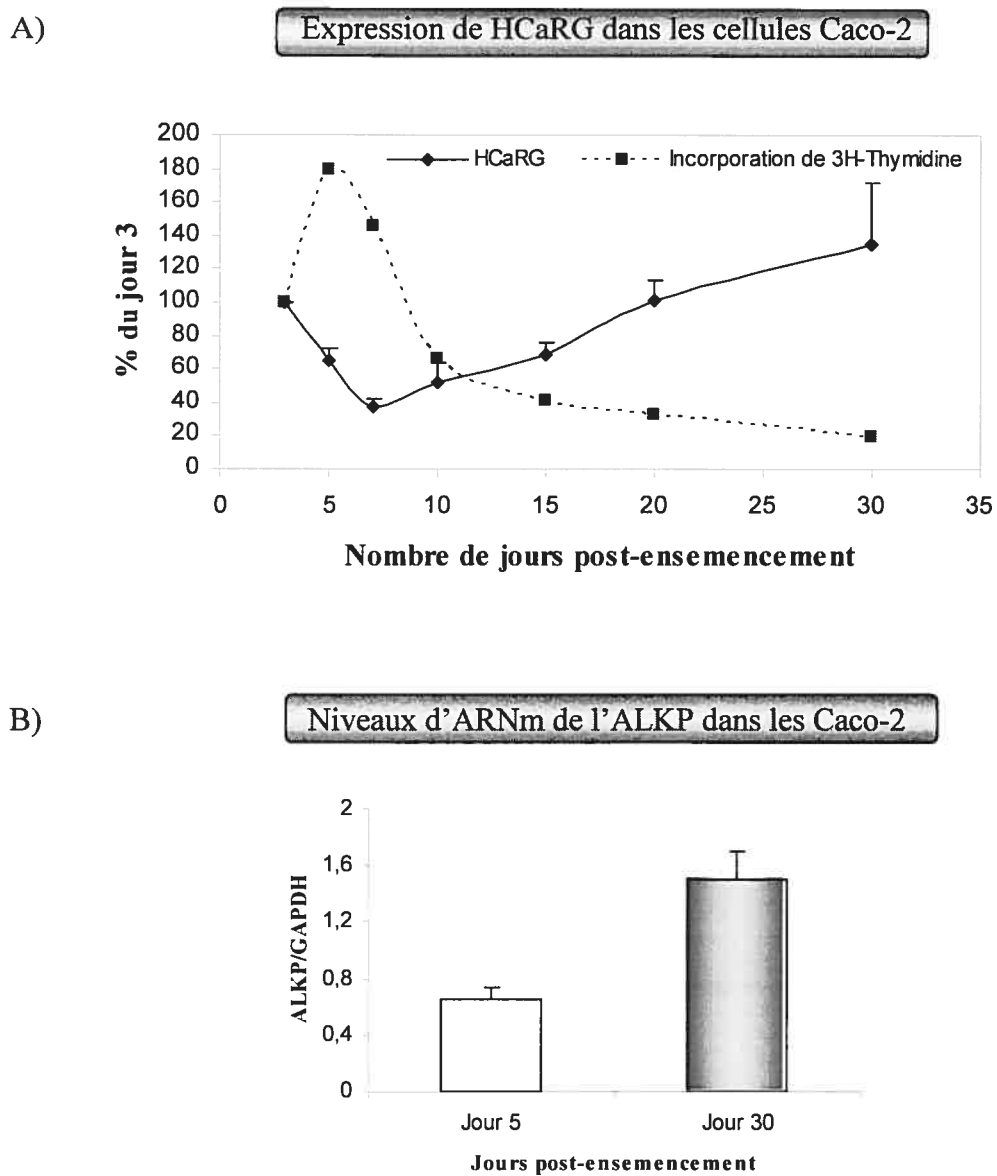


Figure 3.6 A) L'incorporation en thymidine-³H et l'expression de HCaRG ont été mesurées dans les cellules Caco-2 à différents jours post-ensemencement. B) De façon à valider notre modèle de différenciation spontanée des cellules Caco-2, les niveaux d'alkaline phosphatase (ALKP) ont été déterminés après 5 et 30 jours de culture.

3.7 Méthylation

La diminution des niveaux d'ARNm de HCaRG dans les tumeurs rénales nous a amené à nous demander si la méthylation pouvait être un mécanisme important dans le contrôle de l'expression de HCaRG.

3.8 Méthodologie

3.8.1 Détermination d'un îlot CpG

La séquence nucléotidique de HCaRG a été analysée avec le programme "EMBOSS-CPG Plot" (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>) afin d'identifier un îlot CpG.

3.8.2 Modification de l'ADN au bisulfite de sodium et PCR

L'approche utilisée pour déterminer le niveau de méthylation de l'îlot de HCaRG combine un traitement au bisulfite de sodium et des réactions de PCR. L'ADN génomique a d'abord été extrait de reins normaux, de tumeurs rénales ou des cellules HEK293 et Hela avec le phénol-chloroforme. De 2 à 5 µg d'ADN ont ensuite été digérés avec plusieurs enzymes (Hind III, Pst I, Pvu II, Kpn I, BamH I, Bgl II et Xho I) puis purifiés avec le "GFX PCR purification kit" (Amersham Biosciences). Suite à une dénaturation de 30 minutes à 42°C avec 0,3M NaOH, le traitement au bisulfite de sodium (40,5% bisulfite de sodium, 10mM hydroquinone) a été effectué à 55°C pendant 16 heures à la noirceur. L'ADN traité a été purifié avec le kit Qiaex II (Qiagen), dénaturé pendant 30 minutes à 37°C avec 0,3M NaOH, neutralisé avec 3M d'acétate d'ammonium pH 7,0, précipité avec de l'éthanol et enfin resuspendu dans 20 µL d'eau. Pendant le traitement de l'ADN avec le bisulfite de sodium, les

cytosines non-méthylées sont désaminées et converties en uraciles alors que les 5-méthylcytosines demeurent inchangées (figure 3.7). La séquence d'ADN traité étant différente selon l'état de méthylation de l'ADN, des amorces de PCR spécifiques peuvent être synthétisées (figure 3.8).

Modification de l'ADN avec le bisulfite de sodium

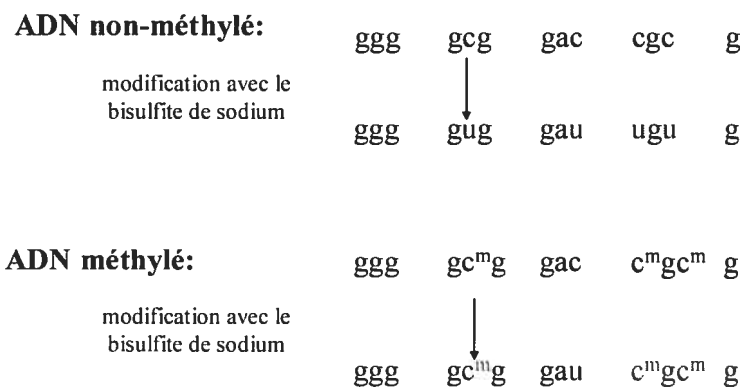


Figure 3.7 Réaction au bisulfite de sodium. La séquence d'ADN sera différente si au départ celui-ci était méthylé ou non.

L'amplification de 2,5 uL d'ADN traité s'effectue en deux étapes de PCR, la première avec les amorces méthyl sens B (5'TTA TGG TAA AGT ATA TGT TAA ATA AAA TGG 3') et méthyl AS (5'TCC TAT CCT CAA AAC ACT TAT CAA

ACC ACT 3') et la deuxième avec les amorces méthyl sens (5'GTT AGG GTT TAA TAG TGT AGT TTA AAG T 3') et méthyl ASB (5'CAA AAA CTC CTT CCC ACT CCA AAA AAC CAT 3') (figure 3.8). Lors du second PCR 5uL de la première amplification sont utilisés et les paramètres des deux réactions sont les suivants : (94°C/3 min); (94°C/15 sec; 60°C/15sec; 72°C/1min20); (72°C/6 min). Le produit de la deuxième amplification est mis sur gel d'agarose et le fragment de 930 pb est purifié avec Qiaex II (Qiagen). Le séquençage s'effectue avec l'amorce méthyl sens ou méthyl ASB et la Sequenase version 2.0 selon les directives du manufacturier (United States Biochemical, Cleveland, U.S.A.) et mis sur gel d'Acrylamide 8%/urée 7M.

3.9 Résultats

3.9.1 Identification d'une région potentiellement méthylée

Une séquence nucléotidique de 3834 pb contenant le gène codant pour HCaRG de même qu'une partie de sa région 5'UTR a été analysée avec le programme "EMBOSS-CPG Plot" afin de déterminer si elle contenait un îlot CpG (260). Selon les critères du programme pour définir un îlot CpG, celui-ci doit avoir une séquence d'au moins 200pb contenant un pourcentage de CG supérieur à 50% et un ratio de CpG observés/CpG attendus plus grand que 0,6. En tenant compte de ces paramètres, nous avons identifié un îlot CpG pour le gène de HCaRG. Cet îlot a une longueur de 997pb, un contenu en CG de 68,3% et une valeur de CpG observés/CpG attendus de 0,91. Comme le montre la figure 3.8, l'îlot CpG de HCaRG comprend

une partie de la région 5'UTR, le premier exon et une partie du premier intron du gène.

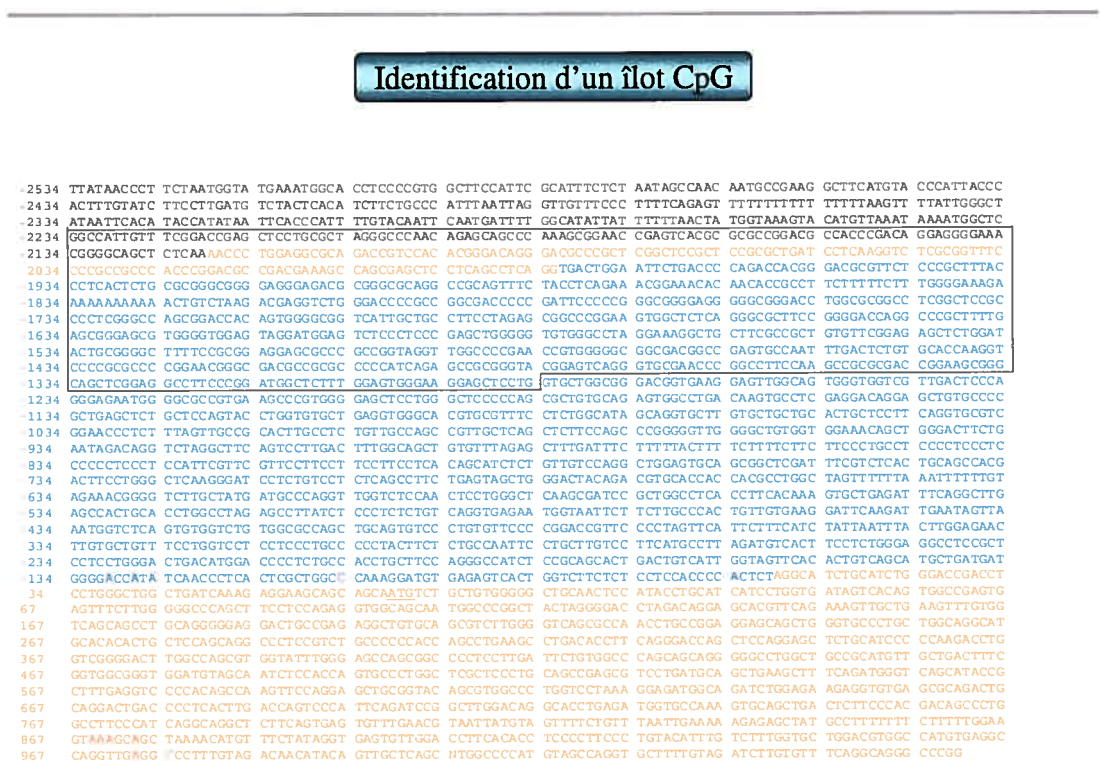


Figure 3.8. Région de HCARG potentiellement méthylée. L'îlot CpG est encadré alors que les bases en noires font partie de la région 5'UTR, les bases en rouges de l'exon et celles en bleues du premier intron.

3.9.2 Analyse de l'îlot CpG de HCARG

Suite au séquençage des produits de PCR obtenus de l'ADN modifié au bisulfite de sodium, des résultats préliminaires ont été obtenus. Ainsi, plusieurs sites potentiels de méthylation des cytosines dans un contexte CpG ont été identifiés. La majorité de

ces sites sont situés entre les bases -1900 et -2160 et les bases -1500 et -1560pb. Les sites ayant été retrouvés autant dans l'ADN des cellules HEK293 que dans celui d'une tumeur rénale (deux échantillons présentant une faible expression de HCaRG) sont identifiés dans le tableau 3.I. Dans certains cas, ces dinucléotides CpG méthylés sont situés dans des sites de liaison pour le facteur de transcription Sp1 à l'intérieur de l'intron. Or, la méthylation des sites de liaison pour le facteur Sp1 a déjà été associée à la répression transcriptionnelle des gènes (261;262).

CpG potentiellement méthylés

Position	Région	Facteur de transcription
-2160pb	5'UTR	Aucun
-2041pb	Exon 1	Aucun
-2001pb	Exon 1	Aucun
-1918pb	Intron 1	Sp1
-1530pb	Intron 1	Sp1
-1519pb	Intron 1	Sp1
-1502	Intron 1	Sp1

Tableau 3.I Position des CpG potentiellement méthylés. La localisation réfère à la séquence de la figure 3.8.

Bien que ces résultats ne soient que préliminaires, on peut supposer que l'hyperméthylation de l'îlot CpG de HCaRG puisse en partie expliquer le faible niveau d'expression de HCaRG dans certaines tumeurs. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudra analyser plus d'échantillons d'ADN provenant de reins normaux et de néphroblastomes. Une autre possibilité consiste à incuber des cellules exprimant peu HCaRG avec un agent déméthylant (le 5-azacytidine) et de mesurer les taux d'ARNm du gène suite au traitement.

Chapitre 4

**Effet de HCaRG sur l'expression
des gènes: une analyse par
microarray**

4.0 Introduction du chapitre

Des études de macroarray et des hybridations de types Western nous avaient permis de démontrer que la surexpression de HCaRG dans les cellules HEK293 influençait l'expression de plusieurs gènes et protéines (205). Cependant, la quantité de gènes étudiés étant limitée, nous avons décidé d'utiliser la technique de microarray. Les prochaines lignes seront consacrées à l'analyse des résultats obtenus. Nous aurons d'abord un aperçu général de l'effet de HCaRG sur l'expression des gènes et ensuite de façon plus spécifique, ce qui signifie que les gènes dont l'expression est modifiée seront regroupés par fonction cellulaire. Certains gènes peuvent évidemment être impliqués dans plusieurs fonctions mais par soucis de concision seulement une fonction principale sera décrite pour chaque gène. Il est important de noter ici que seulement les gènes dont l'expression a été modulée au moins 1,8 fois seront considérés dans l'analyse, ce qui n'exclut pas la possibilité que d'autres gènes importants puissent être ignorés dans cette analyse.

4.1 Méthodologie

4.1.1 Établissement de lignées cellulaires stables

Les analyses d'expression ont été effectuées à partir de lignées cellulaires stables produites antérieurement dans notre laboratoire (203). Brièvement, les cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide contrôle pcDNA/Neo ou avec le plasmide contenant HCaRG en utilisant la méthode de co-précipitation avec le calcium phosphate. Les transfectants stables ont été sélectionnés par leur résistance à la présence de 400ug/ml de G418. Le clone exprimant les plus hauts niveaux de

HCaRG (HCaRG 9) et le clone contrôle transfecté avec le vecteur seul (Neo1) ont été utilisés dans cette expérience.

4.1.2 Étude du profil d'expression en utilisant des biopuces

Nous avons identifié les gènes exprimés de façon différente entre le clone Neo1 et le clone HCaRG 9 en utilisant le système de puces (GeneChips) de Affymetrix. Les cellules Neo 1 et HCaRG 9 ont été synchronisées puis gardées en culture pendant 48h en présence de 10% FBS. L'ARN total a été extrait avec le mini RNeasy kit de Qiagen selon les directives du manufacturier. L'ARNc a été amplifié et biotinylé, pour être ensuite hybridé aux puces Affymetrix Human U133 selon les directives du manufacturier. Après l'hybridation, les puces ont été lavées puis scannées. Les données ont d'abord été évaluées par le programme GCOS 1.1 (Affymetrix) puis par GeneSifter. L'expérience a été effectuée à une seule reprise.

4.2 Résultats

4.2.1 Analyse générale des résultats

Des 22 283 sondes que contenaient les puces à ADN, 51% étaient qualifiées de présentes et 47,3% étaient absentes des cellules Neo1. Le patron est sensiblement le même pour les cellules HCaRG9 puisque 50,6% des sondes étaient présentes alors que 47,8% étaient absentes. Le graphique de la figure 4.1 montre un exemple d'analyse des puces et représente les différences d'expression entre la puce hybridée à partir de l'ARN des cellules Néo1 et celui des cellules HCaRG9. On retrouve 123 gènes dont l'expression est augmentée d'au moins 2X dans les cellules HCaRG9

comparativement aux Neo1 et 28 gènes dont l'expression est diminuée. Si l'on diminue la différence d'expression en prenant les gènes dont l'expression est modulée d'au moins 1,8X on en retrouve alors 177 augmentés et 41 diminués.

Parmi les gènes modulés au moins 2 fois, on en retrouve 41% impliqués dans la croissance cellulaire et/ou la maintenance (transport, croissance, prolifération, organisation cellulaire, homéostasie), 35% dans la communication cellulaire (transduction de signal, adhésion, signalisation cellule-cellule), 7,5% dans la mort cellulaire (apoptose), 7,5% dans la motilité (migration, contraction musculaire), 4,6% dans la régulation des processus cellulaires (régulation de la croissance et de la prolifération), 0,6% dans la différenciation et 0,6% dans la fusion membranaire (figure 4.2).

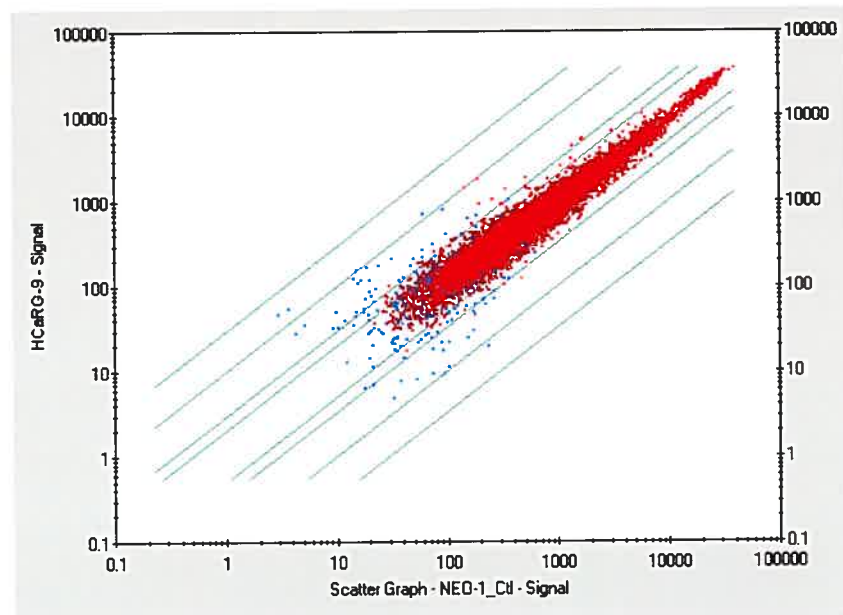
Graphique des gènes modulés au moins 2X entre les lignées cellulaires

Figure 4.1 Représentation des gènes dont l'expression est modulée au moins 2X entre les cellules Neo1 et HCaRG9. En rouge on retrouve les gènes qualifiés de présents alors que les points bleus représentent les gènes présents dans une des lignées cellulaires et absents dans l'autre.

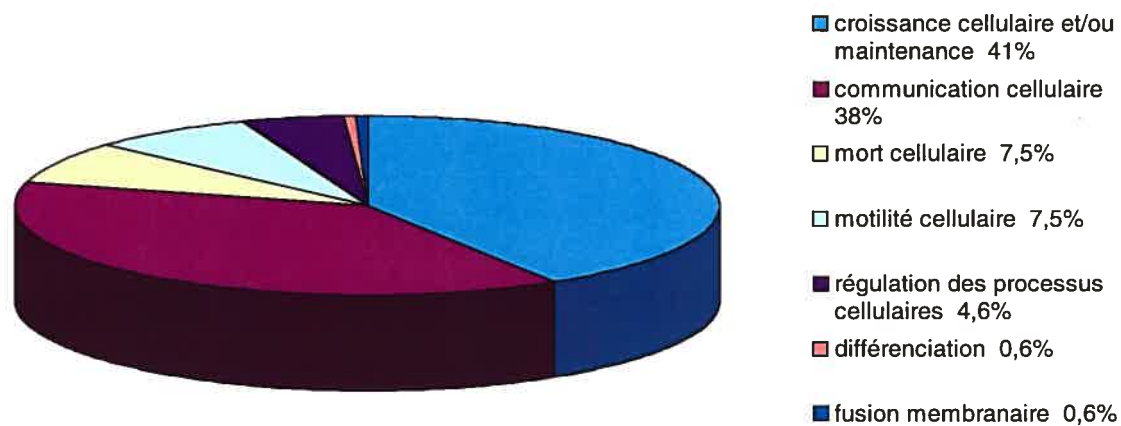
Division des gènes selon leur fonction cellulaire

Figure 4.2. Les gènes modulés au moins 2 fois dans les cellules HCaRG9 sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires.

4.4.2 Analyse spécifique des gènes dont l'expression est modulée par HCaRG

Voyons maintenant de façon plus spécifique le rôle de certains gènes dont l'expression se trouve modifiée dans les cellules HEK293 transfectées avec HCaRG.

Calcium

Plusieurs gènes ayant une fonction dans l'homéostasie calcique et/ou le transport du calcium sont modulés par la surexpression de HCaRG (tableau 4.I). Parmi ces gènes, on retrouve 3 pompes Ca^{2+} -ATPase de classes différentes, soient ATP2C1, ATP2B1 et ATP2A2.

Modulation des gènes liés au calcium

Gènes	Numéro NCBI	Expression	Fonction principale
ATP2C1 (ATPase, transport du Ca^{2+} , type 2C, membre 1)	AF225981	↑ 3,8	Homéostasie calcique
ATP2B1, PMCA1, (ATPase, transport du Ca^{2+} , membrane plasmique 1)	M95541	↑ 2,2	Transport du Ca^{2+}
ATP2A2, SERCA2, (cation ATPase, cardiac muscle slow twitch2)	NM_170665	↑ 1,8	Transport du Ca^{2+}

Tableau 4.I Tableau des gènes impliqués dans l'homéostasie calcique dont l'expression est augmentée dans les cellules surexprimant HCaRG.

ATP2C1 (ou PMR1) est une pompe Ca^{2+} -ATPase localisée au niveau de l'appareil de Golgi. Elle est essentielle à l'emmagasiner du calcium et est impliquée dans la sécrétion (263;264).

De son côté, la pompe Ca^{2+} -ATPase membranaire ATP2B1 (ou PMCA1) joue un rôle critique dans le maintien et le rétablissement de la concentration calcique intracellulaire. Sa fonction est de transporter le calcium vers l'extérieur de la cellule pendant le processus de transport transcellulaire (265). PMCA1 est ubiquitaire et on la retrouve entre autre en grande quantité à la membrane basolatérale des cellules épithéliales dans les tubules distaux du rein (266;267). Le transport transcellulaire du calcium est aussi présent au niveau de l'intestin et PMCA1 y serait important pour l'absorption du calcium (268).

La pompe ATP2A2 (ou SERCA2) est quant à elle localisée au niveau du réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique. Elle contribue au maintien d'un niveau de Ca^{2+} cytosolique faible en transportant le Ca^{2+} du cytosol vers le réticulum endo/sarcoplasmique (269).

