

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant

UNITÉ INSERM U1069 "Nutrition Croissance et Cancer"

THÈSE présentée par :

Bilel JELASSI

soutenue le : 20 Décembre 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François – Rabelais de Tours**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

IMPLICATION DES RÉCEPTEURS P2X₇ DANS L'INVASIVITÉ DES CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES

THÈSE dirigée par :

M. ROGER Sébastien

Maître de Conférences, HDR université François-Rabelais de Tours

RAPPORTEURS :

M. MATIFAT Fabrice

Professeur des Universités, université d'Amiens

M. RASSENDREN François

Directeur de Recherche CNRS, Montpellier

JURY :

M. ADRIOUCH SAHIL

Maître de Conférences, université de Rouen

M. GORÉ Jacques

Professeur des Universités, université de Tours

M. MATIFAT Fabrice

Professeur des Universités, université d'Amiens

M. RASSENDREN François

Directeur de Recherche CNRS, Montpellier

M. ROGER Sébastien

Maître de Conférences, université de Tours

M. SORIANI Olivier

Maître de Conférences, université de Nice

Résumé

Les cancers représentent une des premières causes de mortalité dans le monde et leur gravité repose le plus souvent sur l'envahissement métastatique que sur le développement de la tumeur primaire. Le développement des métastases est un processus complexe impliquant de nombreuses étapes dont certaines sont accomplies par les cellules cancéreuses après qu'elles aient acquis un pouvoir invasif caractérisé par leur capacité à migrer et à franchir la membrane basale et à remodeler la matrice extracellulaire qui les entoure. L'implication des canaux ioniques dans les propriétés de migration et d'invasion des cellules cancéreuses s'est heurtée au début à un scepticisme des scientifiques, mais est maintenant bien admise.

Les récepteurs P2X sont des récepteurs ionotropiques : des canaux ioniques dont l'ouverture est dépendante de la fixation d'adénosine 5'-triphosphate (ATP) sur un site récepteur extracellulaire. Parmi les récepteurs P2X, les récepteurs P2X₇ présentent des forts niveaux d'expression dans les tumeurs et non dans les tissus non cancéreux correspondants. Cependant leur fonctionnalité autant que leur rôle dans la biologie de la cellule cancéreuse reste controversée. Nous avons montré que parmi tous les récepteurs de la famille P2X, seuls les récepteurs P2X₇ sont fonctionnels dans les cellules cancéreuses hautement invasives de la lignée MDA-MB-435s, et non dans des lignées non cancéreuses. L'activation des récepteurs P2X₇ par l'ATP extracellulaire est responsable de changements morphologiques, à savoir l'émission de prolongements cellulaires et de filopodes conduisant à l'acquisition d'un phénotype pro-migratoire. La stimulation purinergique des récepteurs P2X₇ induit une augmentation de la migration cellulaire. Les changements dans la morphologie des cellules cancéreuses et l'augmentation de la migration semblent être due à l'activation des canaux potassiques SK3 par le Ca²⁺. L'activation des récepteurs P2X₇ augmente considérablement la dégradation de la matrice extracellulaire et l'invasion cellulaire. Cette augmentation implique la libération des formes matures de cathepsines à cystéine dans le milieu extracellulaire. Tous les effets observés (sur la morphologie, la migration et l'invasion cellulaire) sont inhibés en présence d'antagonistes spécifiques des récepteurs P2X₇ et par l'extinction moléculaire des récepteurs P2X₇ par la technique des siRNA. Par ailleurs les récepteurs P2X₇ stimulent l'invasivité des cellules cancéreuses *in vivo* dans un modèle de micrométastases chez l'embryon de poisson zèbre.

L'émodine (1,3,8-trihydroxy-6 méthylanthraquinone), une anthraquinone isolée à partir de la *Rheum officinale* Baill (rhubarbe de chine), présente des propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses. Nous avons testé l'effet de l'émodine sur l'invasivité des

cellules MDA-MB-435s dépendante du récepteur P2X₇. L'émodine diminue l'invasivité des cellules cancéreuses MDA-MB-435s *in vitro* et *in vivo* via l'antagonisme des récepteurs P2X₇. Nos résultats démontrent le rôle déterminant de la fonctionnalité des récepteurs P2X₇ dans l'invasivité cellulaire, un paramètre clé pour le développement des métastases.

Mots-clés : Récepteur P2X₇, migration cellulaire, invasivité cellulaire, cathepsines à cystéine, émodine.

Résumé en anglais

Cancers are a leading cause of death in the world and their severity depends mostly on the appearance of metastases rather than the development of the primary tumor. The development of metastases consists of a complex series of events accomplished by tumour cells after they acquire numerous abilities, one of which being the acquisition of an invasive potency. This mainly lies into an enhanced migration and the ability to digest the extracellular matrix. The involvement of ion channels in the properties of cancer cells migration and invasion was met in the beginning, with skepticism of scientists, but is now well accepted.

P2X₇ receptors (P2X₇R) are unusual plasma membrane ion channel activated by extracellular ATP. Among P2X receptors, P2X₇R have been described as potential cancer cell biomarkers. However, their functionality as well as their role in the biology of the cancer cell are unknown. Here, we show, in the highly aggressive human breast cancer cell line MDA-MB-435s, that P2X₇ receptor is highly expressed and fully functional. Its activation is responsible for the extension of neurite-like cellular prolongations, of the increase in cell migration and in cell invasion through extracellular matrix. The change in cancer cell morphology and the increased migration appeared to be due to the activation of Ca²⁺-activated SK3 potassium channels. The enhanced invasion through the extracellular matrix was related to the increase of mature forms of cysteine cathepsins in the extracellular medium, which was independent of SK3 channel activity and not associated with cell death. Pharmacological targeting of P2X₇R *in vivo* was crucial for cell invasiveness in a zebrafish model of metastases.

Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone), isolated from the rhubarb *Rheum officinale* Baill, is an anthraquinone derivative and is known to possess anti-inflammatory, and antitumor properties. We tested the effect of emodin on the P2X₇R-dependent MDA-MB-435s cancer cells invasiveness. Emodin reduces MDA-MB-435s cancer cells invasiveness *in vitro* and *in vivo* by specifically antagonizing the P2X₇R. Our results demonstrate a novel mechanistic link between P2X₇R functionality in cancer cells and invasiveness, a key parameter in tumour growth and in the development of metastases.

Keywords: P2X₇ receptors, migration, cancer cell invasion, cystein cathepsins, emodin.