L'expression de trois pompes Ca^{2+} -ATPase ayant des localisations subcellulaires différentes est augmentée dans les cellules surexprimant HCaRG. Or, l'expression de HCaRG est elle-même sous le contrôle négatif du calcium extracellulaire. Nous proposons donc l'hypothèse suivante (figure 4.3) : Lorsque la balance calcique est négative, l'expression de HCaRG augmente. HCaRG à son tour augmente

l'expression des pompes calciques ATP1C1, ATP2B1 et ATP2A2 de façon à rétablir un équilibre calcique normal. Ceci suggère donc un rôle pour HCaRG dans le maintien de l'homéostasie calcique.

Action de HCaRG sur l'homéostasie calcique

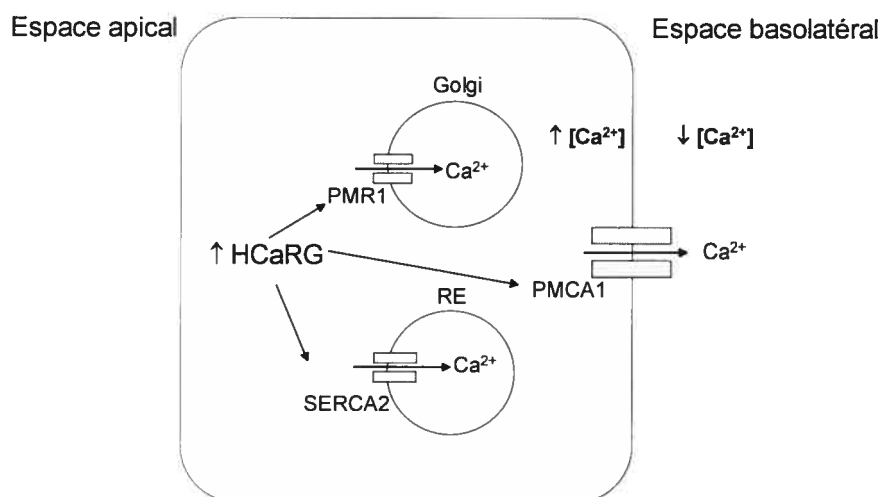


Figure 4.3 Implication de HCaRG dans l'homéostasie calcique. La surexpression de HCaRG amène une augmentation des niveaux d'ARNm des pompes PMR1, PMCA1 et SERCA2. Les actions de ces trois pompes viseraient à rétablir l'homéostasie calcique perturbée par une concentration de calcium intracellulaire élevée en présence d'une concentration extracellulaire faible. RE : reticulum endoplasmique

Ions

En plus des pompes Ca^{2+} -ATPases, d'autres gènes liés au transport d'ions sont aussi augmentés dans les cellules surexprimant HCaRG (tableau 4.II). On retrouve donc le gène codant pour la protéine hypothétique FLJ12242, une protéine potentiellement impliquée dans le transport du potassium. Le gène de TWIK-1 voit aussi son expression être plus élevée dans les cellules HCaRG9. TWIK-1 est un canal K^+ exprimé dans le cerveau mais aussi dans les poumons, le muscle squelettique, le colon et le rein (270). L'ouverture de TWIK-1 est peu dépendante du potentiel et serait donc important pour la perméabilité potassique basale qui permet le maintien du potentiel membranaire de repos (271). Au niveau du rein, TWIK-1 est retrouvé à la membrane apicale dans les tubules contournés proximaux où son action viserait à maintenir le potentiel négatif des cellules des tubules ou à réguler le volume cellulaire (272). On le retrouve aussi dans la portion ascendante large de l'anse de Henle (corticale et médullaire) et dans la médulla du tubule collecteur avec une localisation apicale et intracellulaire. Sa présence dans la médulla du tubule collecteur suggère qu'il ait un rôle dans l'ajustement final du K^+ sécrété dans l'urine (270). HCaRG participerait donc au maintien de l'homéostasie des ions calciques et potassiques.

Modulation des gènes liés à l'homéostasie ou au transport ionique

Gènes	Numéro NCBI	Expression	Fonction principale
ATP2C1 (ATPase, transport du Ca ²⁺ , type 2C, membre 1)	AF225981	↑ 3,8	Homéostasie calcique
Protéine hypothétique FLJ12242	NM_024681	↑ 7,3	Transport du K ⁺
ATP2B1, PMCA1, (ATPase, transport du Ca ²⁺ , membrane plasmique 1)	M95541	↑ 2,2	Transport du Ca ²⁺
Canal K ⁺ , sous-famille K, membre 1 (TWIK-1)	NM_002245	↑ 1,9	Transport du K ⁺
ATP2A2, SERCA2, (cation ATPase, cardiac muscle slow twitch2)	AK000300	↑ 1,8	Transport du Ca ²⁺

Tableau 4.II Gènes impliqués dans le transport ionique dont l'expression est augmentée dans les cellules surexprimant HCaRG.

Cycle cellulaire

Les cellules surexprimant HCaRG diminuent leur prolifération et s'accumulent en phases G2/M du cycle cellulaire (203;205). Nous nous attendions donc à ce que l'analyse du microarray nous montre une modification au niveau de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (tableau 4.III). Le cycle cellulaire peut être divisé en quatre phases, G1, S, G2 et M. La phase G1 (de "gap" intervalle) est une étape de préparation à la phase S pendant laquelle l'ADN est répliqué. La phase G2 précède quant à elle la phase M ou mitose. La succession de chacune des phases est étroitement contrôlée et chacune d'elles peut être bloquée en cas d'anomalie. Les CDKs (cyclin-dependent kinases) sont très importantes dans le contrôle du cycle cellulaire. Les CDKs sont des sous-unités catalytiques mais qui sont actives seulement lorsqu'elles sont associées à des sous-unités régulatrices, les cyclines. Il existe plusieurs CDKs et cyclines. À chaque phase du cycle, un complexe différent de CDK/cycline est impliqué. Des inhibiteurs protéiques de la famille INK4 (p15, p16, 18) ou CIP/KIP (ex : p21, p27) peuvent se fixer aux complexes et les inactiver (273).

Le résultat de microarray est en accord avec celui déjà obtenu en macroarray qui avait démontré une augmentation de p21 dans les cellules HCaRG9. Cette augmentation de p21 avait d'ailleurs été confirmée au niveau protéique par une hybridation de type western (205). p21 est un inhibiteur universel de l'activité des complexes cycline/CDK et est associé à un arrêt de prolifération cellulaire (274). La progression des cellules de la phase G2 à la phase M est dépendante de l'activité du

complexe cyclineB1/Cdc2 (275). L'induction de p21 mène à l'inhibition de Cdc2 et à un arrêt des cellules en G2 (276). Des études ont aussi montré qu'en plus de p53, p21 était essentiel au maintien de l'arrêt en G2 suite à un dommage à l'ADN (277). GADD45B, un autre gène associé à un arrêt des cellules en G2 causé par des lésions à l'ADN, se trouve aussi augmenté dans les cellules HCaRG9 (222). La surexpression de GADD45B amène une diminution de prolifération de plusieurs lignées de cellules tumorales (278).

Les niveaux de cycline A augmentent au début de la phase S et demeurent élevés jusqu'au début de la mitose. Le complexe Cdc2/cycline A est actif en G2 mais son rôle est encore inconnu (243). La cycline A voit ses niveaux d'ARNm augmentés de 3,5 fois dans les cellules HCaRG9.

La ségrégation des chromosomes est un événement clé lors de la mitose et une de ses protéines régulatrices est la mitosine, augmentée 4,9 fois dans les cellules HCaRG9. La mitosine est une protéine régulée pendant le cycle cellulaire dont l'expression atteint son niveau maximal en G2M puis est dégradée rapidement après la mitose (279;280). La mitosine est transportée des kinétochores aux pôles des fuseaux mitotiques par une protéine motrice, la dynéine cytoplasmique (augmentée 2 fois dans HCaRG9). La mitosine aurait un rôle de contrôle de qualité (checkpoint) au niveau du fuseau mitotique (281). Un autre gène important pour la phase mitotique, l'APC (adenomatosis polyposis coli), est augmenté de 2,9 fois dans les cellules surexprimant HCaRG. L'APC lie et stabilise les microtubules pendant la mitose

(282;283). En régulant l'attachement de l'extrémité "plus" des microtubules, il devient important pour la fidélité de la ségrégation chromosomique. Des mutations du gène codant pour APC ont été associées à l'instabilité chromosomique et aux anomalies mitotiques observées dans le cancer colorectal (284).

Il n'est pas surprenant de noter une diminution de l'ordre de 7,5 fois du gène codant pour p15, un inhibiteur des protéines kinases dépendantes des cyclines, CDK4 et CDK6. En effet, p15 contrôle la progression de la phase G1 du cycle cellulaire et l'augmentation de son expression induit un arrêt des cellules en G1 (285). Un autre gène dont la fonction est d'amener un arrêt en G1, soit p27, voit aussi son expression diminuée dans les cellules HCaRG9 (205). La figure 4.4 résume l'effet sur le cycle cellulaire des gènes modulés par HCaRG.

Modulation des gènes liés au cycle cellulaire

Gènes	Numéro NCBI	Expression	Principale fonction
Centromère F (mitosine)	NM_016343	↑ 4,9	Ségrégation des chromosomes
Cycline A	NM_003914	↑ 3,5	Rôle en S et G2
Annexine A1	NM_000700	↑ 3,5	Prolifération/Différenciation
GADD45B	NM_015675	↑ 3,2	Arrêt prolifération
APC (adenomatosis polyposis coli)	S67788	↑ 2,9	Stabilisation des microtubules
p21	NM_000389	↑ 2,1	Arrêt en G2
Dynéine	NM_004411	↑ 2,0	Transport au niveau des microtubules
p15	NM_004936	↓ 7,5	Arrêt en G1

Tableau 4.III Gènes impliqués dans le cycle cellulaire dont l'expression est modulée par la surexpression de HCaRG

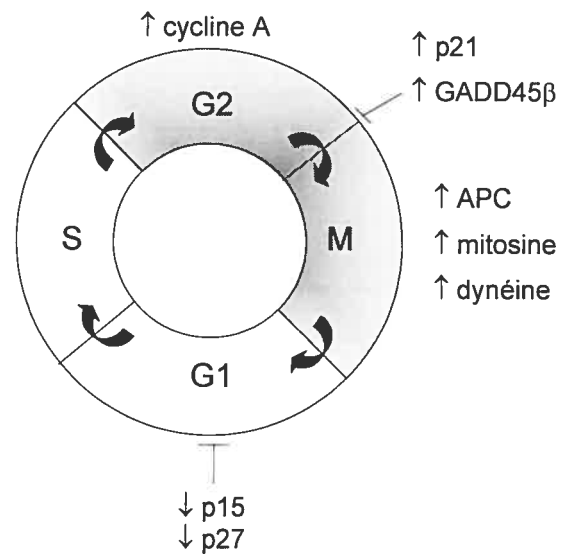
Effet de HCaRG sur le cycle cellulaire

Figure 4.4 Implication de HCaRG sur le cycle cellulaire. La surexpression de HCaRG amène un arrêt des cellules en phase G2/M du cycle cellulaire. Cet arrêt est associé à la modulation de l'expression de gènes ayant des rôles dans différentes phases du cycle.

Adhésion cellulaire

Les cadhérines représentent une superfamille de molécules responsables de l'adhésion cellule-cellule dépendante du calcium. Cette superfamille comprend les cadhérines classiques, les cadhérines desmosomales et les protocadhérines. La jonction cellule-cellule s'effectue via des domaines extracellulaires identiques présents sur deux cellules voisines. La stabilité de la jonction est assurée par la liaison du domaine intracellulaire des cadhérines avec le cytosquelette d'actine (286). Dans l'épithélium, les cadhérines sont essentielles à l'établissement et au maintien de la polarité cellulaire, de la morphogénèse des tissus épithéliaux et à la prolifération (287;288). Une diminution du niveau d'expression des cadhérines E- (épithélial) et P- (placentaire) a été associée au développement de tumeurs et à la formation de métastases (289-291). De plus, l'expression inappropriée de cadhérines non-épithéliales par des cellules épithéliales a été observée entre autres dans des lignées cellulaires de cancers de la prostate et du sein (292;293). Les cadhérines non-épithéliales exprimées dans les tumeurs sont généralement les deux cadhérines mésenchymales, soit la N-cadhérine (neuronale) et la cadhérine-11. Ainsi, l'expression de la N-cadhérine ou de la cadhérine-11 stimule la migration, l'invasion et le développement de métastases des cellules de carcinome mammaire et de la prostate (292-294). Il semble que ces cadhérines aient la capacité de promouvoir un état dynamique d'adhésion permettant l'attachement et le détachement des cellules (294). Il existe donc plusieurs types de cadhérines avec des propriétés variées qui peuvent être exprimées dans différents tissus. C'est le

changement d'expression de ces cadhérines qui semble jouer un rôle important dans le développement de métastases.

La surexpression de HCaRG dans les cellules HEK293 a mené à l'augmentation de l'expression de 3 membres de la superfamille des cadhérines, soit la protocadhérine 8 (PCDH8) et les cadhérines 10 et 11 (tableau 4.IV). L'adhésion cellulaire par les protocadhérines est généralement modérée et est fréquemment indépendante du calcium (295). Jusqu'à maintenant, l'expression de la PCDH8 a été observée au niveau du cerveau seulement (296). Dans les cellules HEK293, la présence d'ARNm de PCDH8 a été détectée seulement dans les clones HCaRG9. La surexpression de HCaRG a donc permis l'expression de la PCDH8.

Les cadhérines 10 et 11 font partie du type II des cadhérines classiques et permettent une faible adhésion entre les cellules (297-299). La cadhérine-10 est exprimé dans le cerveau et dans le rein ainsi qu'en faible quantité dans la prostate et dans le poumon fétal (300). De son côté la cadhérine-11 est exprimée dans plusieurs organes dont le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, les os et les tubules rénaux (301-303). Des rôles très différents lui ont été attribués, dont un dans la formation de cancers et l'autre dans la différenciation des ostéoblastes (292;293;303;304).

Les niveaux du gène EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) sont augmentés de 3 fois dans les cellules HCaRG9. EpCAM est retrouvé à la membrane basolatérale

de la majorité des tissus épithéliaux. Il permet l'adhésion intercellulaire indépendamment du calcium (305). EpCAM semble être surexprimé dans la majorité des carcinomes épithéliaux dont les cancers colorectaux, mammaires, hépatiques et prostatiques (306-309). L'expression de EpCAM diminue l'adhésion médiée entre autres par la E-cadhérine, ce qui peut expliquer son association avec l'invasion et la formation de métastases dans les carcinomes épithéliaux (310).

Les niveaux d'ARNm du précurseur de la fibronectine et de la fibronectine elle-même sont augmentés dans les cellules HCaRG9. Le rôle de la fibronectine est d'attacher les cellules à la matrice extracellulaire (MEC) (141). La fibronectine a été associée à l'augmentation de la migration de plusieurs types de cellules (311-313). Sa relation avec HCaRG, ainsi que celle de la galectine-1 seront discutées dans le manuscrit présenté dans le chapitre 5 de ce travail.

Modulation des gènes liés à l'adhésion cellulaire

Gènes	Numéro NCBI	Expression	Fonction principale
Protocadhérine 8	NM_002590	↑ 13,0	Adhésion cellule-cellule
Galectine 1	NM_002305	↑ 6,1	Interactions cellule-cellule et cellule-matrice
EpCAM	NM_002354	↑ 3,0	Adhésion cellule-cellule
Fibronectine	AF130095	↑ 2,8	Adhésion cellule-MEC
Précurseur de la fibronectine	X02761	↑ 2,6	
Cadhérine 10, type 2	NM_006727	↑ 2,3	Adhésion cellule-cellule dépendante du Ca ²⁺
Cadhérine 11, type 2, OB- cadhérine (ostéoblaste)	D21254	↑ 2,1	Adhésion cellule-cellule dépendante du Ca ²⁺

Tableau 4.IV Gènes impliqués dans le processus d'adhésion cellulaire dont l'expression est modulée par la surexpression de HCaRG.

Migration cellulaire

Dans le manuscrit présenté dans le prochain chapitre de cette thèse, un modèle est proposé pour expliquer l'effet de HCaRG sur la migration cellulaire. Un tableau montrant les modifications au niveau de l'expression de différents gènes impliqués dans la migration cellulaire est inclus. Cependant, des gènes absents du modèle proposé sont aussi modulés dans les cellules surexprimant HCaRG et leur implication dans le phénotype migratoire de ces cellules ne peut être exclus (tableau 4.V).

Modulation des gènes impliqués dans la migration cellulaire

Gènes	Numéro NCBI	Expression	Principale fonction
L-plastine	J02923	↑ 12,2	Interaction avec l'actine
R-Ras	NM_006270	↑ 1,9	Stimule la migration via l'adhésion focale

Tableau 4.V Gènes impliqués dans la migration cellulaire dont l'expression est modulée par la surexpression de HCaRG.

L'expression de la L-plastine est augmentée de 12,2 fois dans les cellules surexprimant HCaRG. En fait, les niveaux d'ARNm de la L-plastine étaient tellement faibles dans les cellules Neo que l'on peut considérer le gène comme étant non-exprimé dans ces cellules. La L-plastine fait partie de la famille des plastines, une famille de protéines se liant à l'actine. Habituellement, la L-plastine est exprimée seulement dans les cellules hématopoïétiques. Cependant, son expression a aussi été trouvée dans des cellules malignes d'origine non-hématopoïétique (314;315). Par exemple, les cancers ovariens et mammaires présentent des niveaux élevés de L-plastine alors que les cellules épithéliales mammaires normales expriment seulement la T-plastine. Le fait que l'expression de la L-plastine accompagne la transformation néoplasique n'est pas surprenant puisque les cellules qui forment des tumeurs subissent des changements phénotypiques qui incluent des modifications au niveau de l'organisation du cytosquelette (316). De son côté, R-Ras est une petite GTPase qui favorise la formation d'adhésion focale et la migration cellulaire (317-319).

Chapitre 5

Manuscrit

HCaRG Increases Renal Cell Migration by an Internal TGF- α Autocrine Loop mechanism

Sandra Tremblay^{1*}, Carlos El Hader^{1*§}, Nicolas Solban^{*}, Denis Gingras^φ, Richard Béliveau^φ, Sergei N. Orlov^{*}, Pavel Hamet^φ, and Johanne Tremblay^{*}

^{*}Laboratory of Cellular Biology of Hypertension and ^φLaboratory of Molecular Medicine, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), ^φLaboratory of Molecular Medicine, Hôpital Sainte-Justine-Université du Québec à Montréal, and [§]Division of Experimental Medicine, McGill University, Montreal, Quebec, Canada

Soumis au *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2005

Résumé du manuscrit

Dans nos études antérieures, nous avons montré que HCaRG était impliqué dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules rénales (203;205). Le cinquième chapitre de cette thèse contient un manuscrit qui présente les études effectuées afin de déterminer si HCaRG jouait un rôle dans la réparation du rein. Pour ce faire, nous avons poursuivi les études portant sur la fonction cellulaire de HCaRG en évaluant son effet sur la migration cellulaire.

Nous avons comparé la migration de deux lignées de cellules rénales (HEK 293 et MDCK-C7) transfectées de façon stable avec un plasmide seul ou un plasmide contenant l'ADNc de HCaRG. Les cellules HEK 293 surexprimant HCaRG migrent plus rapidement que les cellules contrôles et présentent une meilleure adhésion à la matrice extracellulaire. Une augmentation du potentiel migratoire a aussi été observée dans les cellules MDCK-C7 surexprimant HCaRG. La surexpression de HCaRG a induit des changements morphologiques majeurs aux cellules HEK 293, incluant la formation de lamellipodes. Les analyses d'expression en microarray des cellules HEK 293 transfectées avec HCaRG nous ont révélé l'augmentation de l'expression plusieurs gènes impliqués dans la migration et la formation de lamellipodes, dont le TGF- α (transforming growth factor-alpha), la galectine, l'autotaxine et la fibronectine. Ces cellules montrent une augmentation de la synthèse et de la sécrétion de TGF- α . Le milieu conditionné des cellules surexprimant HCaRG a stimulé la migration et a induit des changements phénotypiques aux cellules contrôles en partie via l'activation du récepteur de TGF-

α /EGF. L'ensemble de ces résultats supporte la possibilité que HCaRG ait un rôle dans la réparation rénale suite à une lésion grâce à son effet sur la migration des cellules rénales et la sécrétion de TGF- α .

Mots clés : HCaRG, cell migration, TGF- α , kidney

ABSTRACT

We have shown previously that hypertension-related calcium-regulated gene (HCaRG) is involved in the control of renal cell proliferation and differentiation. To determine whether HCaRG plays a role in kidney repair after injury, we extended our studies on the cellular function of HCaRG by comparing cell migration of two kidney cell lines (HEK 293 and MDCK-C7) stably transfected with the plasmid alone or with a plasmid containing HCaRG cDNA. HCaRG expressing HEK 293 cells, which undergo lower proliferation, migrated faster than control cells and presented greater adhesiveness to the extracellular matrix. Faster migration was also observed for the MDCK-C7 cells, after stably transfecting them with HCaRG cDNA. HCaRG overexpression induced major morphological changes of HEK293 cells, including the formation of lamellipodia. Expression microarrays of HCaRG-expressing HEK293 cells revealed the elevated expression of several genes known to be involved in cell migration and lamellipodia formation, including transforming growth factor- α (TGF- α), galectins, autotaxins and fibronectin. These cells exhibited augmented synthesis and release of activated TGF- α . Conditioned medium from HCaRG-expressing cells stimulated the migration and induced significant morphological changes of control cells in part through activation of the TGF α /EGF receptor. Altogether, these data support a role for HCaRG gene in kidney repair after injury through its effect on renal cell migration and TGF- α secretion.

INTRODUCTION

Acute renal failure (ARF) is of major clinical importance as it is associated with high morbidity and mortality (2). ARF may result from tubular necrosis, ischemia-reperfusion injury, or physical obstruction of renal blood flow. The kidney has the capacity to regenerate after injury and its function may return to normal if the cause of ARF is diagnosed and corrected. The recovery of renal function parallels kidney organogenesis. It requires de-differentiation of renal epithelial cells with a wave of proliferation, followed by the migration of cells to the damaged region of the kidney, their differentiation, and remodeling of the extracellular matrix (2; 20). For each of these steps, up-regulation and down-regulation of genes, protein synthesis and entry into the cell cycle are necessary for complete kidney repair (20).

HCaRG (hypertension-related calcium-regulated gene) is negatively controlled by extracellular calcium and codes for an intracellular protein of 27 kDa (23). HCaRG is expressed in almost all tissues studied with preponderance in the kidney. *In situ* hybridization has localized its expression in the tubular fraction of the kidney (23). We have produced two stable kidney cell lines overexpressing HCaRG to help us identify HCaRG function, the human embryonal kidney (HEK293) and the renal collecting duct derived, Madin-Darby canine kidney-C7 (MDCK) cell lines. We have previously reported that HCaRG overexpression reduced HEK293 cell proliferation in association with cell arrest in the G₂M phase of the cycle (3). Phenotypic characteristics of cellular differentiation were observed, including cell

hypertrophy, microvilli and the appearance of differentiated junctions. The HEK293 transfected cells also acquired a secretory phenotype, as demonstrated by an 8-fold increase in the secretion of atrial natriuretic peptide (ANP) (or urodilatin, the renal form of ANP) in HCaRG-overexpressing cells (3).

In an *in vivo* model of ischemia-reperfusion injury, HCaRG expression was negatively correlated with the proliferative status of the cells. HCaRG mRNA levels declined rapidly after reperfusion, and increased above baseline thereafter. The expression pattern of the proto-oncogene *c-myc*, which is associated with proliferation of mammalian cells, was shown to be regulated in the opposite way to HCaRG (23).

Based on our previous studies suggesting a potential role of HCaRG in the proliferation and differentiation response to ischemia-reperfusion injury, the aim of this work was to investigate the effect of HCaRG on the third major event involved in kidney repair, *i.e.* cell migration. We examined the influence of HCaRG expression on HEK293 cell morphology, migration and adhesion. This work led us to identify a novel role for HCaRG protein in renal cell migration.

MATERIALS AND METHODS

Stable transfection and cell culture. HEK293 and MDCK cells were transfected with control plasmid (pcDNA1/Neo; Invitrogen) or with the plasmid encoding HCaRG by a standard calcium phosphate co-precipitation method (HEK293) or by the Fugene method (MDCK), and stable transfectants were selected using 400 µg/ml G418 (HEK293) or 800 µg/ml G418 (MDCK). The clones expressing the highest levels of HCaRG, HCaRG clone 9 from HEK293 cells and HCaRG clone 15 from MDCK cells, were used in this experiment, while clones transfected with vector alone, Neo clone 1 from HEK293 cells and Neo clone 3 from MDCK cells, served as a controls. Stable transfectants were maintained in high glucose DMEM⁺ (HEK293 cells) or low glucose DMEM⁻ (MDCK cells) containing 10% fetal bovine serum (FBS), and 2 mM glutamine with 400 µg/ml G418. Wild type HEK293 and MDCK cells were kept under identical conditions, but without the selection antibiotic G418. All cell types were maintained in 5% CO₂ at 37°C.

Immunofluorescence microscopy. Glass coverslips were coated with poly-D-lysine at a final concentration of 10 µg/ml under sterile conditions. Cells were cultured in DMEM containing 10% FBS. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde, heated at 37°C for 15 min and permeabilized with 0.075% saponin for 10 min. The cells were blocked with phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% bovine serum albumin and 0.2% gelatin. After labelling, the coverslips were mounted in Vectashield and viewed with a Zeiss Axioskop fluorescent microscope equipped

with a 40X-Planapochromat objective and selective filters for fluorescein isothiocyanate, DAPI and Texas Red.

Boyden chamber assay. Migration was measured on a fibronectin, collagen or laminin matrices, in Transwell chambers with 8- μ m pore size filters (Costar). Both the bottom and top of the filters were coated, and the lower chambers were filled with DMEM + 10% FBS. An equal number of cells (1×10^5 /mL) were loaded in the top chamber of each well. After 6 h, non-migrating cells were scraped from the upper surface of the filter with a cotton swab. Cells on the lower surface were fixed with 10% formalin/phosphate and stained with 0.1% crystal violet/20% methanol for 20 min. Migration activity was quantified by computer-assisted imaging via the average density of migrated cells per 4 fields.

Wound-healing assay. For wound-healing assays, stably-transfected cells were seeded at a high density, 1×10^6 cells, on poly-D-lysine-coated coverslips, and wounded 1 day later when the cells formed a confluent monolayer. Scraping a pipette tip through the cell monolayer created the wound. The cells were treated with mitomycin or AG1478 for 24 h and fixed for 15 min with 80/20% methanol/acetone at -20°C , and the coverslips were viewed with a 4X-Planapochromat objective. Quantitative wound closure measurements were recorded for control ($t=0$) and treated wounds after 24 h. Three randomly-chosen regions of a single wound (each 2 cm long) were photographed at x4 magnification. Mean wound width was measured and average percent wound closure was calculated.

Cell proliferation assay. Stably-transfected or control cells were inoculated in DMEM containing 10% FBS in poly-D-lysine-coated. The counting mode served to assess cell proliferation. The cells were trypsinized, and suspended in 1 ml complete medium. A portion (100 μ l) of the cell suspension was subjected to counting with a hemocytometer. Four counts were taken for each data point.

Cell adhesion assay. 96-well tissue culture plates were coated for 2 h at 37°C with fibronectin at 10 μ g/ml. Subsequently, an equal number of cells (1×10^5 /mL) in a FBS-free medium were added per well and allowed to adhere for 5, 10, 20, 30, 45, and 60 min. The adherent cells were fixed with 200 μ l of cold 70% ethanol, stained with 0.1% crystal violet, and then washed 3 times with water. Finally, the cells were incubated for 1 h with 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) to solubilize crystal violet. Absorbance was measured at 562 nm.

Immunoblot analysis. Equal amounts of protein extracts in SDS-lysis buffer were subjected to 7.5 or 12% SDS-PAGE analysis, and transferred electrophoretically to a nitrocellulose membrane. The lysis buffer consisted of cold PBS containing 1% SDS, 5 mM EDTA, 0.2 mM orthovanadate, 40 mM β -glycerophosphate and protease inhibitors (1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml pepstatin, 1 μ g/ml leupeptin and 0.1 mM PMSF). The labeled bands were revealed by chemiluminescence (ECL reagent), and exposed to Kodak biomax light film.

Gene expression profiling. We identified differentially-expressed genes between HCaRG9 and Neo1 cells, representing unique genes or expressed sequence tags (EST) on 2 Affymetrix GeneChips: Affymetrix Human U133A array set (22283 transcripts) and Affymetrix Human U133 plus 2.0 array set (54675 transcripts). HCaRG and Neo clones were synchronized and grown in the presence of 10% FBS for 48 h. Total RNAs were purified with the mini RNeasy kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen). Biotinylated amplified target cRNA was prepared and hybridized to both Affymetrix Human arrays as described by Affymetrix. After hybridization, the microarray chips were washed, stained and scanned. Employing GCOS 1.1 software for the Human U133A array (Affymetrix), or the GeneSpring 7.0 software for the Human U133 plus 2.0, and each of the raw data probe sets, a perfect match versus mismatch value was calculated, and the data were compiled into 1 value for each probe set. The final step in the filtering process was the removal of genes and EST not expressed in either of the clones being compared. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible through GEO Series accession number GSE2555.

RESULTS

HCaRG increases the migration of HEK293 and MDCK cells. HEK293 cells were stably transfected with the control plasmid (Neo1) or with a plasmid-containing rat HCaRG (HCaRG9) as described previously (3). The effect of HCaRG overexpression on cell migration was evaluated using a modified Boyden chamber assay and the wound closure test. In the Boyden chamber system, using serum as a chemoattractant, HCaRG overexpression caused a 3.5-fold increase in the migration of HEK293 cells (Figure 1a). This positive influence of HCaRG on cell motility was confirmed by wound closure assay (Figure 1b). After mechanical wounding, HCaRG9 migrated into the wound area, and around 50% of the wound was closed within 24 h. On the other hand, in Neo1 cultures, the wounds remained open (only 6% closure) after 24 h. This does not appear to be due to differences in cell proliferation as the addition of mitomycin C (4 μ g/ml), an inhibitor of cell division, to the medium only slightly affected HCaRG 9 migration or the difference between the 2 cell types (Figure 1b).

The effect of HCaRG on cell migration was not restricted to the HEK293 cells, as the migration potential of HCaRG expressing MDCK cells (HCaRG15) was also higher (65% closure at 24 h) than that of MDCK control cells (Neo6) (30% closure at 24h) (Figure 1c) (Insert Figures 1a, 1b and 1c here)

Figure 2a shows that after an initial time lag of 24 h, the wound closure of Neo1 cells (grey data points) increased with time in culture with a closure time of 96 h. In contrast, HCaRG9 cultures presented a reduced time lag and a closure time of 48 h,

indicating that HCaRG exerted its positive effect on cell migration in the initial phase of the wound repair process.

To investigate whether cell proliferation could differentially affect the wound closure of HCaRG9 and control cells, a time-dependent proliferation assay was performed. As seen in Figure 2b, there was a gradual increase in cell number after 12 h for both clones, but as reported previously, we observed higher cell proliferation of Neo1 cells, compared to HCaRG9 cells at 48 h. (3,23). Thus, cell proliferation could contribute more to the wound closure of Neo1 cells after 48 h whereas the more rapid wound closure of HCaRG cells, which was visible before 48 h, was mainly due to their enhanced motility.

(Insert figures 2a and 2b here)

HCaRG increases the adhesion of HEK293 cells to extracellular matrix proteins.

To establish whether HCaRG is involved in the attachment step of cell migration, we evaluated the adhesion capacity of cells on fibronectin. After 5 min of culture, HCaRG-overexpressing cells showed 20% of maximal adherence while none of the Neo1 cells attached to the extracellular matrix at this time point (Figure 3a). Maximal attachment was observed after 20 min of culture for HCaRG9 and 120 min for Neo1. After 20 min, the number of Neo1 cells attached was only 45% of HCaRG9 cells. Similar results were obtained with collagen and laminin extracellular matrices (data not shown). The localization of vinculin, a focal adhesion molecule, was also found to be modified in HCaRG-overexpressing cells. While Neo1 cells

displayed diffuse vinculin expression, vinculin concentrated at the cell membrane in HCaRG cells (Figure 3b) with no apparent changes in its level of expression (Figure 3c). These results thus indicate that HCaRG increased the adhesiveness of HEK293 cells.

(Insert Figures 3a, 3b and 3c here)

HCaRG overexpression induces lamellipodia formation. Lamellipodia are thin protrusive sheets that dominate the leading edges of many motile cells. HCaRG overexpression induced major morphological changes of HEK293 cells as seen in Figure 4. These morphological alterations included multiple lamellipodia presentation and the formation of actin-rich domains at their tips. The morphology of parental HEK293 cells was similar to that of vector-only transfected cells (Figure 4A). For both cell types, a fusiform appearance and colony-formation with cell-cell contact were noted after cell synchronization in 0.2% FBS medium (Figure 4B). By contrast, HCaRG-overexpressing cells exhibited lamellipodia-lamellipodia contact under the same synchronization condition. This HCaRG-dependent actin remodeling took place without any increase in actin expression (Figure 3c).

(Insert Figures 4 here)

Identification of genes differentially expressed between HCaRG-overexpressing cells and control cells. We used Affymetrix GeneChips to compare genes differentially expressed between HCaRG-overexpressing cells (HCaRG9) and control cells (Neo1). Those genes are involved in many cellular processes including

proliferation, differentiation, metabolism, adhesion and migration. Genes of interest to the current study are shown in table 1. The most up-regulated gene was TGF- α , which exhibited a 13-fold increase on HG_U133A chip and 2.1-fold increase on HG_U133 plus 2.0 chip while the most down regulated was ninein with 8.6 and 1.5-fold decrease respectively with HG_U133A and HG_U133 plus 2.0. We also observed heightened expression of galectin 1 (6.1 and 4.0-fold), autotaxin (3.2 and 2.0-fold), fibronectin 1 (2.8 and 2.0-fold), fibronectin precursor (2.6 and 2.0-fold), and dynein (2.0 and 1.9-fold). All these genes have been reported to contribute to cell migration and adhesion.

(Insert Table 1 here)

Conditioned medium from HCaRG cells increases migration of control cells.

Because some up-regulated genes in HCaRG9 cells can induce the secretion of motogenic factors, such as TGF- α , we next examined the effect of a conditioned medium of HCaRG9 on the migration of Neo1 cells. As the main difference in cell migration between HCaRG and Neo1 cells occurs during the lag phase within the first 24 h of the wound-healing assay, we added the HCaRG9-conditioned medium to Neo1 cell cultures at 12 h. Neo1 cells incubated with the HCaRG9 medium accrued morphological changes (Figure 5a) and presented 18% wound closure while Neo1 cells in their own medium showed only 5% wound closure (Figure 5b). These results indicate that HCaRG-overexpressing cells secreted a factor(s) that accelerated the initiation of migration. One of these factors could be TGF- α , which was found to be more expressed in HCaRG9 (Table 1). We determined the level of TGF- α protein

and found that HCaRG9 cells secreted more TGF- α than Neo1 (70 vs 40 pg of TGF- α per 1000 cells).

(Insert Figures 5a and 5b here)

TGF- α is partly involved in the increased migration of HCaRG-overexpressing cells. TGF- α was shown to be overexpressed in HCaRG9 cells, suggesting that it could play a role in HCaRG-induced migration. To examine this possibility, we postulated that TGF- α could increase Neo1 cell motility. We treated both clones with increasing concentrations of TGF- α and tested the effect on the cell migratory potential and morphology. As expected TGF- α dose-dependently increased Neo1 cell motility which thus reached a 43 % of wound closure after 24 h (Figure 6a) but with no changes in their morphology (data not shown). In contrast no significant effect was found on HCaRG9 cell motility after TGF- α treatment (Figure 6a).

We then blocked the TGF- α effect on cell migration with the EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478. The inhibitor dose-dependently decreased the percentage of wound closure by HCaRG9 cells (Figure 6b). While, TGF- α blockade only slightly affected the motility of Neo1 cells in their own medium (Figure 6b). Furthermore, addition of neutralizing anti-TGF- α antibody to the medium inhibited the migratory potential of both Neo1 and HCaRG9 cells with a more prominent effect on the latter. It also abolished the effect of HCaRG conditioned medium on Neo1 cell migration (Figure 6c). These results suggest that TGF α plays an important role in the increased migration capacity caused by HCaRG overexpression most probably via its autocrine/paracrine interaction with the EGFR. (Insert Figures 6a, 6b and 6c here)

DISCUSSION

Molecular mechanisms underlying the recovery of renal cell function are complex and still poorly understood. It is proposed that after an injury, the surviving cells re-polarize and/or de-differentiate, proliferate and migrate to the damaged region, then differentiate to restore kidney integrity and function (20). In each of the steps involved, activation or inhibition of many genes must be highly controlled to allow kidney recovery.

Our previous studies point to the involvement of HCaRG in 2 major processes contributing to kidney repair, i.e. control of cell proliferation and differentiation. In the present work, we tested the hypothesis that HCaRG can also be a major player in a third cellular event important for kidney regeneration, cell migration. Here, we demonstrate a positive effect of HCaRG on renal epithelial cell migration via its influence on TGF- α synthesis.

HCaRG increases HEK293 cell motility in 2 different paradigms, the Boyden chamber and wound-healing assays. The higher migratory potential of HCaRG overexpressing cells was confirmed in the collecting duct-derived MDCK cells. Regulation of cell migration involves cell adhesion and actin reorganization. Adhesion is the first step of cell migration but their association is complicated. Indeed, to have a migration phenotype, adhesion should be strong enough to permit attachment of the cell to the extracellular matrix, but, on the other hand, too strong

adhesion would inhibit motility (7; 25). HCaRG appears to increase the initial attachment of cells to the extracellular matrix, giving them the strength to generate forward traction for migration.

The driving force for cellular migration is dependent on actin reorganization of the cytoskeleton. The increased motility of cells overexpressing HCaRG is accompanied by morphological changes, including lamellipodia presentation and the formation of actin-rich domains at their tips. In addition to its effect on cytoskeleton organization, we wanted to know if HCaRG overexpression would lead to modulation of the expression of genes involved in cell motility. Micro-array analysis revealed up-regulation of several interesting genes in regard to their reported positive effect on cell migration, such as TGF- α , autotaxin, galectin 1, fibronectin1 and fibronectin precursor (4; 6; 8; 10; 12-16; 19; 26). We will have to confirm that these differences are also observed at the protein level, but it is interesting to note that autotaxin is an autocrine motility factor implicated in neoplastic invasion and metastasis (24). It is involved in actin reorganization, focal adhesion turnover and lamellipodia formation. Focal adhesion and lamellipodia formation can also be regulated by fibronectin and galectin-1 localized at the cell surface, all of them targeting FAK which has also been linked to the PAK pathway. On the other hand, dynein is a protein responsible for short microtubule transport toward the periphery of migrating cells (1; 17). The release of these short microtubules from the centrosome is abolished by ninein, and results in inhibition of cell migration (1). Interestingly, cells overexpressing HCaRG present an increase in dynein mRNA and a decrease of ninein expression, in

agreement with the augmentation of cell migration observed. The most overexpressed secreted factor in HCaRG9 cells is TGF- α . TGF- α belongs to the EGF family and promotes its effects after binding to EGFR (27). Activation of EGFR either by EGF or TGF- α has been linked to the stimulation of cell motility in different cell types, such as kidney cells or breast cancer cells (11; 22).

It is not surprising that some of these genes overexpressed in HCaRG9 cells code for secreted motility factors, since our previous studies have revealed an increase in the secretory capacity of HEK293 overexpressing HCaRG (3). To confirm the involvement of such secreted factors in the motility phenotype of HCaRG9, conditioned medium from cells overexpressing HCaRG was tested on control cells, and its effect was evaluated on cell morphology and migration. Conditioned medium from HCaRG9 had a major impact on the morphology of Neo1 cells, giving them a migratory phenotype with the formation of lamellipodia. Moreover, the motogenic potential of Neo1 cells was augmented by 2.7-fold in the presence of conditioned medium from HCaRG9 cells. This suggests that the positive effect of HCaRG overexpression on cell motility can be partly explained by the secretion of motogenic proteins that can act as autocrine or paracrine factors.

TGF- α is involved in the early migration phase of cells overexpressing HCaRG. However, we cannot rule out the possibility that other secreted factors present in the conditioned medium can contribute to the increased migration potential of HEK293 cells overexpressing HCaRG. We have already reported a major elevation of ANP

secreted from HCaRG9 cells (3) . Depending on the cell type, ANP can have both positive and negative effects on cell migration (5; 9; 21). It is possible that secreted ANP promotes the motility of HCaRG9 cells and that more than one pathway contributes to the migratory phenotype.

This study shows the presence of a new player, HCaRG, in the control of cell migration. Knock-out mouse for HCaRG will help us to confirm its implication in the process of kidney cell repair. A better understanding of the genes contributing to kidney repair may have a major impact in the development of new therapeutic strategies in renal failure.

Acknowledgements

We thank Stéphanie Langlois (Laboratoire de Médecine Moléculaire, Hôpital Ste-Justine-Université du Québec à Montréal) for help with Boyden chamber assays, Suzanne Cossette and Nathalie Bourcier for their help with the production of stable transfected cells and Gilles Corbeil for the microarray analyses. These studies are supported by the Canadian Institutes of Health Research Grant (MOP-43859). The authors thank Ovid Da Silva for his editorial help.

References

1. **Abal M, Piel M, Bouckson-Castaing V, Mogensen M, Sibarita JB and Bornens M.** Microtubule release from the centrosome in migrating cells. *J Cell Biol* 159: 731-737, 2002.
2. **Bush KT, Keller SH and Nigam SK.** Genesis and reversal of the ischemic phenotype in epithelial cells. *J Clin Invest* 106: 621-626, 2000.
3. **Devlin AM, Solban N, Tremblay S, Gutkowska J, Schurch W, Orlov SN, Lewanczuk R, Hamet P and Tremblay J.** HCaRG is a novel regulator of renal epithelial cell growth and differentiation causing G2M arrest. *Am J Physiol Renal Physiol* 284: F753-F762, 2003.
4. **Dufourcq P, Couffinhal T, Ezan J, Barandon L, Moreau C, Daret D and Duplaa C.** FrzA, a secreted frizzled related protein, induced angiogenic response. *Circulation* 106: 3097-3103, 2002.
5. **Elferink JG and De Koster BM.** Atrial natriuretic factor stimulates migration by human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 288: 335-340, 1995.
6. **Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, Suzuki R, Ohta H, Yamori T, Watanabe M, Chun J and Arai H.** Lysophosphatidic acid and

autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem* 279: 17634-17639, 2004.

7. **Holly SP, Larson MK and Parise LV.** Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res* 261: 69-74, 2000.
8. **Horie H, Kadoya T, Hikawa N, Sango K, Inoue H, Takeshita K, Asawa R, Hiroi T, Sato M, Yoshioka T and Ishikawa Y.** Oxidized galectin-1 stimulates macrophages to promote axonal regeneration in peripheral nerves after axotomy. *J Neurosci* 24: 1873-1880, 2004.
9. **Ikeda M, Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Horio T, Ueda M, Morisaki N and Yoshikawa J.** Natriuretic peptide family as a novel antimigration factor of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 731-736, 1997.
10. **Jung ID, Lee J, Yun SY, Park CG, Choi WS, Lee HW, Choi OH, Han JW and Lee HY.** Cdc42 and Rac1 are necessary for autotaxin-induced tumor cell motility in A2058 melanoma cells. *FEBS Lett* 532: 351-356, 2002.
11. **Kruger JS and Reddy KB.** Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells. *Mol Cancer Res* 1: 801-809, 2003.

12. **Lee LF, Louie MC, Desai SJ, Yang J, Chen HW, Evans CP and Kung HJ.** Interleukin-8 confers androgen-independent growth and migration of LNCaP: differential effects of tyrosine kinases Src and FAK. *Oncogene* 23: 2197-2205, 2004.
13. **Lee S and Helfman DM.** Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway. *J Biol Chem* 279: 1885-1891, 2004.
14. **Leeb SN, Vogl D, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J, Rogler G and Gelbmann CM.** Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts. *Am J Gastroenterol* 99: 335-340, 2004.
15. **Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai K and Yoshizato K.** Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 278: 18938-18944, 2003.
16. **Manes T, Zheng DQ, Tognin S, Woodard AS, Marchisio PC and Languino LR.** Alpha(v)beta3 integrin expression up-regulates cdc2, which modulates cell migration. *J Cell Biol* 161: 817-826, 2003.
17. **Maxwell CA, Keats JJ, Crainie M, Sun X, Yen T, Shibuya E, Hendzel M, Chan G and Pilarski LM.** RHAMM is a centrosomal protein that

interacts with dynein and maintains spindle pole stability. *Mol Biol Cell* 14: 2262-2276, 2003.

18. **Nakajima T, Miyaji T, Kato A, Ikegaya N, Yamamoto T and Hishida A.** Uninephrectomy reduces apoptotic cell death and enhances renal tubular cell regeneration in ischemic ARF in rats. *Am J Physiol* 271: F846-F853, 1996.
19. **Nakano T, Tani M, Ishibashi Y, Kimura K, Park YB, Imaizumi N, Tsuda H, Aoyagi K, Sasaki H, Ohwada S and Yokota J.** Biological properties and gene expression associated with metastatic potential of human osteosarcoma. *Clin Exp Metastasis* 20: 665-674, 2003.
20. **Nony PA and Schnellmann RG.** Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 905-912, 2003.
21. **Pedram A, Razandi M and Levin ER.** Natriuretic peptides suppress vascular endothelial cell growth factor signaling to angiogenesis. *Endocrinology* 142: 1578-1586, 2001.
22. **Solari V, Shima H and Puri P.** Increased expression of EGFR and TGF- α in segmental renal dysplasia in duplex kidney. *Pediatr Surg Int* 20: 243-247, 2004.

23. **Solban N, Jia HP, Richard S, Tremblay S, Devlin AM, Peng J, Gossard F, Guo DF, Morel G, Hamet P, Lewanczuk R and Tremblay J.** HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J Biol Chem* 275: 32234-32243, 2000.
24. **Stracke ML, Clair T and Liotta LA.** Autotaxin, tumor motility-stimulating exophosphodiesterase. *Adv Enzyme Regul* 37: 135-144, 1997.
25. **Tian YC and Phillips AO.** TGF-beta1-mediated inhibition of HK-2 cell migration. *J Am Soc Nephrol* 14: 631-640, 2003.
26. **Visse R and Nagase H.** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92: 827-839, 2003.
27. **Wells A.** EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 637-643, 1999.

Figure legends

Figure 1. HCaRG activates cell migration. **(a)** Cells were plated at 1×10^5 /insert on 8- μ m pore membranes in Transwell chambers. The membranes were coated with fibronectin 10 μ g/ml. After incubation for 6 h in a CO₂ incubator, the cells that had migrated to the underside of the membranes were fixed and stained. Migration activity was quantified by computer-assisted imaging (mean \pm SE; n = 4–6). **(b)** Confluent HCaRG9 and Neo1 and **(c)** HCaRG15 and Neo3 cultures were wounded with a pipette tip. Wound closure was monitored by microscopy. Micrographs were taken immediately (t=0 h) or t=24 h after wounding. A representative histogram is shown. Experiments were repeated at least 3 times with similar results.

Figure 2. Time-course of Neo1 vs HCaRG9 migration and proliferation. **(a)** Confluent HCaRG9 and Neo1 cultures were wounded with a pipette tip. Wound closure was monitored by microscopy. Micrographs were taken immediately and at different time points until 96 h after wounding. **(b)** Cells were counted at different time intervals, after trypsinization.