Table des matières

Résumé.....	2
Résumé en anglais	4
Table des matières	5
Liste des publications et des communications	8
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Introduction	13
Revue bibliographique	16
I. Le cancer du sein.....	17
A. La glande mammaire	17
1. Structure	17
2. Développement.....	18
B. Epidémiologie du cancer du sein	19
1. Incidence et mortalité	19
2. Facteurs de risque.....	20
C. Biologie du cancer du sein	22
1. La cancérogénèse :	22
2. Rôle du microenvironnement tumoral.....	26
3. Cascade métastatique	29
II. Adénosine 5'-Triphosphate	35
A. Historique de "La double vie de l'ATP"	35
B. Voies de libération de l'ATP.....	35
C. Hydrolyse de l'ATP	38
III. Les récepteurs purinergiques.....	40
A. Les récepteurs P1 :	40
1. Les récepteurs A ₁	41
2. Les récepteurs A ₂	42
3. Les récepteurs A ₃	43
B. Les récepteurs P2	43
1. Les récepteurs P2Y.....	43
2. Les récepteurs P2X.....	48
IV. Récepteur P2X ₇	57

A. Gène	57
B. Structure	57
C. Pharmacologie.....	58
1. Les agonistes du récepteur P2X ₇	58
2. Les antagonistes du récepteur P2X ₇	58
D. Perméabilisation membranaire	60
E. Distribution.....	60
V. Le récepteur P2X ₇ dans les cancers.....	62
A. Cancer du sein	62
B. Cancer de la prostate	63
C. Cancer du pancréas.....	63
D. Cancer papillaire de la thyroïde	64
E. Cancer de la peau	65
1. Carcinomes basocellulaires et spinocellulaires	65
2. Mélanome.....	66
F. Leucémie lymphoïde chronique	66
G. Les tumeurs cérébrales (Neuroblastome).....	67
H. Cancer de l'utérus et du col de l'utérus.....	68
1. Cancer de l'utérus.....	68
2. Cancer du col de l'utérus.....	69
I. Conclusions	69
Résultats	70
I. Implication du récepteur purinergique P2X ₇ dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires humaines.....	71
A. Introduction	71
B. Article 1.....	72
C. Résumé.....	95
II. L'antraquinone émodine inhibe l'invasivité des cellules cancéreuses humaines par antagonisme du récepteur P2X ₇	96
A. Introduction	96
B. Article 2.....	96
C. Résumé.....	110
Discussion et perspectives.....	111
Conclusion.....	132

Publication non intégrée à la thèse	135
Bibliographie	169

Liste des publications et des communications

Publications intégrées à la thèse

B Jelassi, A Chantôme, F Alcaraz-Pérez, A Baroja-Mazo, ML Cayuela, P Pelegrin, A Surprenant and S Roger. “P2X₇ receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness”. *Oncogene* (2011) 30, 2108-2122.

B Jelassi, M Anchelin, J Chamouton, ML Cayuela, L Clarysse, J Li, J Goré, L-H Jiang and S Roger. (2013) “Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X₇ receptors”. *Carcinogenesis* (2013) ; 34(7):1487-96.

Publication non intégrée à la thèse

S Chadet, B Jelassi, R Wannous, D Angoulvant, S Chevalier, P Besson and S Roger. “The activation of P2Y₂ receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK1/2 signalling pathway”. In revision *Carcinogenesis*.

Communications orales

B Jelassi. “The involvement of P2X₇ receptors in human cancer cell invasiveness”. Department of Morphology, Surgery and Experimental Medicine. Section of Experimental pathology, Oncology and Biology Ferrara, Italy. Juillet 2013.

B Jelassi, M Anchelin, J Chamouton, ML Cayuela, L Clarysse, J Li, J Goré, L-H Jiang and S Roger. “The anthraquinone emodin inhibits MDA-MB-435s human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X₇ receptors”. 9ème colloque de l’axe valorisation des produits de la mer en cancérologie, La Rochelle, France. Juin 2013.

B Jelassi, M Anchelin, J Li, ML Cayuela, L-H Jiang and S Roger. “The anthraquinone emodin inhibits MDA-MB-435s human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X₇ receptors”. Ion Transport and Cancer, Würzburg, Germany. Septembre 2012.

Communications affichées

B Jelassi, M Anchelin, J Chamouton, ML Cayuela, L Clarysse, J Li, P Bougnoux, S Chevalier, J Goré, L-H Jiang and S Roger. “Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X₇ receptors”. 26ème colloque Biotechnocentre, Seillac, France. Octobre 2013.

B Jelassi, M Anchelin, J Chamouton, ML Cayuela, L Clarysse, J Li, P Bougnoux, S Chevalier, J Goré, L-H Jiang and S Roger. “Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X₇ receptors”. 7èmes journées du Cancéropôle Grand Ouest – Sables-d’Olonne, France. Avril 2013.

B Jelassi, M Anchelin, J Li, ML Cayuela, L-H Jiang and S Roger. “The anthraquinone emodin inhibits MDA-MB-435s human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X₇ receptors”. 5ème Journée Recherche commune Tours-Poitiers, France. Novembre 2012.

B Jelassi, A Chantôme, S. Chadet, A Baroja-Mazo, F Alcaraz-Pérez, ML Cayuela, P Pelegrin and S Roger. “P2X₇ receptor potentiates breast cancer cell invasiveness through the activation of SK3 channels and the extracellular release of active cystein cathepsins”. The first International Meeting on Ion Channel Signalling Mechanisms: from basic science to clinical application, Marrakesh, Morocco. Novembre 2011.

B Jelassi, A. Chantôme, S. Chadet, A. Surprenant and S. Roger. “P2X₇ receptor activation in human cancer cells increases SK3-dependent migration and enhances extracellular matrix invasion via the release of mature cysteine cathepsins”. 5èmes journées du Cancéropôle Grand-Ouest-Tours, France. Octobre 2010.

B Jelassi, A. Chantôme, S. Chadet, A. Surprenant and S. Roger. “P2X₇ receptor activation in human cancer cells increases SK3-dependent migration and enhances extracellular matrix invasion via the release of mature cysteine cathepsins”. 21st Ion Channels meeting, Presqu’île de Giens, France. Septembre 2010.

Récompenses

Prix du poster : 26ème colloque Biotechnocentre, Seillac, France. Octobre 2013.

Prix du poster : 5ème Journée Recherche commune Tours-Poitiers, France. Novembre 2012.

Liste des tableaux

Tableau 1: Incidence et mortalité estimées du cancer du sein en France métropolitaine chez la femme en 2012, selon l'âge.	21
Tableau 2 : Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des récepteurs P2Y.	47
Tableau 3 : Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des récepteurs P2X.	53

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du sein.	18
Figure 2 : Estimation des nouveaux cas et de décès par cancer chez la femme dans le monde.	20
Figure 3 : Schéma illustrant les trois étapes de la cancérogénèse.....	24
Figure 4 : Les dix caractéristiques des cellules cancéreuses.....	25
Figure 5: Microenvironnement de la tumeur primaire.	28
Figure 6 : Schéma de la cascade métastatique.....	30
Figure 7 : Mécanismes d'action des protéases pour promouvoir l'invasion des cellules cancéreuses.....	33
Figure 8 : Les différentes voies de la libération des nucléotides.	37
Figure 9 : Schéma illustrant les mécanismes d'inactivation de l'ATP extracellulaire (ou des purines) au niveau de la surface cellulaire.	39
Figure 10 : Structure schématique du récepteur A₁.	41
Figure 11 : Les différents récepteurs P2Y.	45
Figure 12 : Représentation schématique des trois catégories structurales des canaux ioniques dépendants des ligands.	49
Figure 13 : Topologie et principales caractéristiques des sous-unités des récepteurs P2X.	51
Figure 14 : Propriétés de désensibilisation des différents récepteurs P2X homomériques de rat exprimés dans les cellules HEK293.	54
Figure 15 : Etude en western blot de l'expression des récepteurs P2X₇ dans les cellules MDA-MB-435s dans les fractions membranaires (M) et enrichies en invadopodes (I).....	122
Figure 16 : Modèle <i>in vivo</i> de greffe orthotopique en utilisant des cellules cancéreuses mammaires murines chez la souris BALB/c	126
Figure 17 : Caractérisation du profil d'expression des récepteurs purinergiques sur les deux lignées cellulaires EMT6 et 4T1	127
Figure 18 : Enregistrements de courants purinergiques en configurations cellule entière de la technique de patch clamp sur les cellules cancéreuse murines EMT6	128
Figure 19 : Enregistrements de courants purinergiques en configurations cellule entière de la technique de patch clamp sur les cellules cancéreuse murines 4T1	129