Figure 3. **(a)** Effect of HCaRG on the attachment of HEK293 cells. Cells were plated onto 96-well plates precoated with fibronectin (10 μ g/ml). After incubation at 37°C and according to a fixed time scale, the attached cells were stained with 0.1% crystal violet, resuspended in SDS, and absorbance was measured with a microplate reader at 562 nm. The results are the average of 4-7 independent experiments, each

with 3 replications. **(b)** Vinculin localization. HCaRG9 and Neo1 cells were cultured on coverslips for 24 h. Double immunofluorescence staining was then performed for F-actin (rhodamine-conjugated phalloidin) and vinculin (rabbit polyclonal antibody followed by FITC-conjugated goat anti-rabbit antibody). **(c)** Actin and vinculin levels in HCaRG9 and Neo1 cells. Equalized protein samples were subjected to reducing 7.5% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was then probed with anti-vinculin (first row) and anti-actin (second row).

Figure 4. Morphological changes of HCaRG-transfected HEK293 cells in 10% **(A)** or 0.2% FBS medium **(B)**. The morphology of parental HEK293 cells did not differ significantly from that of empty vector-transfected cells. Morphological changes (multiple lamellipodia presentation and the formation of actin-rich domains at the tips of lamellipodia) were observed in the HCaRG-transfected cells. All cells are shown at x40 magnification.

Figure 5. Effect of conditioned medium from HCaRG9 cells on **(a)** Neo1 cell morphology from two different fields (Neo1 + ctrl medium) and Neo 1 + HCaRG9 conditioned medium and **(b)** migration potential. Neo1 cells incubated with control medium (Neo1 + ctrl medium) or conditioned medium from HCaRG cells (Neo1 + HCaRG9 conditioned medium) were subjected to wound healing for 24 h. Significant cell migration is seen upon addition after 12 h of HCaRG-conditioned medium.

Figure 6. Effect of TGF- α activation and neutralization and EGFR inhibition on cell migration. The migratory rate of HCaRG9 and Neo1 cells in a wounding assay was determined after 24 h of treatment by measuring wound width as a function of **(a)** 1 $\mu\text{g/ml}$ of TGF- α or **(b)** 1 μM AG1478 (AG-) and **(c)** 0.1 $\mu\text{g/ml}$ anti-TGF-alpha neutralizing antibody.

Table 1. Genes differentially expressed between HCaRG-overexpressing cells and control cells

Genes	Accession number	Expression (fold)	
		HG_U133A	HG_U133 plus 2.0
TGF- α	NM_003236	+13	+2.1
Ninein	NM_016350	-8.6	-1.5
Galectin 1	NM_002305	+6.1	+4.0
Autotaxin (ATX)	L35594	+3.2	+1.9
Fibronectin	AF_130095	+2.8	+2.0
Fibronectin precursor	X02761	+2.6	+2.0
Dynein	NM_004411	+2.0	+1.9

Genes up-regulated or down-regulated in HCaRG9 cells compared to Neo1 cells.

Figure 1a

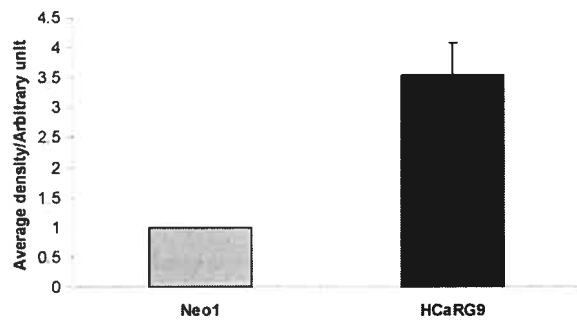


Figure 1b

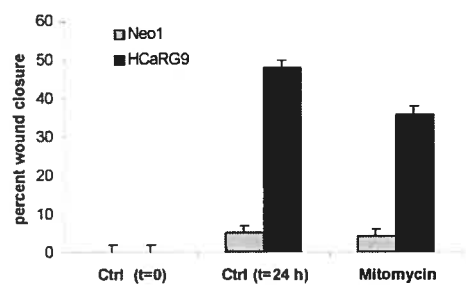


Figure 1c

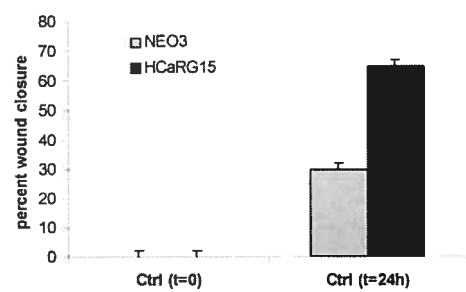


Figure 2a

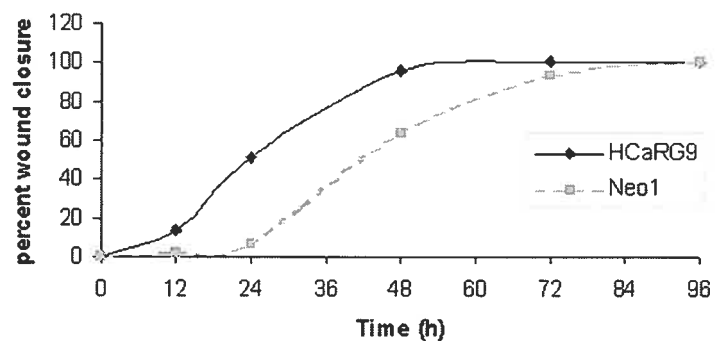


Figure 2b

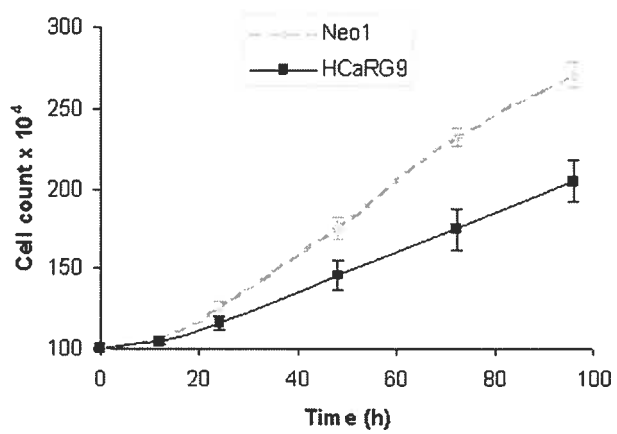


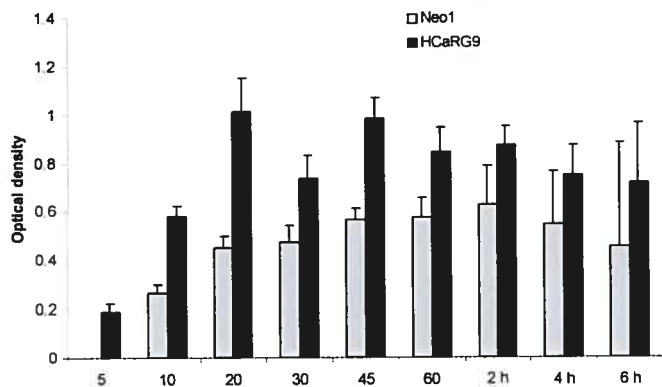
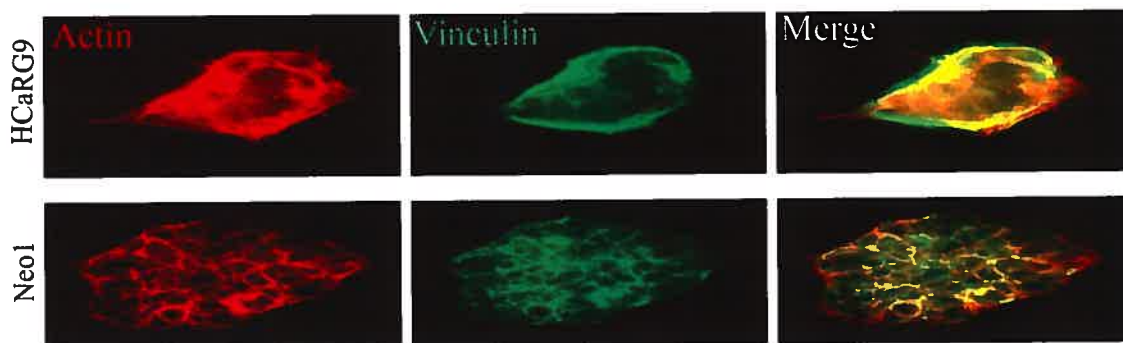
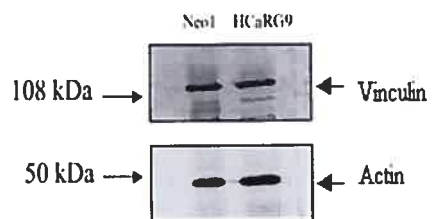
Figure 3a**Figure 3b****Figure 3c**

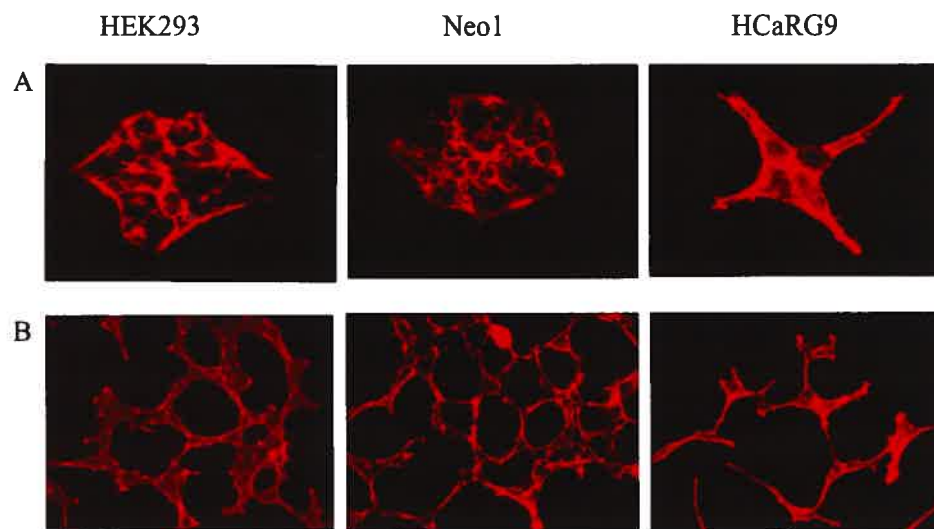
Figure 4

Figure 5a

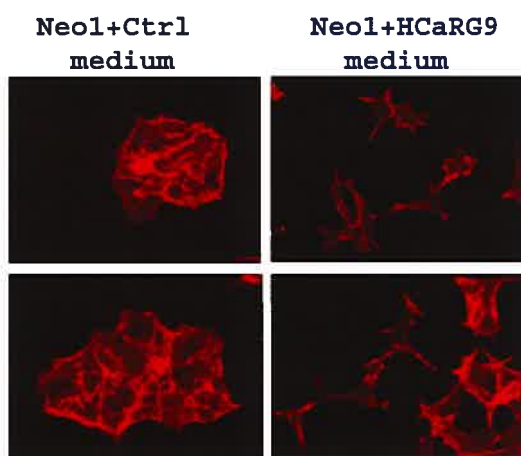


Figure 5b

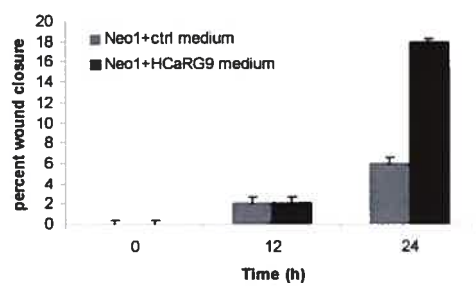


Figure 6a

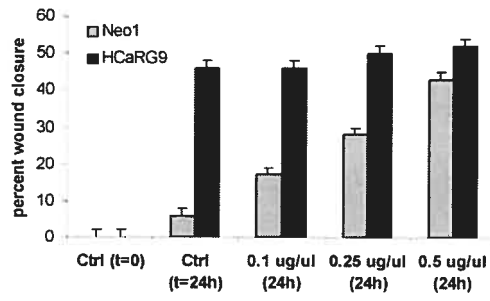


Figure 6b

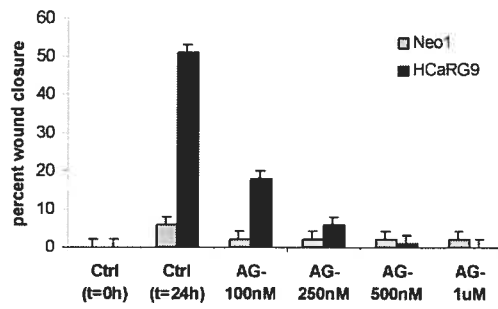
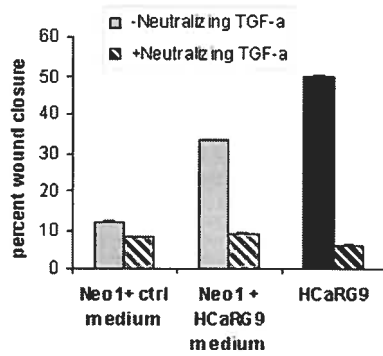


Figure 6c



Chapitre 6

Discussion

6.0 Introduction du chapitre

Dans les chapitres précédents, nous avons tenté de définir les paramètres responsables de la régulation de HCaRG en effectuant des études de caractérisation de sa région promotrice et évaluant son expression dans un modèle de différenciation cellulaire et dans différents types de tumeurs. Nous avons aussi essayé d'éclaircir la fonction de HCaRG dans les cellules rénales en établissant le profil des gènes modifiés par la surexpression de HCaRG. Enfin, nous avons identifié un nouveau rôle de HCaRG dans la migration cellulaire. Dans les prochaines lignes, nous tenterons de mettre en perspectives les principaux résultats présentés dans cette thèse.

6.1 Régulation de l'expression de HCaRG

6.1.1 Stress osmotique et volume cellulaire

L'identification d'un nCARE putatif dans la région 5'UTR de HCaRG nous a amené à penser que l'expression de HCaRG pouvait être régulée par le calcium et le NaCl de la même façon que la PTH. Cependant, les séquences des nCAREs de HCaRG et de la PTH ne présentent pas une identité de 100%. De plus, nos expériences de transfection et de stress osmotique causé par un ajout de NaCl ou de mannitol au milieu de culture nous ont montré des réponses différentes au niveau de l'activité de ces deux éléments. Enfin, par retard sur gel, nous avons vu que la liaison de protéines nucléaires au nCARE de HCaRG corrélait avec une augmentation de l'activité de ce dernier. À la lumière de ces résultats, il faudrait peut-être reconsidérer notre hypothèse de départ voulant que le nCARE putatif de HCaRG soit

un élément de réponse négative au calcium et le considérer comme un élément de réponse positive au NaCl. Des expériences supplémentaires seront nécessaires afin de clarifier ces résultats.

6.1.2 Régulation de l'expression de HCaRG pendant le cycle cellulaire

Comme le suggère la présence des éléments CDE et CHR dans la région promotrice de HCaRG, l'expression de ce dernier pourrait être dépendante du cycle cellulaire. Ainsi, on peut imaginer que son expression est réduite pendant les phases G0 et G1 du cycle cellulaire mais commence à augmenter pendant la phase S et atteint son maximum en G2 et M. Ceci est en accord avec la diminution d'expression de HCaRG pendant la prolifération des Caco-2 et avec l'arrêt en G2M qu'amène la surexpression de HCaRG. Cependant, un autre mécanisme pourrait aussi lier l'effet de HCaRG sur le cycle cellulaire à la régulation de son expression. De façon à préserver l'intégrité du génome, lorsqu'il y a présence de dommages à l'ADN, les cellules effectuent un arrêt en G2. Dépendamment du type de dommage, différentes voies de signalisation sont responsables de ce contrôle de qualité (320). L'expression de p21 et de GADD45 est augmentée suite à un dommage à l'ADN et ces deux protéines induisent un arrêt des cellules en G2 (219;320;321). Les cellules surexprimant HCaRG montrent aussi une expression plus élevée de p21 et de GADD45. De plus, l'expression de GADD45 suite à un stress génotoxique est sous le contrôle des éléments Oct-1 et NF-Y, tous deux retrouvés dans le promoteur de HCaRG (219;221). Ces données suggèrent que p21, GADD45 et HCaRG fassent

partie d'une voie de signalisation commune permettant à la cellule de répondre par un arrêt du cycle cellulaire en G2 suite à un dommage à l'ADN.

Au niveau tumoral, ce que l'on retrouve le plus souvent, est une perte du mécanisme de contrôle de qualité pendant le cycle cellulaire. On exploite cette situation lors des traitements des cancers. Suite à un traitement de chimiothérapie, les cellules normales effectuent des arrêts en G1 ou G2 alors que les cellules tumorales continuent le cycle cellulaire et deviennent donc plus susceptibles aux agents thérapeutiques. Cependant, plusieurs cellules cancéreuses possèdent la capacité d'effectuer un arrêt en G2. Un traitement avec des agents qui empêchent cet arrêt en G2 entraînera la mort des cellules tumorales alors que les cellules normales s'arrêteront en G1 (322). Étant donné les variations d'expression de HCaRG dans les cancers, il serait intéressant d'étudier l'implication de HCaRG dans la réponse cellulaire suivant un dommage à l'ADN.

6.1.3 Méthylation de l'îlot CpG

L'identification d'un îlot CpG dans la séquence de HCaRG nous laisse supposer que la méthylation de l'ADN pourrait être un niveau de régulation de l'expression de HCaRG. Les conditions physiologiques ou pathologiques dans lesquelles l'expression de HCaRG semble être modulée (développement, différenciation, tumeurs) ont déjà été associées à des modifications des niveaux de méthylation de plusieurs gènes. À différentes étapes du développement ou lors d'une pathologie, le patron de méthylation varie. Le cancer est probablement la condition pathologique

la plus souvent associée à des défauts de méthylation de l'ADN. Des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'adhésion, la migration ou la prolifération cellulaire peuvent voir leur patron de méthylation modifié (178). Cependant, selon le type de tumeur, la fréquence de la méthylation des îlots CpG varie et les gènes ciblés ne sont pas les mêmes (323). Dans le cas de HCaRG, le seul type de tumeur dans laquelle son expression semble être clairement diminuée est le carcinome rénal. L'hyperméthylation de HCaRG pourrait être en partie responsable de cette diminution et il serait intéressant d'explorer cette hypothèse en utilisant de l'ADN provenant de tumeurs rénales bien caractérisées et déterminer si le niveau de méthylation de HCaRG corrèle avec le stade de la tumeur.

Les changements d'expression de HCaRG peuvent aussi être causés par des mutations dans son îlot CpG. En effet, le taux de mutation des cytosines méthylées est très élevé (324). Étant donné la similarité entre une cytosine méthylée et une thymine (les deux ont un groupe méthyle en position 5), la déamination spontanée d'une 5-méthylacytosine génèrera une thymine. Cette transition d'un C pour un T explique que les CpG soient sous-représentés dans le génome. Il serait intéressant de séquencer l'îlot CpG de HCaRG à partir d'ADN génomique de reins normaux et de néphroblastomes. Des mutations de certains CpG pourraient empêcher la liaison de facteurs de transcription essentiels à l'expression de HCaRG dans le rein.

6.1.4 Tumeurs associées avec un gain du chromosome 8

Dans certains types de tumeurs, l'expression de HCaRG semble être augmentée, comme c'est le cas dans les carcinomes gastriques. Des gains au niveau du chromosome 8 ont été associés à ce type de carcinome. La localisation de HCaRG sur le chromosome 8q fait de lui un bon candidat pour une amplification de son gène, ce qui expliquerait son expression élevée dans ce type de cancer. L'amplification du chromosome 8 n'est pas seulement observée dans les tumeurs gastriques mais aussi dans les cancers de la prostate, du poumon, du sein, des ovaires et du côlon (247;252;325-327). Cependant, la conséquence d'une amplification chromosomique est rarement l'augmentation de l'expression des gènes. En effet, dans le cancer du colon, seulement 3,8% des gènes se trouvant dans une région amplifiée ont aussi une expression augmentée. Dans une telle région, 7,7% des gènes ont même une expression diminuée (327). Dépendamment du type de cancer, les gènes dont l'expression se trouve modifiée sont situés ou non dans une même région (cluster) du chromosome amplifié (327;328). Pour ce qui est de HCaRG, il faudra voir s'il existe une association entre les variations de son expression entre différentes tumeurs et l'amplification des gènes. Cette analyse devra se faire sur des types de cancers particuliers et les résultats ne pourront être extrapolés aux autres types de carcinomes.

6.2 Fonction de HCaRG

6.2.1 *Effet de HCaRG sur l'expression des gènes*

Nous avons vu que l'expression de plusieurs gènes était modulée dans les cellules surexprimant HCaRG. HCaRG pourrait influencer directement l'expression d'autres gènes en agissant en tant que facteur de transcription.

Des évidences suggèrent que HCaRG puisse agir directement sur la transcription des gènes. La protéine codée par HCaRG a été localisée dans le cytoplasme et le noyau (203). Selon le type de cellule ou le contexte cellulaire, sa localisation pourrait donc varier. L'analyse de la séquence protéique de HCaRG suggère un contenu élevé en hélices α , ce qui favorise habituellement les interactions et la dimérisation. De plus, nous avons identifié quatre motifs de fermetures éclair à leucines, des motifs fréquemment retrouvés dans les protéines liant l'ADN. Le fort contenu en hélice α et les motifs de fermetures éclair à leucines nous amènent à penser que HCaRG pourrait lier l'ADN. HCaRG pourrait donc influencer l'expression des gènes en se liant directement à leur région promotrice et/ou en se liant à d'autres facteurs de transcription.

6.2.2 *HCaRG stimule la migration cellulaire*

a) Implication de TGF- α

Le modèle proposé pour expliquer l'effet de HCaRG sur la motilité des cellules rénales (figure 6.1) suggère que le TGF- α y joue un rôle important en agissant à deux niveaux, soit la formation de lamellipodes et l'adhésion focale. Nos études ont

démontré une augmentation de l'expression et de la sécrétion de TGF- α dans les cellules surexprimant HCaRG. De plus, le blocage du EGFR ou l'ajout d'un anticorps neutralisant anti-TGF- α a significativement diminué la capacité migratoire de ces cellules, mais n'a eu qu'un faible effet sur les cellules contrôles. La production de TGF- α par les cellules de tumeurs rénales peut activer ou inhiber la prolifération cellulaire. En effet, dépendamment du niveau de confluence des cellules en culture, différentes voies de signalisation seront activées par la liaison de TGF- α à son récepteur (329). De plus, la voie TGF- α /EGFR a été associée à la migration de différents types de cellules cancéreuses (330;331). Il serait intéressant de corrélérer le niveau d'expression de HCaRG dans les cellules tumorales avec les niveaux de TGF- α et le potentiel migratoire des cellules.

Dans les différents modèles d'insuffisance rénale aiguë, les niveaux de TGF- α sont augmentés pendant la réparation du rein suivant la lésion. Cette augmentation de TGF- α a été associée à la phase mitogénique de réparation des cellules rénales (332-334). Cependant, comme les niveaux de HCaRG sont augmentés suite à une ischémie-reperfusion et qu'il stimule la migration des cellules rénales via la voie TGF α /EGFR, nous pouvons suggérer que cette voie participe aussi à la phase migratoire de la réparation du rein.

b) Autres voies impliquées dans la migration cellulaire

En plus de TGF- α , les analyses de microarray nous ont montré que d'autres gènes associés à la motilité cellulaire étaient modulés par la surexpression de HCaRG

(chapitre 5, table I). Certains d'entre eux, comme l'autotaxine, la fibronectine et la galectine-1, sont des facteurs sécrétés. La figure 6.1 présente un modèle pour expliquer comment ces facteurs peuvent stimuler la migration des cellules. L'autotaxine est un facteur autocrine de motilité cellulaire impliqué dans la régulation des propriétés invasives et métastatiques des cellules cancéreuses (335). La production d'acide lysophosphatidique par l'autotaxine mène à l'activation de Cdc42 et de Rac1, ce qui entraîne la phosphorylation de PAK et de FAK (336). Ces dernières sont responsables de la formation de lamellipodes et de l'adhésion focale. La fibronectine (fbn) et la galectine-1 sont aussi capables d'entraîner la phosphorylation de FAK (337;338). La fibronectine, un facteur autocrine et paracrine, est essentielle à la migration des fibroblastes au niveau de l'intestin (339). De son côté, la galectine-1 est une protéine de la famille des lectines particulièrement abondantes dans les VSMC (vascular smooth muscle cells). Elle induit la phosphorylation de FAK suite à sa liaison sous forme d'homodimère à l'intégrine $\beta 1$ (338;340). Dans le modèle de la figure 6.1, FAK est la protéine cible de plusieurs voies. Son rôle est en fait de promouvoir le turnover des adhésions focales. L'expression de FAK est requise pour la stimulation de la migration des cellules par le PDGF et le EGF (341;342). Par ailleurs, FAK est surexprimé dans une variété de tumeurs invasives (341).

L'implication de plusieurs voies de signalisation dans notre modèle est en accord avec nos résultats présentés dans le chapitre 5. En effet, ces derniers nous laissent supposer que le TGF- α ne serait pas l'unique responsable de l'augmentation de la

migration des cellules surexprimant HCaRG. Ainsi, l'ajout du TGF- α aux cellules témoins Neo1 stimule leur capacité migratoire mais, contrairement au milieu conditionné de HCaRG9, n'induit pas la formation de lamellipodes. Plusieurs mécanismes sont donc probablement responsables des changements morphologiques et migratoires observés dans les cellules HCaRG9. Des études ont rapporté que les intégrines pouvaient agir en coopération avec les récepteurs des facteurs de croissance pour stimuler la migration cellulaire (343;344). Dans notre modèle, la liaison de la galectine ou de la fibronectine aux intégrines pourrait créer des conditions de synergie entre le EGFR et les intégrines.

Deux gènes codant pour des protéines associées aux microtubules sont aussi modulés par HCaRG. Ainsi, la dynéine voit son expression augmentée dans les cellules surexprimant HCaRG alors que celle de la ninéine est diminuée. Lors de la migration de plusieurs types de cellules, la relâche des microtubules vers les lamellipodes est essentielle. La dynéine est responsable du transport des microtubules vers la périphérie des cellules (345;346). De son côté, la ninéine participe à l'ancrage des microtubules au centrosome et sa surexpression est donc associée à une diminution de la motilité cellulaire (345). Ceci semble indiquer que la surexpression de HCaRG favorise la migration en agissant aussi au niveau des microtubules.

HCaRG stimule la migration cellulaire via la sécrétion de protéines

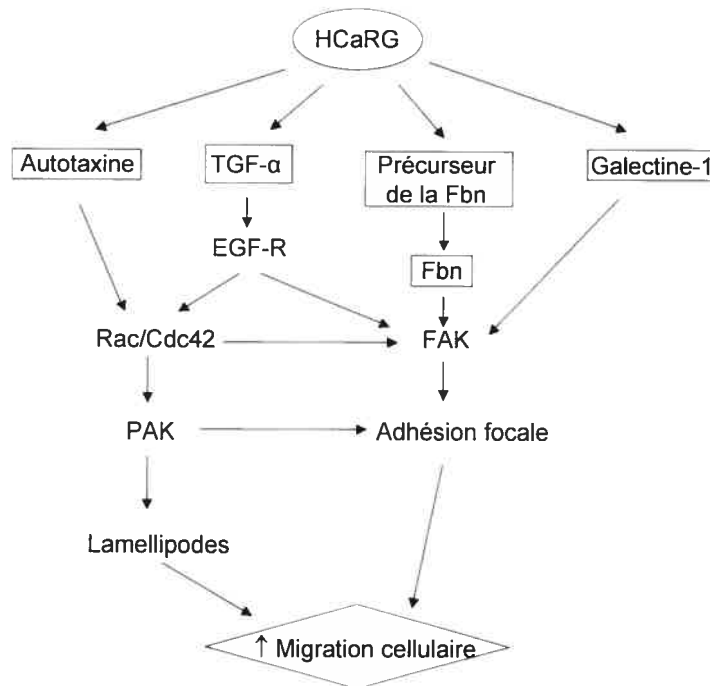


Figure 6.1. Modèle proposé pour expliquer l'effet positif de HCaRG sur la migration cellulaire.

c) Migration et canaux ioniques

Étant donné leur lien étroit avec le cytosquelette d'actine et l'importance de ce dernier dans la migration cellulaire, les transporteurs et canaux ioniques sont impliqués dans la motilité des cellules. Selon leur type, les canaux et transporteurs modifient la machinerie essentielle à la migration soit en agissant sur la $[Ca^{2+}]_i$ ou sur le volume cellulaire (347).

Dans les cellules en migration, il existe un gradient spatial et temporel de $[Ca^{2+}]_i$. Ainsi, la faible $[Ca^{2+}]_i$ à l'avant de la cellule favorisera la protrusion des lamellipodes. À l'opposé, la $[Ca^{2+}]_i$ élevée à l'arrière de la cellule favorisera la rétraction de cette partie de la cellule (347). Les cellules surexprimant HCaRG ont un niveau plus élevé des pompes calciques PMCA1 et SERCA2. Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a montré l'implication de PMCA1 dans la motilité cellulaire. Cependant, un des membres de sa famille, PMCA4, est nécessaire à la migration des spermatozoïdes (348). Nous pouvons donc supposer que PMCA1 puisse jouer un rôle similaire dans les cellules épithéliales. De son côté, l'inhibition de SERCA est suffisante pour supprimer la migration des cellules endothéliales (349). HCaRG, en augmentant l'expression des pompes PMCA1 et SERCA2 pourrait donc influencer les oscillations calciques requises pour la migration des cellules.

La deuxième composante, celle de la régulation du volume cellulaire, est aussi reliée au calcium. La fonction de plusieurs canaux potassiques est de déterminer le potentiel membranaire de la cellule. L'activité des canaux potassiques crée une hyperpolarisation membranaire, ce qui entraîne une entrée de Ca^{2+} dans la cellule et une stimulation de la migration (152). Un autre modèle suggère que les canaux K^+ sensibles au calcium seront activés par les fluctuations de $[Ca^{2+}]_i$. La perte massive mais intermittente de K^+ entraînerait une diminution de volume cellulaire (RVD). Cette perte de volume faciliterait la rétraction de la queue et donc la migration. À

l'avant de la cellule, une augmentation de volume (RVI) créée par les échangeurs Na^+/H^+ et/ou le cotransporteur NKCC2 favoriserait la protrusion des lamellipodes (91;149). HCaRG augmente l'expression du canal potassique TWIK-1. De plus, des résultats obtenus dans notre laboratoire ont montré que HCaRG interagissait avec le canal K^+ dépendant du voltage (K_v), la pompe $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ et le cotransporteur NKCC2, en plus d'augmenter l'activité de ce dernier.

L'activité concertée de certains de ces transporteurs ioniques pourrait expliquer l'effet de HCaRG sur la migration cellulaire. Il serait important de localiser et d'inhiber ces canaux au niveau des cellules surexprimant HCaRG pendant leur migration, de façon à proposer un modèle expliquant l'implication de HCaRG et des canaux dans le phénotype migratoire observé.

6.3 Directions futures

Les résultats présentés dans cette thèse ouvrent la porte à de nombreuses voies de recherche sur la régulation de l'expression de HCaRG et sur sa fonction. Nous proposons donc ici quelques voies à explorer pour définir le rôle de HCaRG.

6.3.1 Régulation de l'expression de HCaRG

La caractérisation du promoteur de HCaRG devra être poursuivie en mettant l'emphase en particulier sur l'étude des éléments nCARE, CDE et CHR, GRE ainsi que Oct-1 et NF-Y.

Au niveau du nCARE, le calcium ionophore sera utilisé pour pallier à l'absence de réponse (aucune différence d'activité luciférase) observée lors de l'incubation des cellules Hela dans un milieu avec ou sans calcium. De plus, les expériences de retard sur gel seront effectuées avec les protéines nucléaires des cellules incubées dans des milieux contenant des concentrations variables de calcium, de NaCl ou de mannitol. Ces expériences devraient nous aider à déterminer si le nCARE putatif de HCaRG est bel et bien un élément négatif de réponse sensible au calcium et au NaCl. L'implication de l'élément IRF-1 dans la réponse du promoteur de HCaRG à un stress osmotique causé par le NaCl, sera vérifiée par des analyses de délétions de la région 5'UTR de HCaRG.

Afin de vérifier si l'expression de HCaRG est dépendante du cycle cellulaire, les cellules seront d'abord transfectées avec pGL3b contenant la région promotrice de HCaRG avec les éléments CDE et CHR. Par la suite, les cellules seront synchronisées à diverses phases du cycle cellulaire par différents traitements et l'activité luciférase sera mesurée. La mimosine sera utilisée pour arrêter les cellules à la phase G1, la thymidine pour la phases G1/S et le nocodazole pour les phases G2/M du cycle cellulaire (209). Pour évaluer l'effet des glucocorticoïdes sur le promoteur de HCaRG, les cellules transfectées seront traitées avec le dexaméthasone.

Comme mentionné dans la section 6.1.2, la présence de certains éléments clés dans la région promotrice de HCaRG suggère que ce dernier pourrait être impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN en induisant l'arrêt des cellules en G2. Il serait ainsi intéressant d'étudier l'effet de différents agents mutagènes (radiations ionisantes, les ultraviolets et le méthyle méthanesulfonate) sur l'expression de HCaRG et sur l'activité de son promoteur. Comme plusieurs voies induisant des arrêts en G2 en réponse à des dommages spécifiques à l'ADN existent pour protéger le génome, tous les agents mutagènes n'impliqueront pas nécessairement HCaRG.

6.3.2 Effet de HCaRG dans les VSMC

Les études visant à déterminer la fonction de HCaRG ont été effectuées en utilisant un modèle de cellules rénales, les HEK293. Cependant, les fonctions possibles de HCaRG au niveau de la migration cellulaire méritent d'être évaluées dans d'autres

types de cellules. En effet, la motilité cellulaire n'est pas unique aux cellules rénales et de son côté, HCaRG est exprimé dans plusieurs autres tissus et ses niveaux d'ARNm sont plus élevés chez les rats hypertendus que les normotendus. Un modèle pertinent dans l'étude des maladies cardiovasculaires pourrait être les cellules de muscle lisse vasculaire (VSMC).

La formation de la néointima est un événement important dans les stades précoces du développement de l'athérosclérose et dans la resténose suivant une angioplastie ou l'implantation d'une prothèse endovasculaire. La formation de la néointima nécessite la migration des VSMC de la média vers l'intima. Les VSMC qui possèdent la capacité de migrer expriment deux récepteurs de l'acide hyaluronique importants pour leur motilité, soit CD44 et RHAMM et on observe une augmentation de la production de fibronectine (173;350). Or, nos études montrent que les cellules rénales surexprimant HCaRG ont une expression élevée de la fibronectine.

Afin d'évaluer si HCaRG a un effet sur le phénotype migratoire et sur l'adhésion des VSMC, des expériences de migration *in vitro* peuvent être effectuées, un peu comme ce qui a déjà été fait avec les cellules rénales. Il serait aussi possible de mesurer l'expression de HCaRG après la dénudation de l'artère carotidienne chez le rat. Comme cette lésion entraîne la prolifération et la migration des VSMC, nous pourrions nous attendre à observer un déclin des taux d'ARNm de HCaRG pendant la prolifération et à une augmentation pendant la migration.

Chapitre 7

Conclusion

7.0 Hypothèse expliquant la régulation de l'expression et la fonction de HCaRG

La dernière section de cette thèse propose un modèle expliquant comment l'expression de HCaRG peut être régulée et quelles peuvent être les fonctions de HCaRG au niveau cellulaire et ses conséquences physio/pathologiques (figure 7.1).

L'expression de HCaRG est contrôlée par différents mécanismes. En effet, HCaRG est sous le contrôle négatif du calcium extracellulaire, de même que de l'hyperosmolarité et/ou du NaCl. De plus, son expression pourrait être influencée de façon épigénétique par la méthylation d'une partie de sa région promotrice, de son premier exon et d'une partie de son intron. Des expériences effectuées dans notre laboratoire ont montré une interaction entre HCaRG et l'actine (résultats non-présentés dans cette thèse). Cette interaction pourrait être responsable de la majorité des effets de HCaRG au niveau cellulaire. En effet, le cytosquelette d'actine et ses protéines associées ont été impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la régulation de l'expression des gènes, l'activité des transporteurs ioniques, l'adhésion et la migration cellulaire (149;351-353). Ainsi, par "microarray", nous avons montré que les niveaux d'ARNm de plusieurs gènes étaient modifiés dans les cellules surexprimant HCaRG. Bien qu'absent du schéma de la figure 7.1, il ne faut pas oublier que HCaRG pourrait aussi avoir un effet direct sur l'expression des gènes. Les gènes dont l'expression est modifiée par la surexpression de HCaRG codent pour des protéines impliquées dans la formation de lamellipodes, l'adhésion,

l'arrêt des cellules en G2M et le transport ionique. La structure du cytosquelette d'actine peut aussi influencer directement ces fonctions et HCaRG, en s'y liant peut y jouer un rôle clé. La formation de lamellipodes et l'adhésion sont toutes deux essentielles à la motilité cellulaire. Les cellules surexprimant HCaRG présentent des lamellipodes et une meilleure adhésion, associées à une augmentation de leur capacité migratoire. Or, la migration peut être bénéfique dans la réparation des lésions rénales mais peut aussi contribuer à la formation de métastases. En plus de causer une augmentation d'expression de certains transporteurs et canaux ioniques, HCaRG peut interagir avec le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (NKCC2), la pompe Na^+/K^+ -ATPase et le canal K^+ dépendant du voltage (résultats non-présentés dans cette thèse). Des changements au niveau de la composition ionique peuvent influencer la prolifération et la différenciation des cellules de même que la migration cellulaire.

Les résultats présentés suggèrent un rôle important pour HCaRG dans les cellules rénales. Il serait cependant intéressant d'évaluer si HCaRG peut avoir des effets similaires dans d'autres types cellulaires et ainsi intervenir dans d'autres fonctions physiologiques ou pathologiques.

**Modèle général pour expliquer la régulation
de l'expression et le rôle physiopathologique de HCaRG**

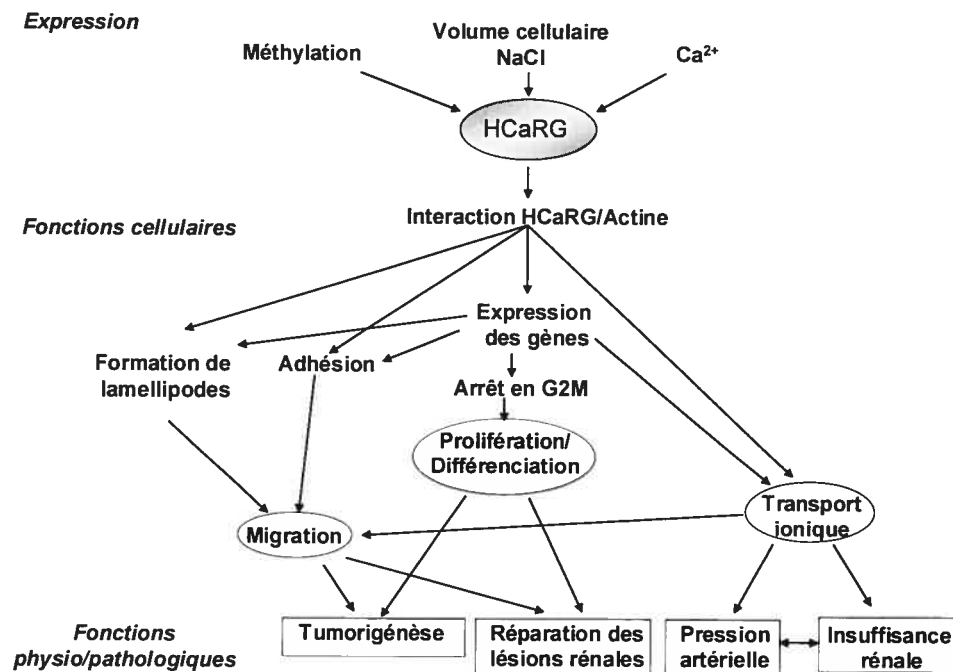


Figure 7.1 Hypothèse quant à la régulation de l'expression et les fonctions de HCaRG.

Bibliographie

1. Guyton,A.C. and Hall,J.E. 1996. Textbook of Medical Physiology (ninth edition). W.B. Saunders Company, Philadelphia.
2. Feraille,E. and Doucet,A. 2001. Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control. *Physiol Rev.* 81:345-418.
3. Unger,T. 2002. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 89:3A-9A.
4. Izzo,J.L., Black,H.R., and Council on High Blood Pressure Research,A.H.A. 1999. Hypertension Primer, The essentials of High Blood Pressure. Lippincott Williams and Wilkins.
5. Vesely,D.L. 2003. Natriuretic peptides and acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F167-F177.
6. Beltowski,J. and Wojcicka,G. 2002. Regulation of renal tubular sodium transport by cardiac natriuretic peptides: two decades of research. *Med.Sci.Monit.* 8:RA39-RA52.

7. Zeidel,M.L., Kikeri,D., Silva,P., Burrowes,M., and Brenner,B.M. 1988. Atrial natriuretic peptides inhibit conductive sodium uptake by rabbit inner medullary collecting duct cells. *J Clin Invest* 82:1067-1074.
8. Schrier,R.W., Wang,W., Poole,B., and Mitra,A. 2004. Acute renal failure: definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114:5-14.
9. Lameire,N. and Vanholder,R. 2001. Pathophysiologic features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol* 12 Suppl 17:S20-S32.
10. Nony,P.A. and Schnellmann,R.G. 2003. Mechanisms of renal cell repair and regeneration after acute renal failure. *J Pharmacol.Exp Ther.* 304:905-912.
11. Bonventre,J.V. 2003. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14 Suppl 1:S55-S61.
12. Oparil,S. and Weber,M.S. 2000. Hypertension: A Companion to Brenner and Rector's The Kidney. Philadelphia.
13. Flack,J.M., Peters,R., Shafi,T., Alrefai,H., Nasser,S.A., and Crook,E. 2003. Prevention of hypertension and its complications: theoretical basis and guidelines for treatment. *J Am Soc Nephrol* 14:S92-S98.

14. Wallfelt,C., Lindh,E., Larsson,R., Johansson,H., Rastad,J., Akerstrom,G., and Gylfe,E. 1988. Kinetic evidence for cytoplasmic calcium as an inhibitory messenger in parathyroid hormone release. *Biochim.Biophys.Acta* 969:257-262.
15. Agus,Z.S., Gardner,L.B., Beck,L.H., and Goldberg,M. 1973. Effects of parathyroid hormone on renal tubular reabsorption of calcium, sodium, and phosphate. *Am J Physiol* 224:1143-1148.
16. Okada,Y., Montero,A., Zhang,X., Sobue,T., Lorenzo,J., Doetschman,T., Coffin,J.D., and Hurley,M.M. 2003. Impaired osteoclast formation in bone marrow cultures of Fgf2 null mice in response to parathyroid hormone. *J Biol Chem* 278:21258-21266.
17. Okada,Y., Morimoto,I., Ura,K., Watanabe,K., Eto,S., Kumegawa,M., Raisz,L., Pilbeam,C., and Tanaka,Y. 2002. Cell-to-Cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1alpha,25(OH)2D3, PTH and IL-1alpha-induced osteoclast differentiation and bone resorption. *Endocr.J* 49:483-495.
18. Qin,L., Qiu,P., Wang,L., Li,X., Swarthout,J.T., Soteropoulos,P., Tolias,P., and Partridge,N.C. 2003. Gene expression profiles and transcription factors involved in parathyroid hormone signaling in osteoblasts revealed by microarray and bioinformatics. *J Biol Chem* 278:19723-19731.

19. Fraser,D.R. and Kodicek,E. 1973. Regulation of 25-hydroxycholecalciferol-1-hydroxylase activity in kidney by parathyroid hormone. *Nat.New Biol* 241:163-166.
20. Walters,M.R. 1992. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocr.Rev.* 13:719-764.
21. Brown,E.M. 1991. Extracellular Ca²⁺ sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca²⁺ and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev.* 71:371-411.
22. Austin,L.A. and Heath,H., III. 1981. Calcitonin: physiology and pathophysiology. *N.Engl.J Med.* 304:269-278.
23. Brown,E.M. and MacLeod,R.J. 2001. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev.* 81:239-297.
24. Hory,B. 1999. [The key to the calcium regulation and calcium metabolism: G protein coupled membrane calcium receptor]. *Presse Med.* 28:1477-1482.
25. Hebert,S.C. and Brown,E.M. 1995. The extracellular calcium receptor. *Curr.Opin.Cell Biol* 7:484-492.

26. McNeil,S.E., Hobson,S.A., Nipper,V., and Rodland,K.D. 1998. Functional calcium-sensing receptors in rat fibroblasts are required for activation of SRC kinase and mitogen-activated protein kinase in response to extracellular calcium. *J Biol Chem* 273:1114-1120.
27. Kifor,O., Diaz,R., Butters,R., and Brown,E.M. 1997. The Ca²⁺-sensing receptor (CaR) activates phospholipases C, A2, and D in bovine parathyroid and CaR-transfected, human embryonic kidney (HEK293) cells. *J Bone Miner.Res.* 12:715-725.
28. Brown,A.J., Zhong,M., Finch,J., Ritter,C., McCracken,R., Morrissey,J., and Slatopolsky,E. 1996. Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium. *Am J Physiol* 270:F454-F460.
29. Chattopadhyay,N., Baum,M., Bai,M., Riccardi,D., Hebert,S.C., Harris,H.W., and Brown,E.M. 1996. Ontogeny of the extracellular calcium-sensing receptor in rat kidney. *Am J Physiol* 271:F736-F743.
30. Chattopadhyay,N., Legradi,G., Bai,M., Kifor,O., Ye,C., Vassilev,P.M., Brown,E.M., and Lechan,R.M. 1997. Calcium-sensing receptor in the rat hippocampus: a developmental study. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 100:13-21.

31. Mathias,R.S., Nguyen,H.T., Zhang,M.Y., and Portale,A.A. 1998. Reduced expression of the renal calcium-sensing receptor in rats with experimental chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol* 9:2067-2074.
32. Gogusev,J., Duchambon,P., Hory,B., Giovannini,M., Goureau,Y., Sarfati,E., and Drueke,T.B. 1997. Depressed expression of calcium receptor in parathyroid gland tissue of patients with hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 51:328-336.
33. Brown,E.M. 1997. Mutations in the calcium-sensing receptor and their clinical implications. *Horm.Res.* 48:199-208.
34. Rogers,K.V., Dunn,C.K., Hebert,S.C., and Brown,E.M. 1997. Localization of calcium receptor mRNA in the adult rat central nervous system by in situ hybridization. *Brain Res.* 744:47-56.
35. Brown,E.M. and Hebert,S.C. 1995. A cloned Ca(2+)-sensing receptor: a mediator of direct effects of extracellular Ca²⁺ on renal function? *J Am Soc Nephrol* 6:1530-1540.
36. Ray,J.M., Squires,P.E., Curtis,S.B., Meloche,M.R., and Buchan,A.M. 1997. Expression of the calcium-sensing receptor on human antral gastrin cells in culture. *J Clin Invest* 99:2328-2333.

37. Ferry,S., Chatel,B., Dodd,R.H., Lair,C., Gully,D., Maffrand,J.P., and Ruat,M. 1997. Effects of divalent cations and of a calcimimetic on adrenocorticotrophic hormone release in pituitary tumor cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 238:866-873.
38. Leclercq-Meyer,V., Marchand,J., Leclercq,R., and Malaisse,W.J. 1981. Calcium deprivation enhances glucagon release in the presence of 2-ketoisocaproate. *Endocrinology* 108:2093-2097.
39. Romoli,R., Lania,A., Mantovani,G., Corbetta,S., Persani,L., and Spada,A. 1999. Expression of calcium-sensing receptor and characterization of intracellular signaling in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol.Metab* 84:2848-2853.
40. Fray,J.C., Park,C.S., and Valentine,A.N. 1987. Calcium and the control of renin secretion. *Endocr.Rev.* 8:53-93.
41. Ho,C., Conner,D.A., Pollak,M.R., Ladd,D.J., Kifor,O., Warren,H.B., Brown,E.M., Seidman,J.G., and Seidman,C.E. 1995. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat.Genet.* 11:389-394.
42. Kallay,E., Kifor,O., Chattopadhyay,N., Brown,E.M., Bischof,M.G., Peterlik,M., and Cross,H.S. 1997. Calcium-dependent c-myc proto-oncogene

expression and proliferation of Caco-2 cells: a role for a luminal extracellular calcium-sensing receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 232:80-83.