Figure 20 : Structures chimiques des trois composés extraits de la rhubarbe: émodine ; aloe-émodyne et la rhéine.	131
---	------------

Introduction

Le cancer, mal du siècle encore insaisissable, n'a de cesse d'être combattu. Malgré cela il reste une des premières causes de mortalité dans le monde. De nombreuses recherches sont menées afin de trouver de nouvelles cibles et de nouveaux traitements pour soigner, améliorer la qualité de la vie des patients et endiguer ce fléau. Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent dans le monde. Chaque année, plus d'un million de cas sont diagnostiqués et plus de 400 000 patientes en meurent. La forte mortalité associée à ce cancer résulte principalement du développement métastatique. Ce processus métastatique est possible grâce à l'acquisition par les cellules cancéreuses de différentes caractéristiques leur permettant de s'échapper de la tumeur primaire, de s'implanter et d'envahir des nouveaux tissus. L'invasivité des cellules cancéreuses est caractérisée par une capacité migratoire accrue ainsi que par la capacité à dégrader la matrice extracellulaire. Il est par conséquent nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires mis en jeu au cours des étapes du développement métastatique afin de lutter efficacement contre la maladie.

Depuis de nombreuses années, les canaux ioniques, qui sont des protéines membranaires impliquées dans de nombreux phénomènes physiologiques font l'objet d'une attention particulière dans le domaine de la recherche en cancérologie. Leur implication dans des fonctions des cellules cancéreuses comme la prolifération cellulaire, dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaire a été démontrée à maintes reprises. De ce fait les canaux ioniques peuvent présenter des cibles thérapeutiques de choix par l'utilisation de molécules modulant leur activité.

Depuis plus d'une dizaine d'année, l'unité Inserm U1069 "Nutrition, Croissance et Cancer", s'intéresse à déterminer le rôle de différents canaux ioniques dans la régulation des propriétés de migration et d'invasivité des cellules cancéreuses. Parmi ces canaux ioniques, le récepteur-canal P2X₇, dernier membre de la famille des récepteurs purinergiques P2X est activé par l'adénosine 5'-triphosphate (ATP) extracellulaire. Ces récepteurs P2X₇ présentent des forts niveaux d'expression dans plusieurs types de cancers (sein, prostate, thyroïde...) et non dans les tissus non cancéreux correspondants. Cependant leur fonctionnalité (formation d'un courant cationique) autant que leur implication dans des propriétés associées au développement des tumeurs (contrôle de la prolifération ou de l'apoptose) n'étaient pas clairement définies. De même leur implication dans d'autres paramètres tels que la migration et l'invasion des cellules cancéreuses n'avait jamais été évaluée.

L'objectif de mon projet de thèse a été de caractériser l'expression ainsi que la fonctionnalité des récepteurs P2X₇ dans les cellules cancéreuses humaines hautement invasives MDA-MB-435s et de déterminer leurs rôles dans les paramètres cellulaires connus pour être impliqués dans la croissance et la progression tumorale. Les résultats obtenus permettent une meilleure compréhension du rôle joué par ces récepteurs dans les cellules cancéreuses mammaire et pourraient conduire à proposer les récepteurs P2X₇ comme de nouveaux marqueurs pronostiques ou éventuellement de nouvelles cibles thérapeutiques contre le cancer.

Revue bibliographique

I. Le cancer du sein

Le cancer occupe une place centrale au sein des préoccupations des Français en matière de santé publique. En dépit des progrès thérapeutiques réalisés et des grandes avancées en terme de compréhension des mécanismes de cancérisation, le cancer demeure encore aujourd'hui perçu comme la maladie grave par excellence. En France, le cancer touche un homme sur deux et une femme sur trois. Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez la femme (Belot et al., 2008) et représente la première cause de mortalité féminine par cancer dans le monde (Jemal et al., 2011). Le développement des métastases, successif au départ de cellules cancéreuses de la tumeur primaire, à leur dissémination dans la circulation générale et à leur installation dans des tissus secondaires, constitue la principale cause de mortalité du cancer du sein. Le stade de développement de la maladie au moment du diagnostic est très important dans la prise en charge thérapeutique. Diagnostiqué et traité précocement (cancer *in situ*), le cancer du sein présente un très bon pronostic en terme de survie (survie à 5 ans > 85%), en revanche, si la maladie est détectée à un stade avancé (présence de métastases), la survie à 5 ans chute à 23% (Youliden et al., 2012). Il existe suffisamment de preuves permettant d'affirmer que des facteurs génétiques, des facteurs environnementaux et des facteurs liés au style de vie jouent un rôle important dans l'étiologie de cette maladie. Il apparaît ainsi indispensable d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la progression tumorale et responsables de la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme et aboutissant aux métastases, pour mieux prévenir diagnostiquer et traiter ce fléau.

A. La glande mammaire

1. Structure

Les glandes mammaires sont incluses dans les seins. Elles sont rudimentaires et dépourvues de fonction chez l'homme. Chez la femme adulte la glande mammaire est formée par la réunion d'une vingtaine de glandes indépendantes les unes des autres: les lobes, elles-mêmes subdivisées en lobules et acini. Ces lobules constituent la partie sécrétrice de la glande mammaire et débouchent au sommet du mamelon à travers les canaux galactophores. L'acinus est une cavité glandulaire constituée d'une couche de cellules internes d'épithélium

cubique sécrétoire et une couche externe de cellules myoépithéliales (tissu contractile, capable d'éjecter le lait en réponse au stimulus de succion). La glande mammaire est entourée d'un tissu adipeux qui forme le volume du sein et protège la glande. Cette couche grasseuse est cloisonnée par de nombreux tractus conjonctifs : les ligaments de Cooper qui unissent la face profonde du derme à la glande. Elle se compose également d'un tissu conjonctif de soutien composé de fibroblastes et d'un réseau de collagène, de laminine et de glycosaminoglycanes et d'un tissu mésenchymateux riche en vaisseaux sanguins, de canaux lymphatiques et de nerfs (**Figure 1**).