43. Pillai,S., Bikle,D.D., Mancianti,M.L., Cline,P., and Hincenbergs,M. 1990. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol* 143:294-302.
44. Cheng,I., Klingensmith,M.E., Chattopadhyay,N., Kifor,O., Butters,R.R., Soybel,D.I., and Brown,E.M. 1998. Identification and localization of the extracellular calcium-sensing receptor in human breast. *J Clin Endocrinol.Metab* 83:703-707.
45. Lin,K.I., Chattopadhyay,N., Bai,M., Alvarez,R., Dang,C.V., Baraban,J.M., Brown,E.M., and Ratan,R.R. 1998. Elevated extracellular calcium can prevent apoptosis via the calcium-sensing receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 249:325-331.
46. Godwin,S.L. and Soltoff,S.P. 1997. Extracellular calcium and platelet-derived growth factor promote receptor-mediated chemotaxis in osteoblasts through different signaling pathways. *J Biol Chem* 272:11307-11312.
47. Yamaguchi,T., Chattopadhyay,N., Kifor,O., and Brown,E.M. 1998. Extracellular calcium ($Ca^{2+}(o)$)-sensing receptor in a murine bone marrow-

derived stromal cell line (ST2): potential mediator of the actions of Ca^{2+} on the function of ST2 cells. *Endocrinology* 139:3561-3568.

48. Yamaguchi,T., Kifor,O., Chattopadhyay,N., Bai,M., and Brown,E.M. 1998. Extracellular calcium (Ca^{2+})-sensing receptor in a mouse monocyte-macrophage cell line (J774): potential mediator of the actions of Ca^{2+} on the function of J774 cells. *J Bone Miner.Res.* 13:1390-1397.
49. Russell,J., Bar,A., Sherwood,L.M., and Hurwitz,S. 1993. Interaction between calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in the regulation of preproparathyroid hormone and vitamin D receptor messenger ribonucleic acid in avian parathyroids. *Endocrinology* 132:2639-2644.
50. Suzuki,K., Lavaroni,S., Mori,A., Okajima,F., Kimura,S., Katoh,R., Kawaoi,A., and Kohn,L.D. 1998. Thyroid transcription factor 1 is calcium modulated and coordinately regulates genes involved in calcium homeostasis in C cells. *Mol.Cell Biol* 18:7410-7422.
51. Juhlin,C., Holmdahl,R., Johansson,H., Rastad,J., Akerstrom,G., and Klareskog,L. 1987. Monoclonal antibodies with exclusive reactivity against parathyroid cells and tubule cells of the kidney. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:2990-2994.

52. Cui,S., Verroust,P.J., Moestrup,S.K., and Christensen,E.I. 1996. Megalin/gp330 mediates uptake of albumin in renal proximal tubule. *Am J Physiol* 271:F900-F907.
53. Orlando,R.A., Rader,K., Authier,F., Yamazaki,H., Posner,B.I., Bergeron,J.J., and Farquhar,M.G. 1998. Megalin is an endocytic receptor for insulin. *J Am Soc Nephrol* 9:1759-1766.
54. Christensen,E.I., Moskaug,J.O., Vorum,H., Jacobsen,C., Gundersen,T.E., Nykjaer,A., Blomhoff,R., Willnow,T.E., and Moestrup,S.K. 1999. Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol* 10:685-695.
55. Christensen,E.I. and Willnow,T.E. 1999. Essential role of megalin in renal proximal tubule for vitamin homeostasis. *J Am Soc Nephrol* 10:2224-2236.
56. Juhlin,C., Johansson,H., Holmdahl,R., Gylfe,E., Larsson,R., Rastad,J., Akerstrom,G., and Klareskog,L. 1987. Monoclonal anti-parathyroid antibodies interfering with a Ca²⁺-sensor of human parathyroid cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 143:570-574.
57. Juhlin,C., Klareskog,L., Nygren,P., Ljunghall,S., Gylfe,E., Rastad,J., and Akerstrom,G. 1988. Hyperparathyroidism is associated with reduced

- expression of a parathyroid calcium receptor mechanism defined by monoclonal antiparathyroid antibodies. *Endocrinology* 122:2999-3001.
58. Okazaki,T., Zajac,J.D., Igarashi,T., Ogata,E., and Kronenberg,H.M. 1991. Negative regulatory elements in the human parathyroid hormone gene. *J Biol Chem* 266:21903-21910.
59. Okazaki,T., Chung,U., Nishishita,T., Ebisu,S., Usuda,S., Mishiro,S., Xanthoudakis,S., Igarashi,T., and Ogata,E. 1994. A redox factor protein, ref1, is involved in negative gene regulation by extracellular calcium. *J Biol Chem* 269:27855-27862.
60. Kuninger,D.T., Izumi,T., Papaconstantinou,J., and Mitra,S. 2002. Human AP-endonuclease 1 and hnRNP-L interact with a nCaRE-like repressor element in the AP-endonuclease 1 promoter. *Nucleic Acids Res.* 30:823-829.
61. Fuchs,S., Philippe,J., Corvol,P., and Pinet,F. 2003. Implication of Ref-1 in the repression of renin gene transcription by intracellular calcium. *J Hypertens.* 21:327-335.
62. Bhakat,K.K., Izumi,T., Yang,S.H., Hazra,T.K., and Mitra,S. 2003. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *EMBO J* 22:6299-6309.

63. Izumi,T., Henner,W.D., and Mitra,S. 1996. Negative regulation of the major human AP-endonuclease, a multifunctional protein. *Biochemistry* 35:14679-14683.
64. McHaffie,G.S. and Ralston,S.H. 1995. Origin of a negative calcium response element in an ALU-repeat: implications for regulation of gene expression by extracellular calcium. *Bone* 17:11-14.
65. Lau,K., Thomas,D., and Eby,B. 1986. The nature and role of disturbances in calcium metabolism in genetic hypertension. *Fed.Proc.* 45:2752-2757.
66. McCarron,D.A. 1989. Calcium metabolism and hypertension. *Kidney Int.* 35:717-736.
67. Schleiffer,R. 1992. Parathyroid hormone and genetic hypertension. *Int.J Cardiol.* 35:303-310.
68. Dumas,P., Tremblay,J., and Hamet,P. 1994. Stress modulation by electrolytes in salt-sensitive spontaneously hypertensive rats. *Am J Med.Sci.* 307 Suppl 1:S130-S137.
69. Sowers,J.R., Zemel,M.B., Zemel,P.C., and Standley,P.R. 1991. Calcium metabolism and dietary calcium in salt sensitive hypertension. *Am J Hypertens.* 4:557-563.

70. MacGregor,G.A. and Cappuccio,F.P. 1993. The kidney and essential hypertension: a link to osteoporosis? *J Hypertens.* 11:781-785.
71. Tsuda,K., Tsuda,S., Minatogawa,Y., Iwahashi,H., Kido,R., and Masuyama,Y. 1988. Decreased membrane fluidity of erythrocytes and cultured vascular smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats: an electron spin resonance study. *Clin Sci.(Lond)* 75:477-480.
72. Tsuda,K., Nishio,I., and Masuyama,Y. 1997. The role of sodium-potassium adenosine triphosphatase in the regulation of membrane fluidity of erythrocytes in spontaneously hypertensive rats: an electron paramagnetic resonance investigation. *Am J Hypertens.* 10:1411-1414.
73. Bendhack,L.M., Sharma,R.V., and Bhalla,R.C. 1992. Altered signal transduction in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 19:II142-II148.
74. Touyz,R.M. and Milne,F.J. 1995. Alterations in intracellular cations and cell membrane ATPase activity in patients with malignant hypertension. *J Hypertens.* 13:867-874.
75. Cortes,S.F., Lemos,V.S., and Stoclet,J.C. 1997. Alterations in calcium stores in aortic myocytes from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29:1322-1328.

76. Pang,P.K., Benishin,C.G., Shan,J., and Lewanczuk,R.Z. 1994. PHF: the new parathyroid hypertensive factor. *Blood Press* 3:148-155.
77. Ferraris,J.D., Williams,C.K., Martin,B.M., Burg,M.B., and Garcia-Perez,A. 1994. Cloning, genomic organization, and osmotic response of the aldose reductase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91:10742-10746.
78. O'Neill,W.C. 1999. Physiological significance of volume-regulatory transporters. *Am J Physiol* 276:C995-C1011.
79. Burg,M.B., Kwon,E.D., and Kultz,D. 1997. Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annu.Rev.Physiol* 59:437-455.
80. Okazaki,T., Ishikawa,T., Nishimori,S., Igarashi,T., Hata,K., and Fujita,T. 1997. Hyperosmolarity-induced gene stimulation is mediated by the negative calcium responsive element. *J Biol Chem* 272:32274-32279.
81. Santos,B.C., Pullman,J.M., Chevaile,A., Welch,W.J., and Gullans,S.R. 2003. Chronic hyperosmolarity mediates constitutive expression of molecular chaperones and resistance to injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F564-F574.

82. Waldegger,S., Steuer,S., Risler,T., Heidland,A., Capasso,G., Massry,S., and Lang,F. 1998. Mechanisms and clinical significance of cell volume regulation. *Nephrol Dial.Transplant.* 13:867-874.
83. Burg,M.B. 2002. Response of renal inner medullary epithelial cells to osmotic stress. *Comp Biochem.Physiol A Mol.Integr.Physiol* 133:661-666.
84. Dmitrieva,N.I., Bulavin,D.V., Fornace,A.J., Jr., and Burg,M.B. 2002. Rapid activation of G2/M checkpoint after hypertonic stress in renal inner medullary epithelial (IME) cells is protective and requires p38 kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:184-189.
85. Michea,L., Ferguson,D.R., Peters,E.M., Andrews,P.M., Kirby,M.R., and Burg,M.B. 2000. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 278:F209-F218.
86. Kultz,D., Madhany,S., and Burg,M.B. 1998. Hyperosmolality causes growth arrest of murine kidney cells. Induction of GADD45 and GADD153 by osmosensing via stress-activated protein kinase 2. *J Biol Chem* 273:13645-13651.
87. Chakravarty,D., Cai,Q., Ferraris,J.D., Michea,L., Burg,M.B., and Kultz,D. 2002. Three GADD45 isoforms contribute to hypertonic stress phenotype of

- murine renal inner medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 283:F1020-F1029.
88. Dunham,P.B., Jessen,F., and Hoffmann,E.K. 1990. Inhibition of Na-K-Cl cotransport in Ehrlich ascites cells by antiserum against purified proteins of the cotransporter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:6828-6832.
 89. Geck,P. and Pfeiffer,B. 1985. Na⁺ + K⁺ + 2Cl⁻ cotransport in animal cells--its role in volume regulation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 456:166-182.
 90. Grinstein,S., Clarke,C.A., and Rothstein,A. 1983. Activation of Na⁺/H⁺ exchange in lymphocytes by osmotically induced volume changes and by cytoplasmic acidification. *J Gen.Physiol* 82:619-638.
 91. Lang,F., Busch,G.L., Ritter,M., Volkl,H., Waldegger,S., Gulbins,E., and Haussinger,D. 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev.* 78:247-306.
 92. Chan,H.C. and Nelson,D.J. 1992. Chloride-dependent cation conductance activated during cellular shrinkage. *Science* 257:669-671.
 93. Cabado,A.G., Vieytes,M.R., and Botana,L.M. 1994. Effect of ion composition on the changes in membrane potential induced with several stimuli in rat mast cells. *J Cell Physiol* 158:309-316.

94. Volk,T., Fromter,E., and Korbmacher,C. 1995. Hypertonicity activates nonselective cation channels in mouse cortical collecting duct cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92:8478-8482.
95. Wehner,F., Sauer,H., and Kinne,R.K. 1995. Hypertonic stress increases the Na⁺ conductance of rat hepatocytes in primary culture. *J Gen.Physiol* 105:507-535.
96. Lang,F., Busch,G.L., Zempel,G., Ditlevsen,J., Hoch,M., Emerich,U., Axel,D., Fingerle,J., Meierkord,S., Apfel,H. *et al.* 1995. Ca²⁺ entry and vasoconstriction during osmotic swelling of vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 431:253-258.
97. McManus,M.L., Churchwell,K.B., and Strange,K. 1995. Regulation of cell volume in health and disease. *N.Engl.J Med.* 333:1260-1266.
98. Burg,M.B. 1995. Molecular basis of osmotic regulation. *Am J Physiol* 268:F983-F996.
99. Burger-Kentischer,A., Muller,E., Marz,J., Fraek,M.L., Thurau,K., and Beck,F.X. 1999. Hypertonicity-induced accumulation of organic osmolytes in papillary interstitial cells. *Kidney Int.* 55:1417-1425.

100. Kojima,R., Randall,J.D., Ito,E., Manshio,H., Suzuki,Y., and Gullans,S.R. 2004. Regulation of expression of the stress response gene, *Osp94*: identification of the tonicity response element and intracellular signalling pathways. *Biochem.J* 380:783-794.
101. Burg,M.B. and Garcia-Perez,A. 1992. How tonicity regulates gene expression. *J Am Soc Nephrol* 3:121-127.
102. Sheikh-Hamad,D., Garcia-Perez,A., Ferraris,J.D., Peters,E.M., and Burg,M.B. 1994. Induction of gene expression by heat shock versus osmotic stress. *Am J Physiol* 267:F28-F34.
103. Warntges,S., Grone,H.J., Capasso,G., and Lang,F. 2001. Cell volume regulatory mechanisms in progression of renal disease. *J Nephrol* 14:319-326.
104. Uchida,S., Garcia-Perez,A., Murphy,H., and Burg,M. 1989. Signal for induction of aldose reductase in renal medullary cells by high external NaCl. *Am J Physiol* 256:C614-C620.
105. Bell,L.M., Leong,M.L., Kim,B., Wang,E., Park,J., Hemmings,B.A., and Firestone,G.L. 2000. Hyperosmotic stress stimulates promoter activity and regulates cellular utilization of the serum- and glucocorticoid-inducible

- protein kinase (Sgk) by a p38 MAPK-dependent pathway. *J Biol Chem* 275:25262-25272.
106. Ochi,H., Masuda,J., and Gimbrone,M.A. 2002. Hyperosmotic stimuli inhibit VCAM-1 expression in cultured endothelial cells via effects on interferon regulatory factor-1 expression and activity. *Eur J Immunol.* 32:1821-1831.
107. Baudouin-Legros,M., Brouillard,F., Cougnon,M., Tondelier,D., Leclerc,T., and Edelman,A. 2000. Modulation of CFTR gene expression in HT-29 cells by extracellular hyperosmolarity. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C49-C56.
108. Ferraris,J.D., Williams,C.K., Persaud,P., Zhang,Z., Chen,Y., and Burg,M.B. 2002. Activity of the TonEBP/OREBP transactivation domain varies directly with extracellular NaCl concentration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:739-744.
109. Bai,L., Collins,J.F., Muller,Y.L., Xu,H., Kiela,P.R., and Ghishan,F.K. 1999. Characterization of cis-elements required for osmotic response of rat Na(+)/H(+) exchanger-2 (NHE-2) gene. *Am J Physiol* 277:R1112-R1119.
110. Matsuda,S., Kawasaki,H., Moriguchi,T., Gotoh,Y., and Nishida,E. 1995. Activation of protein kinase cascades by osmotic shock. *J Biol Chem* 270:12781-12786.

111. Umenishi,F. and Schrier,R.W. 2003. Hypertonicity-induced aquaporin-1 (AQP1) expression is mediated by the activation of MAPK pathways and hypertonicity-responsive element in the AQP1 gene. *J Biol Chem* 278:15765-15770.
112. Bode,J.G., Gatsios,P., Ludwig,S., Rapp,U.R., Haussinger,D., Heinrich,P.C., and Graeve,L. 1999. The mitogen-activated protein (MAP) kinase p38 and its upstream activator MAP kinase kinase 6 are involved in the activation of signal transducer and activator of transcription by hyperosmolarity. *J Biol Chem* 274:30222-30227.
113. Gatsios,P., Terstegen,L., Schliess,F., Haussinger,D., Kerr,I.M., Heinrich,P.C., and Graeve,L. 1998. Activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway by osmotic shock. *J Biol Chem* 273:22962-22968.
114. Lang,F., Klingel,K., Wagner,C.A., Stegen,C., Warntges,S., Friedrich,B., Lanzendorfer,M., Melzig,J., Moschen,I., Steuer,S. *et al.* 2000. Deranged transcriptional regulation of cell-volume-sensitive kinase hSGK in diabetic nephropathy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97:8157-8162.
115. Strazzullo,P., Galletti,F., and Barba,G. 2003. Altered renal handling of sodium in human hypertension: short review of the evidence. *Hypertension* 41:1000-1005.

116. Guyton,A.C. 1989. Dominant role of the kidneys and accessory role of whole-body autoregulation in the pathogenesis of hypertension. *Am J Hypertens.* 2:575-585.
117. Hall,J.E., Guyton,A.C., and Brands,M.W. 1996. Pressure-volume regulation in hypertension. *Kidney Int.Suppl* 55:S35-S41.
118. Tripodi,G., Valtorta,F., Torielli,L., Chierregatti,E., Salardi,S., Trusolino,L., Menegon,A., Ferrari,P., Marchisio,P.C., and Bianchi,G. 1996. Hypertension-associated point mutations in the adducin alpha and beta subunits affect actin cytoskeleton and ion transport. *J Clin Invest* 97:2815-2822.
119. Manunta,P., Burnier,M., D'Amico,M., Buzzi,L., Maillard,M., Barlassina,C., Lanella,G., Cusi,D., and Bianchi,G. 1999. Adducin polymorphism affects renal proximal tubule reabsorption in hypertension. *Hypertension* 33:694-697.
120. Chambers,S.M. and Morris,B.J. 1996. Glucagon receptor gene mutation in essential hypertension. *Nat.Genet.* 12:122.
121. Bankir,L., Ahloulay,M., Devreotes,P.N., and Parent,C.A. 2002. Extracellular cAMP inhibits proximal reabsorption: are plasma membrane cAMP receptors involved? *Am J Physiol Renal Physiol* 282:F376-F392.

122. Hatton,D.C. and McCarron,D.A. 1994. Dietary calcium and blood pressure in experimental models of hypertension. A review. *Hypertension* 23:513-530.
123. Coruzzi,P., Biggi,A., Musiari,L., Ceriati,R., Mossini,G.L., Guerra,A., and Novarini,A. 1993. Calcium and sodium handling during volume expansion in essential hypertension. *Metabolism* 42:1331-1335.
124. Hamet,P., Daignault-Gelinas,M., Lambert,J., Ledoux,M., Whissell-Cambiotti,L., Bellavance,F., and Mongeau,E. 1992. Epidemiological evidence of an interaction between calcium and sodium intake impacting on blood pressure. A Montreal study. *Am J Hypertens.* 5:378-385.
125. Bishop,A.L. and Hall,A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem.J* 348 Pt 2:241-255.
126. Ridley,A.J. 2001. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci.* 114:2713-2722.
127. Feldner,J.C. and Brandt,B.H. 2002. Cancer cell motility--on the road from c-erbB-2 receptor steered signaling to actin reorganization. *Exp Cell Res.* 272:93-108.

128. Giancotti,F.G. and Tarone,G. 2003. Positional control of cell fate through joint integrin/receptor protein kinase signaling. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol* 19:173-206.
129. Sewell,J.M., Smyth,J.F., and Langdon,S.P. 2005. Role of TGF alpha stimulation of the ERK, PI3 kinase and PLC gamma pathways in ovarian cancer growth and migration. *Exp Cell Res.* 304:305-316.
130. Banno,Y., Nakashima,T., Kumada,T., Ebisawa,K., Nonomura,Y., and Nozawa,Y. 1992. Effects of gelsolin on human platelet cytosolic phosphoinositide-phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 267:6488-6494.
131. Chen,P., Xie,H., Sekar,M.C., Gupta,K., and Wells,A. 1994. Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *J Cell Biol* 127:847-857.
132. Kruger,J.S. and Reddy,K.B. 2003. Distinct mechanisms mediate the initial and sustained phases of cell migration in epidermal growth factor receptor-overexpressing cells. *Mol.Cancer Res.* 1:801-809.
133. Iwabu,A., Smith,K., Allen,F.D., Lauffenburger,D.A., and Wells,A. 2004. Epidermal growth factor induces fibroblast contractility and motility via a protein kinase C delta-dependent pathway. *J Biol Chem* 279:14551-14560.

134. Kurokawa,K., Itoh,R.E., Yoshizaki,H., Nakamura,Y.O., and Matsuda,M. 2004. Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Mol.Biol Cell* 15:1003-1010.
135. Nabi,I.R. 1999. The polarization of the motile cell. *J Cell Sci.* 112 (Pt 12):1803-1811.
136. Pollard,T.D., Blanchoin,L., and Mullins,R.D. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 29:545-576.
137. Wittmann,T. and Waterman-Storer,C.M. 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci.* 114:3795-3803.
138. Palecek,S.P., Loftus,J.C., Ginsberg,M.H., Lauffenburger,D.A., and Horwitz,A.F. 1997. Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* 385:537-540.
139. Holly,S.P., Larson,M.K., and Parise,L.V. 2000. Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res.* 261:69-74.
140. Petit,V. and Thiery,J.P. 2000. Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 92:477-494.

141. Darnell,J., Lodish,H., and Baltimore,D. 1993. *Biologie Moléculaire de la Cellule* (Deuxième édition). De Boeck-Wesmael.
142. Miranti,C.K. and Brugge,J.S. 2002. Sensing the environment: a historical perspective on integrin signal transduction. *Nat.Cell Biol* 4:E83-E90.
143. Giancotti,F.G. and Ruoslahti,E. 1999. Integrin signaling. *Science* 285:1028-1032.
144. Dedieu,S., Poussard,S., Mazeres,G., Grise,F., Dargelos,E., Cottin,P., and Brustis,J.J. 2004. Myoblast migration is regulated by calpain through its involvement in cell attachment and cytoskeletal organization. *Exp Cell Res.* 292:187-200.
145. Cornillon,J., Campos,L., and Guyotat,D. 2003. [Focal adhesion kinase (FAK), a multifunctional protein]. *Med.Sci.(Paris)* 19:743-752.
146. Zamir,E. and Geiger,B. 2001. Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions. *J Cell Sci.* 114:3583-3590.
147. Palecek,S.P., Schmidt,C.E., Lauffenburger,D.A., and Horwitz,A.F. 1996. Integrin dynamics on the tail region of migrating fibroblasts. *J Cell Sci.* 109 (Pt 5):941-952.

148. Webb,D.J., Donais,K., Whitmore,L.A., Thomas,S.M., Turner,C.E., Parsons,J.T., and Horwitz,A.F. 2004. FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat. Cell Biol* 6:154-161.
149. Schwab,A. 2001. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *Am J Physiol Renal Physiol* 280:F739-F747.
150. Levite,M., Cahalon,L., Peretz,A., Hershkovic,R., Sobko,A., Ariel,A., Desai,R., Attali,B., and Lider,O. 2000. Extracellular K(+) and opening of voltage-gated potassium channels activate T cell integrin function: physical and functional association between Kv1.3 channels and beta1 integrins. *J Exp Med*. 191:1167-1176.
151. Hofmann,G., Bernabei,P.A., Crociani,O., Cherubini,A., Guasti,L., Pillozzi,S., Lastraioli,E., Polvani,S., Bartolozzi,B., Solazzo,V. *et al.* 2001. HERG K⁺ channels activation during beta(1) integrin-mediated adhesion to fibronectin induces an up-regulation of alpha(v)beta(3) integrin in the preosteoclastic leukemia cell line FLG 29.1. *J Biol Chem* 276:4923-4931.
152. Rao,J.N., Platoshyn,O., Li,L., Guo,X., Golovina,V.A., Yuan,J.X., and Wang,J.Y. 2002. Activation of K(+) channels and increased migration of differentiated intestinal epithelial cells after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C885-C898.

153. Wang,J.Y., Wang,J., Golovina,V.A., Li,L., Platoshyn,O., and Yuan,J.X. 2000. Role of K(+) channel expression in polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C303-C314.
154. Soroceanu,L., Manning,T.J., Jr., and Sontheimer,H. 1999. Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers. *J Neurosci.* 19:5942-5954.
155. McDaniel,N. and Lytle,C. 1999. Parietal cells express high levels of Na-K-2Cl cotransporter on migrating into the gastric gland neck. *Am J Physiol* 276:G1273-G1278.
156. Bereiter-Hahn,J. and Voth,M. 1988. Ionic control of locomotion and shape of epithelial cells: II. Role of monovalent cations. *Cell Motil.Cytoskeleton* 10:528-536.
157. Tian,Y.C., Fraser,D., Attisano,L., and Phillips,A.O. 2003. TGF-beta1-mediated alterations of renal proximal tubular epithelial cell phenotype. *Am J Physiol Renal Physiol* 285:F130-F142.
158. Counts,R.S., Nowak,G., Wyatt,R.D., and Schnellmann,R.G. 1995. Nephrotoxicant inhibition of renal proximal tubule cell regeneration. *Am J Physiol* 269:F274-F281.

159. Lala,P.K. and Chakraborty,C. 2003. Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. *Placenta* 24:575-587.
160. Schwartzkroin,P.A. and Walsh,C.A. 2000. Cortical malformations and epilepsy. *Ment.Retard.Dev.Disabil.Res.Rev.* 6:268-280.
161. Roviezzo,F., Del Galdo,F., Abbate,G., Bucci,M., D'Agostino,B., Antunes,E., De Dominicis,G., Parente,L., Rossi,F., Cirino,G. *et al.* 2004. Human eosinophil chemotaxis and selective in vivo recruitment by sphingosine 1-phosphate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:11170-11175.
162. Bombini,G., Canetti,C., Rocha,F.A., and Cunha,F.Q. 2004. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol.* 496:197-204.
163. Entschladen,F., Drell,T.L., Lang,K., Joseph,J., and Zaenker,K.S. 2004. Tumour-cell migration, invasion, and metastasis: navigation by neurotransmitters. *Lancet Oncol.* 5:254-258.
164. Keleg,S., Buchler,P., Ludwig,R., Buchler,M.W., and Friess,H. 2003. Invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Mol.Cancer* 2:14.

165. Mizejewski,G.J. 1999. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc.Soc Exp Biol Med.* 222:124-138.
166. Slack-Davis,J.K. and Parsons,J.T. 2004. Emerging views of integrin signaling: implications for prostate cancer. *J Cell Biochem.* 91:41-46.
167. Burbelo,P., Wellstein,A., and Pestell,R.G. 2004. Altered Rho GTPase signaling pathways in breast cancer cells. *Breast Cancer Res.Treat.* 84:43-48.
168. Kumar,R. and Vadlamudi,R.K. 2002. Emerging functions of p21-activated kinases in human cancer cells. *J Cell Physiol* 193:133-144.
169. Lage,A., Crombet,T., and Gonzalez,G. 2003. Targeting epidermal growth factor receptor signaling: early results and future trends in oncology. *Ann.Med.* 35:327-336.
170. Nakamura,T., Kanda,S., Yamamoto,K., Kohno,T., Maeda,K., Matsuyama,T., and Kanetake,H. 2001. Increase in hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase activity in renal carcinoma cells is associated with increased motility partly through phosphoinositide 3-kinase activation. *Oncogene* 20:7610-7623.
171. Arteaga,C. 2003. Targeting HER1/EGFR: a molecular approach to cancer therapy. *Semin.Oncol.* 30:3-14.

172. Carragher,N.O. and Frame,M.C. 2002. Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int.J Biochem.Cell Biol* 34:1539-1543.
173. Newby,A.C. and Zaltsman,A.B. 2000. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia. *J Pathol.* 190:300-309.
174. Regan,C.P., Adam,P.J., Madsen,C.S., and Owens,G.K. 2000. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury. *J Clin Invest* 106:1139-1147.
175. Esteller,M. and Herman,J.G. 2002. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol.* 196:1-7.
176. Szyf,M. and Detich,N. 2001. Regulation of the DNA methylation machinery and its role in cellular transformation. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol* 69:47-79.
177. Nakao,M. 2001. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* 278:25-31.
178. Leonhardt,H. and Cardoso,M.C. 2000. DNA methylation, nuclear structure, gene expression and cancer. *J Cell Biochem.Suppl* 35:78-83.

179. Lund,G., Andersson,L., Lauria,M., Lindholm,M., Fraga,M.F., Villar-Garea,A., Ballestar,E., Esteller,M., and Zaina,S. 2004. DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem* 279:29147-29154.
180. Perna,A.F., Ingrosso,D., Satta,E., Lombardi,C., Acanfora,F., and De Santo,N.G. 2004. Homocysteine metabolism in renal failure. *Curr.Opin.Clin Nutr.Metab Care* 7:53-57.
181. Paulsen,M. and Ferguson-Smith,A.C. 2001. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol.* 195:97-110.
182. Ramchandani,S., Bhattacharya,S.K., Cervoni,N., and Szyf,M. 1999. DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:6107-6112.
183. Cervoni,N., Detich,N., Seo,S.B., Chakravarti,D., and Szyf,M. 2002. The oncoprotein Set/TAF-1beta, an inhibitor of histone acetyltransferase, inhibits active demethylation of DNA, integrating DNA methylation and transcriptional silencing. *J Biol Chem* 277:25026-25031.
184. Cervoni,N. and Szyf,M. 2001. Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 276:40778-40787.

185. Bhattacharya,S.K., Ramchandani,S., Cervoni,N., and Szyf,M. 1999. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397:579-583.
186. Detich,N., Theberge,J., and Szyf,M. 2002. Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem* 277:35791-35794.
187. Wade,P.A. 2001. Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene* 20:3166-3173.
188. Lewis,J.D., Meehan,R.R., Henzel,W.J., Maurer-Fogy,I., Jeppesen,P., Klein,F., and Bird,A. 1992. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69:905-914.
189. Jones,P.L., Veenstra,G.J., Wade,P.A., Vermaak,D., Kass,S.U., Landsberger,N., Strouboulis,J., and Wolffe,A.P. 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat.Genet.* 19:187-191.
190. Nan,X., Ng,H.H., Johnson,C.A., Laherty,C.D., Turner,B.M., Eisenman,R.N., and Bird,A. 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393:386-389.

191. Wade,P.A. 2001. Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 23:1131-1137.
192. Fujita,N., Watanabe,S., Ichimura,T., Ohkuma,Y., Chiba,T., Saya,H., and Nakao,M. 2003. MCAF mediates MBD1-dependent transcriptional repression. *Mol.Cell Biol* 23:2834-2843.
193. Hiltunen,M.O., Turunen,M.P., Hakkinen,T.P., Rutanen,J., Hedman,M., Makinen,K., Turunen,A.M., Aalto-Setala,K., and Yla-Herttuala,S. 2002. DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med.* 7:5-11.
194. Hiltunen,M.O. and Yla-Herttuala,S. 2003. DNA methylation, smooth muscle cells, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1750-1753.
195. Mielnicki,L.M., Asch,H.L., and Asch,B.B. 2001. Genes, chromatin, and breast cancer: an epigenetic tale. *J Mammary.Gland.Biol Neoplasia.* 6:169-182.
196. Esteller,M., Corn,P.G., Baylin,S.B., and Herman,J.G. 2001. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 61:3225-3229.
197. Hartsough,M.T., Clare,S.E., Mair,M., Elkahloun,A.G., Sgroi,D., Osborne,C.K., Clark,G., and Steeg,P.S. 2001. Elevation of breast carcinoma

- Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression and reduced motility by DNA methylation inhibition. *Cancer Res.* 61:2320-2327.
198. Boltze,C., Schneider-Stock,R., Quednow,C., Hinze,R., Mawrin,C., Hribaschek,A., Roessner,A., and Hoang-Vu,C. 2003. Silencing of the maspin gene by promoter hypermethylation in thyroid cancer. *Int.J Mol.Med.* 12:479-484.
199. Tsutsumida,A., Hamada,J., Tada,M., Aoyama,T., Furuuchi,K., Kawai,Y., Yamamoto,Y., Sugihara,T., and Moriuchi,T. 2004. Epigenetic silencing of E- and P-cadherin gene expression in human melanoma cell lines. *Int.J Oncol.* 25:1415-1421.
200. Fang,J.Y., Chen,Y.X., Lu,J., Lu,R., Yang,L., Zhu,H.Y., Gu,W.Q., and Lu,L.G. 2004. Epigenetic modification regulates both expression of tumor-associated genes and cell cycle progressing in human colon cancer cell lines: Colo-320 and SW1116. *Cell Res.* 14:217-226.
201. Zhu,X., Leav,I., Leung,Y.K., Wu,M., Liu,Q., Gao,Y., McNeal,J.E., and Ho,S.M. 2004. Dynamic regulation of estrogen receptor-beta expression by DNA methylation during prostate cancer development and metastasis. *Am J Pathol.* 164:2003-2012.

202. Lewanczuk,R.Z., Chen,A., and Pang,P.K. 1990. The effects of dietary calcium on blood pressure in spontaneously hypertensive rats may be mediated by parathyroid hypertensive factor. *Am J Hypertens.* 3:349-353.
203. Solban,N., Jia,H.P., Richard,S., Tremblay,S., Devlin,A.M., Peng,J., Gossard,F., Guo,D.F., Morel,G., Hamet,P. *et al.* 2000. HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation. *J.Biol.Chem.* 275:32234-32243.
204. Solban,N., Dumas,P., Gossard,F., Sun,Y., Pravenec,M., Kren,V., Lewanczuk,R., Hamet,P., and Tremblay,J. 2002. Chromosomal mapping of HCaRG, a novel hypertension-related, calcium-regulated gene. *Folia Biol (Praha)* 48:9-14.
205. Devlin,A.M., Solban,N., Tremblay,S., Gutkowska,J., Schurch,W., Orlov,S.N., Lewanczuk,R., Hamet,P., and Tremblay,J. 2003. HCaRG is a novel regulator of renal epithelial cell growth and differentiation causing G2M arrest. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F753-F762.
206. Emami,K.H., Navarre,W.W., and Smale,S.T. 1995. Core promoter specificities of the Sp1 and VP16 transcriptional activation domains. *Mol.Cell Biol* 15:5906-5916.

207. Blake,M.C., Jambou,R.C., Swick,A.G., Kahn,J.W., and Azizkhan,J.C. 1990. Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter. *Mol.Cell Biol* 10:6632-6641.
208. Black,A.R., Black,J.D., and Azizkhan-Clifford,J. 2001. Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol* 188:143-160.
209. Li,F. and Altieri,D.C. 1999. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. *Cancer Res.* 59:3143-3151.
210. Zwicker,J., Lucibello,F.C., Wolfrain,L.A., Gross,C., Truss,M., Engeland,K., and Muller,R. 1995. Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J* 14:4514-4522.
211. Haugwitz,U., Wasner,M., Wiedmann,M., Spiesbach,K., Rother,K., Mossner,J., and Engeland,K. 2002. A single cell cycle genes homology region (CHR) controls cell cycle-dependent transcription of the cdc25C phosphatase gene and is able to cooperate with E2F or Sp1/3 sites. *Nucleic Acids Res.* 30:1967-1976.

212. Wasner,M., Haugwitz,U., Reinhard,W., Tschop,K., Spiesbach,K., Lorenz,J., Mossner,J., and Engeland,K. 2003. Three CCAAT-boxes and a single cell cycle genes homology region (CHR) are the major regulating sites for transcription from the human cyclin B2 promoter. *Gene* 312:225-237.
213. Kishore,R., Spyridopoulos,I., Luedemann,C., and Losordo,D.W. 2002. Functionally novel tumor necrosis factor-alpha-modulated CHR-binding protein mediates cyclin A transcriptional repression in vascular endothelial cells. *Circ Res.* 91:307-314.
214. Xu,Y., Fang,F., Ludewig,G., Jones,G., and Jones,D. 2004. A mutation found in the promoter region of the human survivin gene is correlated to overexpression of survivin in cancer cells. *DNA Cell Biol* 23:419-429.
215. Karin,M., Liu,Z., and Zandi,E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr.Opin.Cell Biol* 9:240-246.
216. De Bosscher,K., Vanden Berghe,W., and Haegeman,G. 2003. The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr.Rev.* 24:488-522.
217. Eferl,R. and Wagner,E.F. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat.Rev.Cancer* 3:859-868.

218. Yates,S. and Rayner,T.E. 2002. Transcription factor activation in response to cutaneous injury: role of AP-1 in reepithelialization. *Wound.Repair Regen.* 10:5-15.
219. Jin,S., Fan,F., Fan,W., Zhao,H., Tong,T., Blanck,P., Alomo,I., Rajasekaran,B., and Zhan,Q. 2001. Transcription factors Oct-1 and NF-YA regulate the p53-independent induction of the GADD45 following DNA damage. *Oncogene* 20:2683-2690.
220. Latchman,D.S. 1999. POU family transcription factors in the nervous system. *J Cell Physiol* 179:126-133.
221. Zhao,H., Jin,S., Fan,F., Fan,W., Tong,T., and Zhan,Q. 2000. Activation of the transcription factor Oct-1 in response to DNA damage. *Cancer Res.* 60:6276-6280.
222. Hirose,T., Sowa,Y., Takahashi,S., Saito,S., Yasuda,C., Shindo,N., Furuichi,K., and Sakai,T. 2003. p53-independent induction of Gadd45 by histone deacetylase inhibitor: coordinate regulation by transcription factors Oct-1 and NF-Y. *Oncogene* 22:7762-7773.
223. Takahashi,S., Saito,S., Ohtani,N., and Sakai,T. 2001. Involvement of the Oct-1 regulatory element of the gadd45 promoter in the p53-independent response to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.* 61:1187-1195.

224. Kirchoff,S., Schaper,F., Oumard,A., and Hauser,H. 1998. In vivo formation of IRF-1 homodimers. *Biochimie* 80:659-664.
225. Harada,H., Kitagawa,M., Tanaka,N., Yamamoto,H., Harada,K., Ishihara,M., and Taniguchi,T. 1993. Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science* 259:971-974.
226. Lengyel,P. 1993. Tumor-suppressor genes: news about the interferon connection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90:5893-5895.
227. Kano,A., Haruyama,T., Akaike,T., and Watanabe,Y. 1999. IRF-1 is an essential mediator in IFN-gamma-induced cell cycle arrest and apoptosis of primary cultured hepatocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 257:672-677.
228. Arany,I., Whitehead,W.E., Ember,I.A., and Tyring,S.K. 2003. Dose-dependent activation of p21WAF1 transcription by all-trans-acid in cervical squamous carcinoma cells. *Anticancer Res.* 23:495-497.
229. Saura,M., Zaragoza,C., Bao,C., McMillan,A., and Lowenstein,C.J. 1999. Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor kappaB during activation of inducible nitric oxide synthase transcription. *J Mol.Biol* 289:459-471.

230. Miyazaki,M., Sakaguchi,M., Akiyama,I., Sakaguchi,Y., Nagamori,S., and Huh,N.H. 2004. Involvement of interferon regulatory factor 1 and S100C/A11 in growth inhibition by transforming growth factor beta 1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 64:4155-4161.
231. Beato,M., Chalepakis,G., Schauer,M., and Slater,E.P. 1989. DNA regulatory elements for steroid hormones. *J Steroid Biochem.* 32:737-747.
232. Lundback,T., Cairns,C., Gustafsson,J.A., Carlstedt-Duke,J., and Hard,T. 1993. Thermodynamics of the glucocorticoid receptor-DNA interaction: binding of wild-type GR DBD to different response elements. *Biochemistry* 32:5074-5082.
233. Danesch,U., Gloss,B., Schmid,W., Schutz,G., Schule,R., and Renkawitz,R. 1987. Glucocorticoid induction of the rat tryptophan oxygenase gene is mediated by two widely separated glucocorticoid-responsive elements. *EMBO J* 6:625-630.
234. Winter,L.A., Stewart,M.J., Shean,M.L., Dong,Y., Poellinger,L., Okret,S., Gustafsson,J.A., and Duester,G. 1990. A hormone response element upstream from the human alcohol dehydrogenase gene ADH2 consists of three tandem glucocorticoid receptor binding sites. *Gene* 91:233-240.

235. Jantzen,H.M., Strahle,U., Gloss,B., Stewart,F., Schmid,W., Boshart,M., Miksicek,R., and Schutz,G. 1987. Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 49:29-38.
236. Hovring,P.I., Matre,V., Fjeldheim,A.K., Loseth,O.P., and Gautvik,K.M. 1999. Transcription of the human thyrotropin-releasing hormone receptor gene-analysis of basal promoter elements and glucocorticoid response elements. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 257:829-834.
237. Solban,N., Dumas,P., Gossard,F., Sun,Y.L., Pravenec,M., Kren,V., Lewanczuk,R., Hamet,P., and Tremblay,J. 2001. Chromosomal mapping of HCaRG, a novel hypertension related, calcium-regulated gene. *Folia Biologica (in press)*.
238. Hines,R.N., Mathis,J.M., and Jacob,C.S. 1988. Identification of multiple regulatory elements on the human cytochrome P450IA1 gene. *Carcinogenesis* 9:1599-1605.
239. Smith,A.N., Barth,M.L., McDowell,T.L., Moulin,D.S., Nuthall,H.N., Hollingsworth,M.A., and Harris,A. 1996. A regulatory element in intron 1 of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. *J Biol Chem* 271:9947-9954.

240. Galvagni,F. and Oliviero,S. 2000. Utrophin transcription is activated by an intronic enhancer. *J Biol Chem* 275:3168-3172.
241. Coulon,V., Veyrune,J.L., Tourkine,N., Vie,A., Hipskind,R.A., and Blanchard,J.M. 1999. A novel calcium signaling pathway targets the c-fos intragenic transcriptional pausing site. *J Biol Chem* 274:30439-30446.
242. Korner,K., Wolfrain,L.A., Lucibello,F.C., and Muller,R. 1997. Characterization of the TATA-less core promoter of the cell cycle-regulated *cdc25C* gene. *Nucleic Acids Res.* 25:4933-4939.
243. Mendelsohn,J., Howley,P.M., Israel,M.A., and Liotta,L.A. 2001. The Molecular Basis of Cancer. W.B. saunders Company.
244. Tan,J.M., Tock,E.P., and Chow,V.T. 2003. The novel human MOST-1 (C8orf17) gene exhibits tissue specific expression, maps to chromosome 8q24.2, and is overexpressed/amplified in high grade cancers of the breast and prostate. *Mol.Pathol.* 56:109-115.
245. Bova,G.S. and Isaacs,W.B. 1996. Review of allelic loss and gain in prostate cancer. *World J Urol.* 14:338-346.
246. Savinainen,K.J., Linja,M.J., Saramaki,O.R., Tammela,T.L., Chang,G.T., Brinkmann,A.O., and Visakorpi,T. 2004. Expression and copy number

- analysis of TRPS1, EIF3S3 and MYC genes in breast and prostate cancer. *Br.J Cancer* 90:1041-1046.
247. Porkka,K.P., Tammela,T.L., Vessella,R.L., and Visakorpi,T. 2004. RAD21 and KIAA0196 at 8q24 are amplified and overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes.Cancer* 39:1-10.
248. Schulz,W.A., Elo,J.P., Florl,A.R., Pennanen,S., Santourlidis,S., Engers,R., Buchardt,M., Seifert,H.H., and Visakorpi,T. 2002. Genomewide DNA hypomethylation is associated with alterations on chromosome 8 in prostate carcinoma. *Genes Chromosomes.Cancer* 35:58-65.
249. Kim,Y.S., Yoo,H.S., Lee,K.T., Goh,S.H., Jung,J.S., Oh,S.W., Baba,M., Yasuda,T., Matsubara,K., and Nagai,H. 2000. Detection of genetic alterations in the human gastric cancer cell lines by two-dimensional analysis of genomic DNA. *Int.J Oncol.* 17:297-308.
250. Watanobe,I., Takamori,S., Kojima,K., Fukasawa,M., Beppu,T., Futagawa,S., and Hirai,S. 2002. Numerical chromosomal abnormality in gastric MALT lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma. *J Gastroenterol* 37:691-696.
251. Vissers,K.J., Riegman,P.H., Alers,J.C., Tilanus,H.W., and van Dekken,H. 2001. Involvement of cancer-activating genes on chromosomes 7 and 8 in

- esophageal (Barrett's) and gastric cardia adenocarcinoma. *Anticancer Res.* 21:3813-3820.
252. Pei,J., Balsara,B.R., Li,W., Litwin,S., Gabrielson,E., Feder,M., Jen,J., and Testa,J.R. 2001. Genomic imbalances in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes.Cancer* 31:282-287.
253. Knuutila,S., Bjorkqvist,A.M., Autio,K., Tarkkanen,M., Wolf,M., Monni,O., Szymanska,J., Larramendy,M.L., Tapper,J., Pere,H. *et al.* 1998. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. *Am J Pathol.* 152:1107-1123.
254. Alimov,A., Sundelin,B., Bergerheim,U., Pavlenko,M., Pisa,P., Zetterberg,A., Larsson,C., and Lagercrantz,S. 2004. Molecular cytogenetic characterization shows higher genetic homogeneity in conventional renal cell carcinoma compared to other kidney cancers. *Int.J Oncol.* 25:955-960.
255. El-Rifai,W., Sarlomo-Rikala,M., Andersson,L.C., Knuutila,S., and Miettinen,M. 2000. DNA sequence copy number changes in gastrointestinal stromal tumors: tumor progression and prognostic significance. *Cancer Res.* 60:3899-3903.
256. Glukhova,L., Angevin,E., Lavialle,C., Cadot,B., Terrier-Lacombe,M.J., Perbal,B., Bernheim,A., and Goguel,A.F. 2001. Patterns of specific genomic

- alterations associated with poor prognosis in high-grade renal cell carcinomas. *Cancer Genet.Cytogenet.* 130:105-110.
257. Abraham,C., Scaglione-Sewell,B., Skarosi,S.F., Qin,W., Bissonnette,M., and Brasitus,T.A. 1998. Protein kinase C alpha modulates growth and differentiation in Caco-2 cells. *Gastroenterology* 114:503-509.
258. Ding,Q., Dong,Z., and Evers,B.M. 1999. Enterocyte-like differentiation of the Caco-2 intestinal cell line is associated with increases in AP-1 protein binding. *Life Sci.* 64:175-182.
259. Vachon,P.H. and Beaulieu,J.F. 1992. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103:414-423.
260. Rice,P., Longden,I., and Bleasby,A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16:276-277.
261. Zhu,W.G., Srinivasan,K., Dai,Z., Duan,W., Druhan,L.J., Ding,H., Yee,L., Villalona-Calero,M.A., Plass,C., and Otterson,G.A. 2003. Methylation of adjacent CpG sites affects Sp1/Sp3 binding and activity in the p21(Cip1) promoter. *Mol.Cell Biol* 23:4056-4065.

262. Alikhani-Koopaei,R., Fouladkou,F., Frey,F.J., and Frey,B.M. 2004. Epigenetic regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression. *J Clin Invest* 114:1146-1157.
263. Sorin,A., Rosas,G., and Rao,R. 1997. PMR1, a Ca²⁺-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J Biol Chem* 272:9895-9901.
264. Wootton,L.L., Argent,C.C., Wheatley,M., and Michelangeli,F. 2004. The expression, activity and localisation of the secretory pathway Ca²⁺ -ATPase (SPCA1) in different mammalian tissues. *Biochim.Biophys.Acta* 1664:189-197.
265. Doucet,A. and Katz,A.I. 1982. High-affinity Ca-Mg-ATPase along the rabbit nephron. *Am J Physiol* 242:F346-F352.
266. Kip,S.N. and Strehler,E.E. 2003. Characterization of PMCA isoforms and their contribution to transcellular Ca²⁺ flux in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 284:F122-F132.
267. Borke,J.L., Caride,A., Verma,A.K., Penniston,J.T., and Kumar,R. 1989. Plasma membrane calcium pump and 28-kDa calcium binding protein in cells of rat kidney distal tubules. *Am J Physiol* 257:F842-F849.