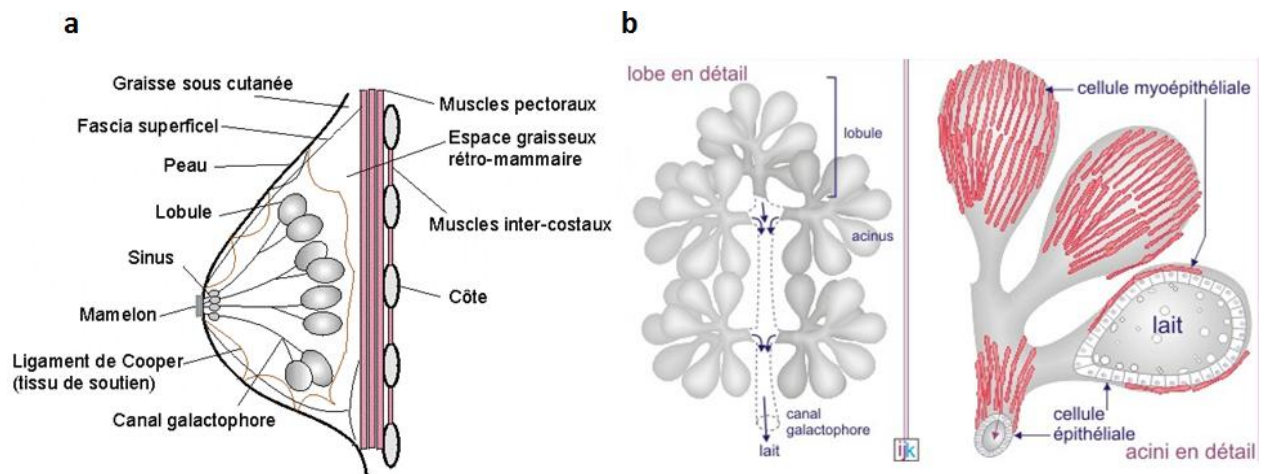


Figure 1 : Anatomie du sein.

Schéma d'une coupe sagittale du sein (a) et représentation schématisée d'un lobe glandulaire (b).

Sources: [adresses valides vérifiées le 12 novembre 2013]

a.http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/sante/epidemiologie/cancersein/glandemammaire/glande_mamm_cancerisation

b.<http://www.cellbiol.net/ste/alpHERCEPTIN1.php>

2. Développement

L'organogenèse du sein est un phénomène tardif puisque la glande mammaire est l'unique organe se développant majoritairement après la naissance. La croissance mammaire est étroitement liée à l'environnement hormonal (hormones stéroïdiennes : œstrogène, progestérone, androgènes, cortisol ; et hormones peptidiques : prolactine, hormone de croissance, insuline) et se fait après la puberté et elle ne se termine qu'au cours de la première grossesse menée à terme. Au cours de la vie fœtale, et plus particulièrement lors du troisième trimestre de la grossesse, les œstrogènes et la progestérone produits par la mère, provoquent une canalisations de l'épithélium mammaire, une différenciation du parenchyme mammaire et la formation des canaux galactophores, ainsi que le développement du réseau lobulo-alvéolaire.

À la naissance la glande mammaire est rudimentaire et consiste presque uniquement en la présence de canaux lactifères. Elle reste quiescente jusqu'à la puberté. Lors de la puberté

une légère augmentation de la ramification des canaux galactophores et de la lobulation à partir du tissu conjonctif se produit. Durant chaque cycle menstruel, la glande mammaire subit des fluctuations du parenchyme mammaire selon les variations des concentrations plasmatiques d'œstrogènes et de progestérone. Les sécrétions hormonales liées aux premiers cycles ovulatoires stimulent la croissance et la multiplication des canaux galactophores sous l'action des œstrogènes. Le tissu glandulaire, les lobules et les alvéoles se développent sous l'action de la progestérone. La suite du développement mammaire reprendra et s'achèvera lors de la première grossesse avec l'élaboration des structures permettant la lactation. Au cours de la grossesse, les ramifications terminales des canaux se multiplient et de nombreuses alvéoles se développent. La glande mammaire n'achève véritablement son développement qu'avec la première lactation. Les alvéoles régressent lors du sevrage et la glande revient à son état initial. À la ménopause, la glande mammaire s'atrophie suite au déclin des fonctions ovariennes, les canaux galactophores sont maintenus mais les alvéoles restantes continuent de régresser avec l'âge (processus appelé involution) (McGee et al., 2006) mais le volume du sein ne diminue pas toujours, compensé par l'augmentation des tissus graisseux.

B. Epidémiologie du cancer du sein

1. Incidence et mortalité

Chaque jour des milliers de femmes sont diagnostiquées avec un cancer du sein. Ce fléau reste de loin le cancer le plus fréquent chez la femme partout dans le monde et également la principale cause de mortalité féminine liée au cancer, ce qui représente 23% (soit 1,38 million) du total des nouveaux cas de cancer et 14% (soit 458 400) des décès totaux par cancer en 2008 (Ferlay et al., 2010; Jemal et al., 2011) (**Figure 2**). Les taux d'incidence montrent des disparités géographiques. Ainsi les taux les plus élevés sont enregistrés en Europe de l'ouest et en Amérique du Nord, alors que les taux sont plus faibles en Afrique et en Asie. Le cancer du sein est désormais le cancer féminin le plus répandu dans les pays industrialisés autant que dans les pays en voie de développement. Le taux d'incidence est plus élevé (plus de 80 pour 100.000) dans les pays industrialisés à l'exception du Japon, et plus faible (moins de 40 pour 100.000) dans la plupart des pays en voie de développement. En France aussi, le cancer du sein occupe la première place des cancers chez la femme (Belot et al., 2008) avec environ 53 000 nouveaux cas, nettement devant le cancer du côlon-rectum (19 000 nouveaux cas) et le cancer du poumon (12 000 cas). Il représente plus de tiers de l'ensemble des cancers féminins. Il est également le cancer qui cause le plus grand nombre de

décès par cancer chez la femme avec environ 11 500 décès estimés en 2011, devant le cancer du côlon-rectum (8 300 décès) et le cancer du poumon (8 100 décès). Il représente 18,3 % des décès féminins par cancer (selon La situation du cancer en France en 2012. Traitement INCa 2011).

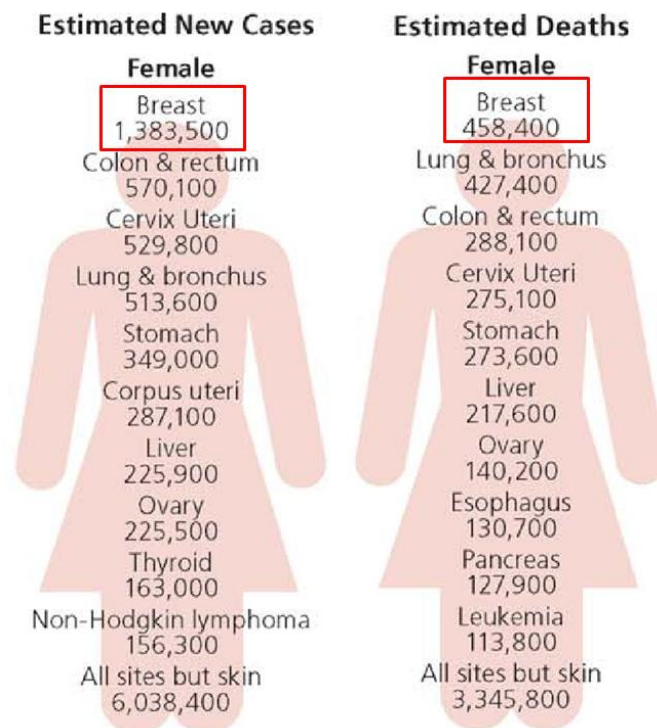


Figure 2 : Estimation des nouveaux cas et de décès par cancer chez la femme dans le monde.