268. Barley,N.F., Howard,A., O'Callaghan,D., Legon,S., and Walters,J.R. 2001. Epithelial calcium transporter expression in human duodenum. *Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 280:G285-G290.
269. MacLennan,D.H., Brandl,C.J., Korczak,B., and Green,N.M. 1985. Amino-acid sequence of a Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 316:696-700.
270. Cluzeaud,F., Reyes,R., Escoubet,B., Fay,M., Lazdunski,M., Bonvalet,J.P., Lesage,F., and Farman,N. 1998. Expression of TWIK-1, a novel weakly inward rectifying potassium channel in rat kidney. *Am J Physiol* 275:C1602-C1609.
271. Lesage,F. and Lazdunski,M. 2000. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 279:F793-F801.
272. Giebisch,G. 1995. Renal potassium channels: an overview. *Kidney Int.* 48:1004-1009.
273. Singh,N., Lim,R.B., and Sawyer,M.A. 2000. The cell cycle. *Hawaii Med.J* 59:300-306.

274. Xiong,Y., Hannon,G.J., Zhang,H., Casso,D., Kobayashi,R., and Beach,D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366:701-704.
275. King,R.W., Jackson,P.K., and Kirschner,M.W. 1994. Mitosis in transition. *Cell* 79:563-571.
276. Barboulet,N., Lafon,C., Chadebech,P., Vidal,S., and Valette,A. 1999. Involvement of p21 in the PKC-induced regulation of the G2/M cell cycle transition. *FEBS Lett.* 444:32-37.
277. Bunz,F., Dutriaux,A., Lengauer,C., Waldman,T., Zhou,S., Brown,J.P., Sedivy,J.M., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497-1501.
278. Abdollahi,A., Lord,K.A., Hoffman-Liebermann,B., and Liebermann,D.A. 1991. Sequence and expression of a cDNA encoding MyD118: a novel myeloid differentiation primary response gene induced by multiple cytokines. *Oncogene* 6:165-167.
279. Liao,H., Winkfein,R.J., Mack,G., Rattner,J.B., and Yen,T.J. 1995. CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol* 130:507-518.

280. Zhu,X., Mancini,M.A., Chang,K.H., Liu,C.Y., Chen,C.F., Shan,B., Jones,D., Yang-Feng,T.L., and Lee,W.H. 1995. Characterization of a novel 350-kilodalton nuclear phosphoprotein that is specifically involved in mitotic-phase progression. *Mol.Cell Biol* 15:5017-5029.
281. Yang,Z.Y., Guo,J., Li,N., Qian,M., Wang,S.N., and Zhu,X.L. 2003. Mitosin/CENP-F is a conserved kinetochore protein subjected to cytoplasmic dynein-mediated poleward transport. *Cell Res.* 13:275-283.
282. Kaplan,K.B., Burds,A.A., Swedlow,J.R., Bekir,S.S., Sorger,P.K., and Nathke,I.S. 2001. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat.Cell Biol* 3:429-432.
283. Olmeda,D., Castel,S., Vilaro,S., and Cano,A. 2003. Beta-catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol.Biol Cell* 14:2844-2860.
284. Green,R.A. and Kaplan,K.B. 2003. Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol* 163:949-961.
285. Hitomi,T., Matsuzaki,Y., Yokota,T., Takaoka,Y., and Sakai,T. 2003. p15(INK4b) in HDAC inhibitor-induced growth arrest. *FEBS Lett.* 554:347-350.

286. Ivanov,D.B., Philippova,M.P., and Tkachuk,V.A. 2001. Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry (Mosc.)* 66:1174-1186.
287. Gumbiner,B.M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345-357.
288. Nathke,I.S., Hinck,L.E., and Nelson,W.J. 1993. Epithelial cell adhesion and development of cell surface polarity: possible mechanisms for modulation of cadherin function, organization and distribution. *J Cell Sci.Suppl* 17:139-145.
289. Schipper,J.H., Frixen,U.H., Behrens,J., Unger,A., Jahnke,K., and Birchmeier,W. 1991. E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck: inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res.* 51:6328-6337.
290. Takeichi,M. 1993. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr.Opin.Cell Biol* 5:806-811.
291. Seline,P.C., Norris,D.A., Horikawa,T., Fujita,M., Middleton,M.H., and Morelli,J.G. 1996. Expression of E and P-cadherin by melanoma cells decreases in progressive melanomas and following ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol.* 106:1320-1324.

292. Nieman,M.T., Prudoff,R.S., Johnson,K.R., and Wheelock,M.J. 1999. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol* 147:631-644.
293. Tomita,K., van Bokhoven,A., van Leenders,G.J., Ruijter,E.T., Jansen,C.F., Bussemakers,M.J., and Schalken,J.A. 2000. Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* 60:3650-3654.
294. Hazan,R.B., Phillips,G.R., Qiao,R.F., Norton,L., and Aaronson,S.A. 2000. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 148:779-790.
295. Angst,B.D., Marozzi,C., and Magee,A.I. 2001. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci.* 114:629-641.
296. Strehl,S., Glatt,K., Liu,Q.M., Glatt,H., and Lalande,M. 1998. Characterization of two novel protocadherins (PCDH8 and PCDH9) localized on human chromosome 13 and mouse chromosome 14. *Genomics* 53:81-89.
297. Tanihara,H., Kido,M., Obata,S., Heimark,R.L., Davidson,M., St John,T., and Suzuki,S. 1994. Characterization of cadherin-4 and cadherin-5 reveals new aspects of cadherins. *J Cell Sci.* 107 (Pt 6):1697-1704.

298. Tanihara,H., Sano,K., Heimark,R.L., St John,T., and Suzuki,S. 1994. Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhes.Commun.* 2:15-26.
299. Suzuki,S., Sano,K., and Tanihara,H. 1991. Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue. *Cell Regul.* 2:261-270.
300. Kools,P., Vanhalst,K., Van den,E.E., and van Roy,F. 1999. The human cadherin-10 gene: complete coding sequence, predominant expression in the brain, and mapping on chromosome 5p13-14. *FEBS Lett.* 452:328-334.
301. Kawaguchi,J., Takeshita,S., Kashima,T., Imai,T., Machinami,R., and Kudo,A. 1999. Expression and function of the splice variant of the human cadherin-11 gene in subordination to intact cadherin-11. *J Bone Miner.Res.* 14:764-775.
302. Schulz,S., Becker,K.F., Braungart,E., Reichmuth,C., Klamt,B., Becker,I., Atkinson,M., Gessler,M., and Hofler,H. 2000. Molecular analysis of E-cadherin and cadherin-11 in Wilms' tumours. *J Pathol.* 191:162-169.
303. Shibata,T., Ochiai,A., Gotoh,M., Machinami,R., and Hirohashi,S. 1996. Simultaneous expression of cadherin-11 in signet-ring cell carcinoma and stromal cells of diffuse-type gastric cancer. *Cancer Lett.* 99:147-153.

304. Okazaki,M., Takeshita,S., Kawai,S., Kikuno,R., Tsujimura,A., Kudo,A., and Amann,E. 1994. Molecular cloning and characterization of OB-cadherin, a new member of cadherin family expressed in osteoblasts. *J Biol Chem* 269:12092-12098.
305. Litvinov,S.V., Velders,M.P., Bakker,H.A., Fleuren,G.J., and Warnaar,S.O. 1994. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125:437-446.
306. Balzar,M., Winter,M.J., de Boer,C.J., and Litvinov,S.V. 1999. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol.Med.* 77:699-712.
307. de Boer,C.J., van Krieken,J.H., Janssen-van Rhijn,C.M., and Litvinov,S.V. 1999. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol.* 188:201-206.
308. Poczatek,R.B., Myers,R.B., Manne,U., Oelschlager,D.K., Weiss,H.L., Bostwick,D.G., and Grizzle,W.E. 1999. Ep-Cam levels in prostatic adenocarcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia. *J Urol.* 162:1462-1466.
309. Osta,W.A., Chen,Y., Mikhitarian,K., Mitas,M., Salem,M., Hannun,Y.A., Cole,D.J., and Gillanders,W.E. 2004. EpCAM is overexpressed in breast

- cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 64:5818-5824.
310. Balzar,M., Prins,F.A., Bakker,H.A., Fleuren,G.J., Warnaar,S.O., and Litvinov,S.V. 1999. The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res.* 246:108-121.
311. Schmidinger,G., Hanselmayer,G., Pieh,S., Lackner,B., Kaminski,S., Ruhswurm,I., and Skorpik,C. 2003. Effect of tenascin and fibronectin on the migration of human corneal fibroblasts. *J Cataract Refract.Surg* 29:354-360.
312. Zand,L., Qiang,F., Roskelley,C.D., Leung,P.C., and Auersperg,N. 2003. Differential effects of cellular fibronectin and plasma fibronectin on ovarian cancer cell adhesion, migration, and invasion. *In Vitro Cell Dev.Biol Anim* 39:178-182.
313. Sbaa-Ketata,E., Vasse,M., Lenormand,B., Schneider,P., Soria,C., and Vannier,J.P. 2001. Fibronectin increases the migration induced by stromal cell-derived factor-1 alpha (SDF-1 alpha) in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Eur Cytokine Netw.* 12:223-230.
314. Lin,C.S., Aebersold,R.H., Kent,S.B., Varma,M., and Leavitt,J. 1988. Molecular cloning and characterization of plastin, a human leukocyte protein expressed in transformed human fibroblasts. *Mol.Cell Biol* 8:4659-4668.

315. de Arruda,M.V., Watson,S., Lin,C.S., Leavitt,J., and Matsudaira,P. 1990. Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J Cell Biol* 111:1069-1079.
316. Lin,C.S., Park,T., Chen,Z.P., and Leavitt,J. 1993. Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J Biol Chem* 268:2781-2792.
317. Furuholm,J. and Peranen,J. 2003. The C-terminal end of R-Ras contains a focal adhesion targeting signal. *J Cell Sci.* 116:3729-3738.
318. Kwong,L., Wozniak,M.A., Collins,A.S., Wilson,S.D., and Keely,P.J. 2003. R-Ras promotes focal adhesion formation through focal adhesion kinase and p130(Cas) by a novel mechanism that differs from integrins. *Mol.Cell Biol* 23:933-949.
319. Keely,P.J., Rusyn,E.V., Cox,A.D., and Parise,L.V. 1999. R-Ras signals through specific integrin alpha cytoplasmic domains to promote migration and invasion of breast epithelial cells. *J Cell Biol* 145:1077-1088.
320. Wang,X.W., Zhan,Q., Coursen,J.D., Khan,M.A., Kontny,H.U., Yu,L., Hollander,M.C., O'Connor,P.M., Fornace,A.J., Jr., and Harris,C.C. 1999.

GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 96:3706-3711.

321. Smits,V.A., Klompmaker,R., Vallenius,T., Rijksen,G., Makela,T.P., and Medema,R.H. 2000. p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* 275:30638-30643.
322. Blagosklonny,M.V. and Pardee,A.B. 2001. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells. *Cancer Res.* 61:4301-4305.
323. Costello,J.F., Fruhwald,M.C., Smiraglia,D.J., Rush,L.J., Robertson,G.P., Gao,X., Wright,F.A., Feramisco,J.D., Peltomaki,P., Lang,J.C. *et al.* 2000. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat.Genet.* 24:132-138.
324. Wajed,S.A., Laird,P.W., and DeMeester,T.R. 2001. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Ann.Surg* 234:10-20.
325. Blegen,H., Will,J.S., Ghadimi,B.M., Nash,H.P., Zetterberg,A., Auer,G., and Ried,T. 2003. DNA amplifications and aneuploidy, high proliferative activity and impaired cell cycle control characterize breast carcinomas with poor prognosis. *Anal.Cell Pathol.* 25:103-114.

326. Noack,F., Schmidt,H., Buchweitz,O., Malik,E., and Horny,H.P. 2004. Genomic imbalance and onco-protein expression of ovarian endometrioid adenocarcinoma arisen in an endometriotic cyst. *Anticancer Res.* 24:151-154.
327. Platzer,P., Upender,M.B., Wilson,K., Willis,J., Lutterbaugh,J., Nosrati,A., Willson,J.K., Mack,D., Ried,T., and Markowitz,S. 2002. Silence of chromosomal amplifications in colon cancer. *Cancer Res.* 62:1134-1138.
328. Monni,O., Barlund,M., Mousses,S., Kononen,J., Sauter,G., Heiskanen,M., Paavola,P., Avela,K., Chen,Y., Bittner,M.L. *et al.* 2001. Comprehensive copy number and gene expression profiling of the 17q23 amplicon in human breast cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98:5711-5716.
329. Argiles,A., Kraft,N., Ootaka,T., Hutchinson,P., and Atkins,R.C. 1992. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha stimulate or inhibit proliferation of a human renal adenocarcinoma cell line depending on cell status: differentiation of the two pathways by G protein involvement. *Cancer Res.* 52:4356-4360.
330. Lu,Z., Jiang,G., Blume-Jensen,P., and Hunter,T. 2001. Epidermal growth factor-induced tumor cell invasion and metastasis initiated by dephosphorylation and downregulation of focal adhesion kinase. *Mol.Cell Biol* 21:4016-4031.

331. Ueda,M., Ueki,M., Terai,Y., Ueki,K., Kumagai,K., Fujii,H., Yoshizawa,K., and Nakajima,M. 1999. Biological implications of growth factors on the mechanism of invasion in gynecological tumor cells. *Gynecol.Obstet.Invest* 48:221-228.
332. Hise,M.K., Salmanullah,M., Liu,L., Drachenberg,C.I., Papadimitriou,J.C., and Rohan,R.M. 2001. Control of the epidermal growth factor receptor and its ligands during renal injury. *Nephron* 88:71-79.
333. Hise,M.K., Liu,L., Salmanullah,M., Drachenberg,C.I., Papadimitriou,J.C., and Rohan,R.M. 2000. Mrna expression of transforming growth factor-alpha and the EGF receptor following nephrotoxic renal injury. *Ren Fail.* 22:423-434.
334. Schena,F.P. 1998. Role of growth factors in acute renal failure. *Kidney Int.Suppl* 66:S11-S15.
335. Hama,K., Aoki,J., Fukaya,M., Kishi,Y., Sakai,T., Suzuki,R., Ohta,H., Yamori,T., Watanabe,M., Chun,J. *et al.* 2004. Lysophosphatidic acid and autotaxin stimulate cell motility of neoplastic and non-neoplastic cells through LPA1. *J Biol Chem* 279:17634-17639.
336. Jung,I.D., Lee,J., Yun,S.Y., Park,C.G., Choi,W.S., Lee,H.W., Choi,O.H., Han,J.W., and Lee,H.Y. 2002. Cdc42 and Rac1 are necessary for autotaxin-

- induced tumor cell motility in A2058 melanoma cells. *FEBS Lett.* 532:351-356.
337. Kijima,T., Maulik,G., Ma,P.C., Madhiwala,P., Schaefer,E., and Salgia,R. 2003. Fibronectin enhances viability and alters cytoskeletal functions (with effects on the phosphatidylinositol 3-kinase pathway) in small cell lung cancer. *J Cell Mol.Med.* 7:157-164.
338. Moiseeva,E.P., Williams,B., Goodall,A.H., and Samani,N.J. 2003. Galectin-1 interacts with beta-1 subunit of integrin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 310:1010-1016.
339. Leeb,S.N., Vogl,D., Grossmann,J., Falk,W., Scholmerich,J., Rogler,G., and Gelbmann,C.M. 2004. Autocrine fibronectin-induced migration of human colonic fibroblasts. *Am J Gastroenterol* 99:335-340.
340. Maeda,N., Kawada,N., Seki,S., Arakawa,T., Ikeda,K., Iwao,H., Okuyama,H., Hirabayashi,J., Kasai,K., and Yoshizato,K. 2003. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. *J Biol Chem* 278:18938-18944.
341. Sieg,D.J., Hauck,C.R., Ilic,D., Klingbeil,C.K., Schaefer,E., Damsky,C.H., and Schlaepfer,D.D. 2000. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat.Cell Biol* 2:249-256.

342. Jones,G., Machado,J., Jr., and Merlo,A. 2001. Loss of focal adhesion kinase (FAK) inhibits epidermal growth factor receptor-dependent migration and induces aggregation of nh(2)-terminal FAK in the nuclei of apoptotic glioblastoma cells. *Cancer Res.* 61:4978-4981.
343. Miyamoto,S., Teramoto,H., Gutkind,J.S., and Yamada,K.M. 1996. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *J Cell Biol* 135:1633-1642.
344. Tuck,A.B., Hota,C., Wilson,S.M., and Chambers,A.F. 2003. Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathways. *Oncogene* 22:1198-1205.
345. Abal,M., Piel,M., Bouckson-Castaing,V., Mogensen,M., Sibarita,J.B., and Bornens,M. 2002. Microtubule release from the centrosome in migrating cells. *J Cell Biol* 159:731-737.
346. Dujardin,D.L., Barnhart,L.E., Stehman,S.A., Gomes,E.R., Gundersen,G.G., and Vallee,R.B. 2003. A role for cytoplasmic dynein and LIS1 in directed cell movement. *J Cell Biol* 163:1205-1211.

347. Schwab,A. 2001. Ion channels and transporters on the move. *News Physiol Sci.* 16:29-33.
348. Schuh,K., Cartwright,E.J., Jankevics,E., Bundschu,K., Liebermann,J., Williams,J.C., Armesilla,A.L., Emerson,M., Oceandy,D., Knobeloch,K.P. *et al.* 2004. Plasma membrane Ca²⁺ ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J Biol Chem* 279:28220-28226.
349. Kimura,C., Oike,M., Koyama,T., and Ito,Y. 2001. Alterations of Ca²⁺ mobilizing properties in migrating endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H745-H754.
350. Schwartz,S.M. 1997. Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest* 99:2814-2816.
351. Vigorito,E., Billadeu,D.D., Savoy,D., McAdam,S., Doody,G., Fort,P., and Turner,M. 2003. RhoG regulates gene expression and the actin cytoskeleton in lymphocytes. *Oncogene* 22:330-342.
352. Cantiello,H.F. 1997. Role of actin filament organization in cell volume and ion channel regulation. *J Exp Zool.* 279:425-435.

353. Balda, M.S. and Matter, K. 2003. Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol* 13:310-318.

Curriculum vitae

Publications

1. **Sandra Tremblay**, Carlos El Hader, Nicolas Solban, Denis Gingras, Richard Béliveau, Sergei N. Orlov, Pavel Hamet and Johanne Tremblay, HCaRG increases renal cell migration by an internal TGF-alpha autocrine loop mechanism. En révision au *Am J Physiol Renal Physiol* 2005.
2. Alison M.Devlin, Nicolas Solban, **Sandra Tremblay**, Jolanta Gutkowska, Walter Schürch, Sergei N. Orlov, Richard Lewanczuk, Pavel Hamet and Johanne Tremblay, HCaRG is a novel regulator of renal epithelial cell growth and differentiation causing G₂M arrest. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003, 284: F753-F762.
3. Nicolas Solban, Hong-Peng Jia, Sylvie Richard, **Sandra Tremblay**, Alison Devlin, Junzheng Peng, Francis Gossard, Deng-Fu Guo, Gérard Morel, Pavel Hamet, Richard Lewanczuck and Johanne Tremblay, HCaRG, a novel calcium-regulated gene coding for a nuclear protein, is potentially involved in the regulation of cell proliferation, *Journal of Biochemical Chemistry* 2000, volume 275: 32234-32243.
4. Pierre Dumas, Yulin Sun, Gilles Corbeil, **Sandra Tremblay**, Zdenka Pausova, Vladimir Kren, Drahomira Krenova, Michal Pravenec, Pavel Hamet and Johanne Tremblay, Mapping of quantitative trait loci (QTL) of differential stress gene expression in rat recombinant inbred strains, *Journal of Hypertension* 2000, 18:545-551.

Principaux résumés

1. **S. Tremblay**, N. Bourcier, P. Dumas, S.N. Orlov, P. Hamet, J. Tremblay, HCaRG expression is regulated by calcium and sodium ions. Présenté au Fourteenth European Meeting on Hypertension, Paris, France, 2004.
2. **S. Tremblay**, A.M. Devlin, S. Langlois, D. Gingras, R. Béliveau, P. Hamet, J.Tremblay, HCaRG gene increases migration potential of kidney cells. Présenté à l'International Vascular Biology Meeting, Toronto, Canada, 2004.
3. **Tremblay S**, Bourcier N, Cossette S, Hamet P et Tremblay J, Effet de l'hyperosmolarité sur l'activité du promoteur de HCaRG. Présenté à la 12^{ième} Réunion Scientifique Annuelle de la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle, Montréal, Québec, Canada, 2004 *Médecine Sciences*, 20 (Suppl. 1), 25.

4. **Tremblay S.**, Devlin, A.M., Peng J., Langlois S., Gingras D., Béliveau R., Hamet P. et Tremblay J. *, Implication de HCaRG sur la migration des cellules rénales. Présenté à la 45^{ième} Réunion scientifique annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Orford, Québec, Canada, 2003.
5. **S. Tremblay**, N. Solban, A.M. Devlin, J. Peng, P. Hamet and J. Tremblay, Involvement of HCaRG, a novel hypertension-related calcium regulated gene, in kidney cell growth. Présenté à la 23^{ième} Réunion Annuelle de la Société Canadienne d'hypertension Artérielle, Edmonton, Alberta, Canada, 2002.
6. **S. Tremblay**, AM Devlin, N. Solban, J. Peng, A. Lacroix, P. Hamet and J. Tremblay, Expression différentielle de HCaRG dans des conditions de croissance de type hypertrophique et hyperplasique. Présenté à la 44^{ième} Réunion scientifique annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, St-Sauveur, Québec, Canada, 2002. *Médecine Sciences*, 2002, 18 (Suppl. 2), 32.
7. **Tremblay S.**, N'Diaye N., Peng J., Lacroix A., Hamet P. and Tremblay J. HCaRG expression is down regulated in kidney and adrenal neoplasm. Présenté au Experimental Biology Meeting 2002, Nouvelle Orléans, Louisiane.
8. **Tremblay S.**, Solban N., Devlin A.M., Peng J., Hamet P. and Tremblay J. HCaRG expression during the processes of renal cell hypertrophy, hyperplasia and differentiation. Présenté à la 19^{ième} Réunion Scientifique de la Société Internationale d'Hypertension 2002, Prague, République Tchèque.
9. **S. Tremblay**, N. Solban, A.M. Devlin, P. Hamet and J. Tremblay, HCaRG Expression During Cell Cycle and Differentiation. Présenté à la 22^{ième} Réunion Annuelle de la Société Canadienne d'hypertension Artérielle, Halifax, Nouvelle-Écosse, Canada, 2001. *The Canadian Journal of Cardiology*, 2001, 17 (Suppl. C), 148C.
10. **S. Tremblay**, N. Solban, A.M. Devlin, J. Peng, P. Hamet and J. Tremblay, Étude du profil d'expression de HCaRG dans le rein. Présenté à la 43^{ième} Réunion scientifique annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Mont St-Anne, 2001. *Médecine Sciences*, 2001; (Suppl. 2).
11. **S. Tremblay**, N. Solban, R. Lewanczuk and J. Tremblay, A nCaRE Like Element is Present in the 5'Flanking Region of the Novel Hypertension Related Calcium-Regulated Gene (HCaRG). Présenté au Congrès canadien sur la santé cardiovasculaire, Vancouver, Canada, Octobre 2000.
12. **S. Tremblay**, N. Solban, R. Lewanczuk and J. Tremblay, A nCaRE-like sequence in the promoter of a novel hypertension related calcium-regulated gene (HCaRG). Présenté à la 18^{ième} Réunion Scientifique de la Société Internationale d'Hypertension 2000, Chicago, Illinois, États-Unis, Août 2000, *Journal of Hypertension*, 2000, 18 (Suppl. 4), S182.