Source: GLOBOCAN 2008 (Jemal et al., 2011).

2. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs sont connus pour influencer la survenue du cancer du sein.

a) Facteurs personnels

Les hommes peuvent développer un cancer du sein, mais cette maladie est environ 100 fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes. La présence de canaux galactophores primitifs, mais aussi la faible quantité d'hormones femelles œstrogène et progestérone produite chez l'homme les rendent ainsi susceptibles de développer un cancer du sein.

Le risque du cancer du sein augmente avec l'âge (**Tableau 1**) comme d'ailleurs beaucoup d'autres maladies telles que les maladies cardiovasculaires ceci peut être expliqué par une moins bonne efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN lors du vieillissement et par la durée d'exposition aux substances carcinogènes.

Tableau 1: Incidence et mortalité estimées du cancer du sein en France métropolitaine chez la femme en 2012, selon l'âge.

Classe d'âge	00 -14	15 -19	20 -24	25 -29	30 -34	35 -39	40 -44	45 -49	50 -54	55 -59	60 -64	65 -69	70 -74	75 -79	80 -84	85 -89	90 -94
Nb nouveaux cas - Femme	0	0	18	150	507	1669	3489	5084	4549	4652	6277	6432	4317	3750	3556	2861	1167
Nb décès - Femme	0	0	2	14	53	152	289	483	700	912	1283	1223	1069	1283	1549	1549	979
Tx incidence* spécifique - Femme	0	0	0.9	7.6	25.2	82.9	157.8	228.1	210	221.2	299.8	386.1	341.8	295.8	304.4	338	283.6
Tx mortalité* spécifique - Femme	0	0	0.1	0.7	2.6	7.6	13.1	21.7	32.3	43.4	61.3	73.4	84.6	101.2	132.6	183	237.9

* : taux standardisés monde pour 100 000 personnes-années

Sources : Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012. Partie 1 - Tumeurs solides

Traitement : INCa 2013

b) Facteurs génétiques et antécédents familiaux

Les cancers du sein dus à une transmission génétique (cancers dits héréditaires) représentent 5 à 10 % des cas de cancer du sein. Les femmes ayant de proches parentes (mère ou sœur) qui ont été diagnostiquées avec un cancer du sein ont un risque plus grand de développer cette maladie. Ce risque est d'autant plus élevé chez les femmes d'âge jeune (Pharoah et al., 1997). 5 à 10 % des cas de cancer du sein héréditaire sont dûs à des mutations dans deux gènes appartenant à la classe de gène dits "gènes suppresseurs de tumeurs": BRCA1 et BRCA2 (BRest CAncer) (Peto et al., 1999). Ces gènes codent pour des protéines (breast cancer susceptibility protein) intervenant dans la réparation des cassures des brins d'ADN endommagés lors de certaines divisions cellulaires. En cas de mutation du gène BRCA1 le risque de cancer du sein est de 40% à 87%, tandis qu'il est de 18% à 88% lorsque la mutation est associée au gène BRCA2 (Group, 2000; Metcalfe et al., 2010). Des mutations de ces mêmes gènes entraînent aussi une augmentation des risques de développer des cancers de l'ovaire.

c) Facteurs hormonaux

Hormones endogènes : Les hormones sexuelles endogènes sont impliquées dans le développement normal de la glande mammaire (prolifération/différenciation des cellules épithéliales) et jouent aussi un rôle important en tant que facteurs de risque du cancer du sein. Il est démontré que le risque de survenue du cancer du sein est légèrement plus élevé chez les femmes ayant eu leurs premières menstruations avant l'âge de 12 ans ou ayant leur ménopause de façon tardive (après 50 ans) (Nkondjock and Ghadirian, 2005). L'augmentation

de ce risque peut s'expliquer par une exposition prolongée aux hormones ovariennes : œstrogène et progestérone. À l'inverse le risque du cancer du sein diminue chez les femmes qui ont mené au moins une grossesse à terme avant l'âge de 30 ans (cette première grossesse permet une maturation complète de la glande mammaire qui bénéficie alors de l'influence protectrice de la progestérone prévenant ainsi une possible initiation tumorale). La maternité précoce, la multiparité et l'allaitement réduisent aussi ce risque (Key et al., 2001).

Hormones exogènes : Il a été montré que l'utilisation des contraceptifs oraux, surtout tardivement dans la vie reproductive, et des traitements hormonaux substitutifs (THS) augmente le risque du cancer du sein (Key et al., 2001).

d) Autres facteurs

D'autres facteurs tels qu'une taille élevée des femmes à l'adolescence, les maladies bénignes du sein, la densité élevée de tissu mammaire en mammographie (Boyd et al., 1998), l'exposition à des rayonnements ionisants à forte dose (compte tenue que le sein est l'un des organes les plus sensibles aux effets des radiations), l'obésité après la ménopause et la sédentarité sont associés à un risque accru de cancer du sein (Gerber et al., 2003; Nkondjock and Ghadirian, 2005). La consommation d'alcool augmente le risque de cancer du sein (Boyle and Boffetta, 2009). Une bonne hygiène de vie avec un maintien de l'équilibre énergétique et une activité physique régulière semblent au contraire avoir des effets préventifs.

C. Biologie du cancer du sein

Comme nous venons de le décrire, la glande mammaire normale est constituée d'une multitude de cellules qui subissent des phases de croissance et de différenciation. Ceci en fait un organe dynamique qui est en évolution permanente sous l'influence d'hormones et de facteurs de croissance, mais le rend aussi plus susceptible aux transformations cancéreuses (Olsson, 2000).

1. La cancérogénèse :

La modélisation du processus de la carcinogénèse peut se résumer en trois étapes: l'initiation, la promotion et la progression (**Figure 3**).

a) Initiation

L'initiation débute avec des lésions de l'ADN dans une population de cellules d'une façon spontanée ou causées par l'exposition à des agents cancérogènes de nature chimique,

physique (radiations ionisantes), bactérienne ou virale. Durant toute la vie cellulaire, l'ADN génomique est soumis à des agressions. Dans la majeure partie des cas, ces modifications de l'ADN passent inaperçues car des mécanismes réparateurs corrigent ces défauts. En absence de réparation, il peut se produire une accumulation de mutations génétiques qui deviennent permanentes et se transmettent à la descendance cellulaire. Ces altérations génomiques associées à l'initiation cancéreuse touchent des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la régulation de la différenciation et de la sénescence cellulaire, la régulation de l'apoptose et le contrôle du maintien de l'intégrité du génome. Ces altérations aboutissent à des gains ou des pertes de fonction qui bouleversent l'homéostasie cellulaire : ceci par l'activation et la surexpression des proto-oncogènes qui favorisent la multiplication cellulaire comme c-MYC (codant pour un facteur de transcription), RAS (codants pour des petites GTPases) et/ou par une perte de fonction de gène suppresseur qui eux ralentissent la multiplication comme BRCA1 et BRCA2 (décrits auparavant). Lors de la phase d'initiation, les cellules ne sont pas transformées, mais sont génétiquement anormales. Ces cellules initiées peuvent rester à l'état quiescent, c'est-à-dire sans exprimer leur potentialité oncogène, sur une longue période pouvant aller de quelques semaines à de nombreuses années.

b) Promotion

La promotion est la seconde étape de la cancérogénèse, elle correspond à la multiplication anarchique des cellules initiées (mutées). Durant cette phase, des mutations continuent d'intervenir et contribuent à sélectionner des cellules proliférant de façon indépendante vis-à-vis de leur environnement et qui perdent leur capacité de communication intercellulaire. Elles passent alors d'un état quiescent à un état prolifératif. Les cellules cancéreuses deviennent autonomes pour leur prolifération grâce notamment à la capacité de synthèse d'un certain nombre de facteurs comme la surexpression d'IGF (*Insuline Growth Factor*), d'EGF (*Epithelial Growth Factor*) ou encore TGF- α (*Transforming Growth Factor*). La phase de promotion aboutit ainsi à la formation d'une tumeur bénigne qui n'est pas encore cancéreuse.

c) Progression

Au cours de cette phase, de nouvelles modifications génétiques irréversibles et supplémentaires permettent aux cellules d'acquérir des propriétés de malignité. Cette dernière phase de la cancérogénèse conduit à la transformation de la tumeur bénigne suite à une multiplication des cellules malignes, en tumeur maligne cliniquement détectable (à partir de

10⁹ cellules). La tumeur envahit alors l'organe dans lequel elle est implantée perturbant son fonctionnement (cancer *in situ*). Toutefois la phase de progression aboutit parfois à une extension à distance (cancer invasif). Les cellules sont alors disséminées dans l'organisme par voie hématogène ou lymphatique conduisant à l'établissement de métastases (tumeurs secondaires).

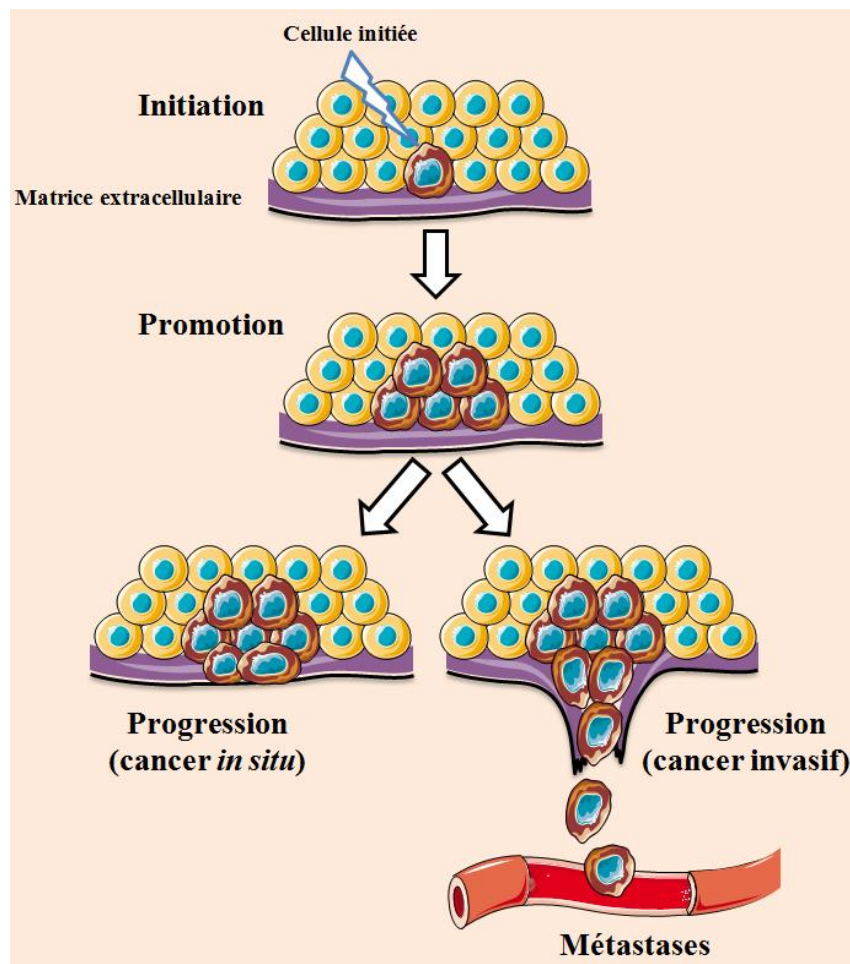


Figure 3 : Schéma illustrant les trois étapes de la cancérogénèse.

Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art.

Le processus multi-étapes du développement d'une tumeur maligne repose ainsi sur la sélection de cellules ayant acquis et développé des caractéristiques qui leur sont propres leur permettant de s'adapter et de survivre dans leur environnement tumoral. Six fonctions premières acquises par les cellules cancéreuses étaient initialement proposées par Hanahan et Weinberg en 2000 : Autonomie vis-à-vis des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance cellulaire, l'échappement au processus de vieillissement cellulaire (sénescence répliative) et au système de mort cellulaire programmée (l'apoptose), l'acquisition d'un potentiel répliatif illimité, la capacité à induire et stimuler des nouveaux

vaisseaux sanguins (angiogénèse) et l'acquisition d'un pouvoir accrue de dissémination tissulaire et invasif (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces auteurs y ajoutent la capacité de modifier ou reprogrammer le métabolisme cellulaire afin de soutenir plus efficacement la prolifération néoplasique, le métabolisme des cellules cancéreuses et l'échappement à la vigilance du système immunitaire ainsi que deux nouvelles propriétés qui favorisent l'établissement des huit autres: l'instabilité génomique et l'importance de l'inflammation (Hanahan and Weinberg, 2011) (**Figure 4**).

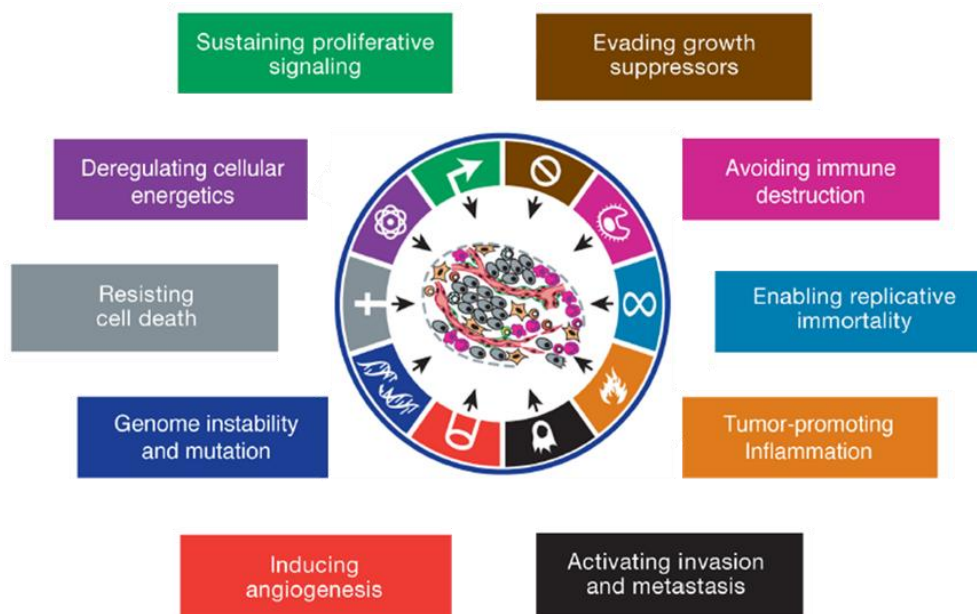


Figure 4 : Les dix caractéristiques des cellules cancéreuses.

Modifié d'après Hanahan & Weinberg 2011(Hanahan and Weinberg, 2011).

L'acquisition de ces diverses propriétés des cellules cancéreuses ne peut que partiellement expliquer le processus métastatique correspondant à la dissémination des cellules dans l'organisme et à la colonisation de nombreux organes. Il est maintenant admis qu'une tumeur ne se résume pas seulement à des amas de cellules cancéreuses isolées mais constitue un véritable organe au sein duquel prospèrent les cellules cancéreuses dans un microenvironnement aberrant composée d'une matrice extracellulaire (MEC) remodelée et de nombreuses cellules non cancéreuses. Tous ces éléments communiquent entre eux de manière dynamique et directe, via de contraintes structurelles (molécules d'adhésion) ou indirectement par le biais des facteurs biochimiques sécrétés dans le milieu extracellulaire (facteurs de croissance, cytokines, hormones, chemokines...). Le dialogue entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement s'avère essentiel pour la croissance et la progression tumorale.

2. Rôle du microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral, connu aussi sous le nom de stroma tumoral, est composé d'un cortège d'éléments cellulaires constitué par les fibroblastes, les cellules endothéliales qui forment les parois des vaisseaux sanguins et lymphatiques, les péricytes et les cellules inflammatoires (**Figure 5**). Tous ces éléments sont entourés d'une matrice extracellulaire. En 1971, Folkman a proposé l'hypothèse selon laquelle sans vaisseau sanguin, une tumeur ne pouvait pas grossir au-delà d'une taille critique et ne pouvait pas métastaser à d'autres organes, mettant ainsi l'accent sur l'importance des vaisseaux sanguins dans la croissance tumorale (Folkman, 1971). En effet la vascularisation tumorale est nécessaire aux échanges gazeux et notamment à l'apport d'oxygène, l'apport en nutriments et à l'élimination des déchets du métabolisme cellulaire. Sans cela les cellules cancéreuses meurent par apoptose ou par nécrose. Les cellules endothéliales forment le système vasculaire associé à la tumeur et jouent ainsi un rôle très important dans le développement tumoral. Lors du processus d'angiogénèse tumoral, les cellules endothéliales prolifèrent et synthétisent des enzymes protéolytiques, telles que les métalloprotéases matricielles (MMPs) ou les collagénases, qui permettent la dégradation de la membrane basale endothéliale préexistante. Une extension de bourgeons endothéliaux à la surface des vaisseaux vers le site tumoral et la croissance d'un réseau capillaire s'en suivent. Les cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques, quant à elles, jouent le rôle de canaux formant des pistes au sein de la tumeur et permettant aux cellules cancéreuses d'atteindre les ganglions lymphatiques. Les péricytes jouent un rôle important de soutien structural au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires qu'elles entourent (Hanahan and Weinberg, 2011).

Les fibroblastes jouent un rôle capital dans le remodelage de la MEC puisqu'ils produisent à la fois ses protéines constitutives majeurs (Laminine, fibronectine, collagène) mais aussi de nombreuses MMPs. Les fibroblastes participent également aux processus inflammatoires (secrétions de facteurs chimiotactiques et d'interféron β). En conditions physiologiques, le stroma contient un nombre minimal de fibroblastes. Dans le stroma tumoral, les fibroblastes sont beaucoup plus nombreux. Ils constituent la composante cellulaire la plus importante du microenvironnement tumoral. Ils présentent aussi une modification de leur phénotype qui se traduit par l'apparition de l'expression de l' *α -smooth muscle actin* (α -SMA) et de la vimentine. Ces fibroblastes prennent le nom de myofibroblastes tumoraux. Dans le cancer du sein, il est estimé que 80% des fibroblastes se transforment en myofibroblastes (Sappino et al., 1988). Les fibroblastes participent à

promouvoir la tumorigénèse en améliorant l'angiogénèse, la prolifération, la survie, l'invasion et la dissémination métastatique des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg, 2011).

Le stroma tumoral comprend également des cellules inflammatoires qui fonctionnent, contre toute attente, de manières contradictoires: ces cellules inflammatoires peuvent avoir une action pro-tumorale ou anti-tumorale. La liste des cellules inflammatoires pro-tumorales comprend désormais les macrophages, les mastocytes, les polynucléaires neutrophiles ainsi que les lymphocytes T et B (DeNardo et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Murdoch et al., 2008; De Palma et al., 2007). Plusieurs études ont montré que ces cellules libèrent des facteurs qui leurs confèrent une activité pro-tumorale. Parmi ces facteurs on peut citer le facteur qui stimule la croissance tumorale (y compris celle des cellules cancéreuses) EGF, le facteur de croissance angiogénique VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), d'autres facteurs pro-angiogéniques tels que le FGF2 (*Fibroblast growth factor*), les chemokines, les cytokines pro-inflammatoires, et notamment celles qui sont des médiateurs pro-angiogéniques tels que le TNF α , le TNF β , et les interleukines IL-1 et IL-6. Ces cellules produisent également des enzymes dégradant la MEC pro-angiogéniques et/ou pro-invasive comme les MMP-9 (produite par les macrophages et qui joue un rôle important dans la régulation de l'angiogénèse en mobilisant le VEGF séquestré par la MEC et en stimulant la prolifération des cellules endothéliales vasculaires) mais d'autres métalloprotéases matricielles comme les cathepsines à cystéines et les héparanases (Murdoch et al., 2008; Qian and Pollard, 2010). Les cellules inflammatoires infiltrant la tumeur sont impliquées ainsi dans l'induction et la stimulation de l'angiogénèse tumorale, la prolifération des cellules cancéreuses et facilitent l'invasion des tissus. Elles soutiennent ainsi la dissémination métastatique des cellules cancéreuses (Egeblad et al., 2010; Grivennikov et al., 2010; Joyce and Pollard, 2009; Murdoch et al., 2008; De Palma et al., 2007; Qian and Pollard, 2010).

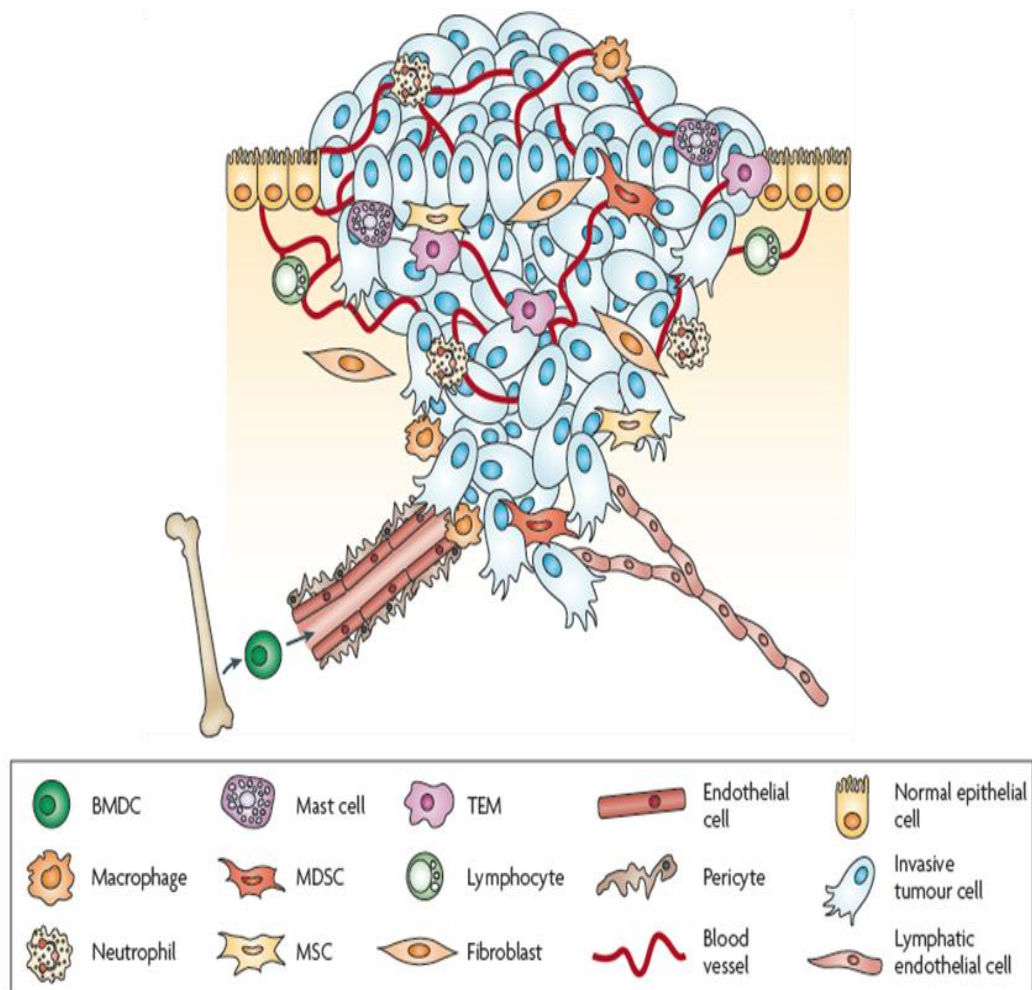


Figure 5: Microenvironnement de la tumeur primaire.

Les cellules cancéreuses de la tumeur primaire sont entourées d'un microenvironnement complexe comportant de nombreuses cellules, notamment les cellules endothéliales qui forment les parois des vaisseaux sanguins et lymphatiques, les fibroblastes du stroma, les péricytes et une variété de cellules inflammatoires y compris les macrophages, les neutrophiles... (Joyce and Pollard, 2009).

Le microenvironnement de la tumeur, comme nous venons de le voir, n'est pas neutre et joue un rôle clé dans la prolifération et l'invasivité des cellules cancéreuses. La composition biochimique du milieu extracellulaire et en particulier la présence de facteurs autocrines et paracrines est cruciale dans la modulation de la croissance et de l'échappement des cellules cancéreuses ainsi que dans l'infiltration des tumeurs et des sites inflammatoires par des cellules immunitaires. Des résultats montrent que la concentration en ATP est augmentée dans le tissu interstitiel des tumeurs (Pellegatti et al., 2008). Ainsi les sites tumoraux sont connus pour présenter de très fortes concentrations d'ATP ($> 100 \mu\text{M}$), tandis que ce nucléotide est normalement indétectable dans les tissus sains (Michaud et al., 2011; Pellegatti et al., 2008). Il a été reporté récemment l'implication de l'ATP dans l'interaction hôte tumeur. Ce nucléotide agit comme molécule de signalisation extracellulaire (Corriden and Insel, 2010) et

active des récepteurs purinergiques membranaires que l'on peut subdiviser en deux groupes : les récepteurs P2Y qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés à des protéines G hétérotrimériques, et les récepteurs P2X qui sont des récepteurs canaux (Khakh and North, 2006). En tant que médiateur extracellulaire, l'ATP participe à la régulation de la croissance et la différenciation cellulaire et peut également être impliquée dans la transformation néoplasique (Corriden and Insel, 2010).

3. Cascade métastatique

Le processus métastatique correspond à la dissémination des cellules cancéreuses à partir de la tumeur primaire, vers de nouveaux tissus et organes éloignés, afin d'y former de nouvelles tumeurs (tumeurs secondaires) (**Figure 6**). La dissémination métastatique est un événement clé dans l'histoire de la maladie cancéreuse, parce qu'elle transforme une maladie locorégionale curable par un traitement local (chirurgie/radiothérapie) en une maladie généralisée dont le traitement est systémique. La principale cause de mortalité des cancers du sein, n'est pas due au développement de la tumeur primaire en tant que tel, mais dépend de la survenue de métastases dans d'autres organes.

Le processus métastatique correspond à un phénomène séquentiel, requérant un certain nombre d'étapes successives (évolutives liées les unes aux autres) (Fidler, 2003). Le processus métastatique commence par l'invasion locale du tissu environnant par les cellules cancéreuses provenant de la tumeur primaire et se poursuit jusqu'à ce que les cellules cancéreuses envahissent et atteignent la circulation sanguine/lymphatique (intravasation) (Hunter et al., 2008; Talmadge and Fidler, 2010). Les cellules sont véhiculées via les vaisseaux sanguins et lymphatiques vers des organes éloignés. Les cellules cancéreuses adhèrent aux capillaires traversant l'organe cible, avant l'extravasation dans le parenchyme de l'organe cible. Dans ce nouveau tissu, il y a reprise de la prolifération et induction de l'angiogénèse tumorale pour finalement développer une tumeur secondaire (Hunter et al., 2008). Lors de ce cheminement, se produisent beaucoup de pertes de cellules cancéreuses, dues à la destruction mécanique provoqué par la force de cisaillement (*shear force*) de la circulation sanguine et à la surveillance du système immunitaire de l'hôte et des signaux apoptotiques (Hunter et al., 2008; Scully et al., 2012). Des dizaines de milliers de cellules cancéreuses peuvent atteindre la circulation, mais on estime que moins de 0,01% d'entre elles survivront (Chambers et al., 2002; Engel et al., 2003). Ces mécanismes de colonisation de nouveaux tissus par les cellules cancéreuses peuvent se répéter à partir des métastases pour produire des métastases secondaires ou 'métastase des métastases' (Scully et al., 2012; Talmadge and Fidler, 2010).

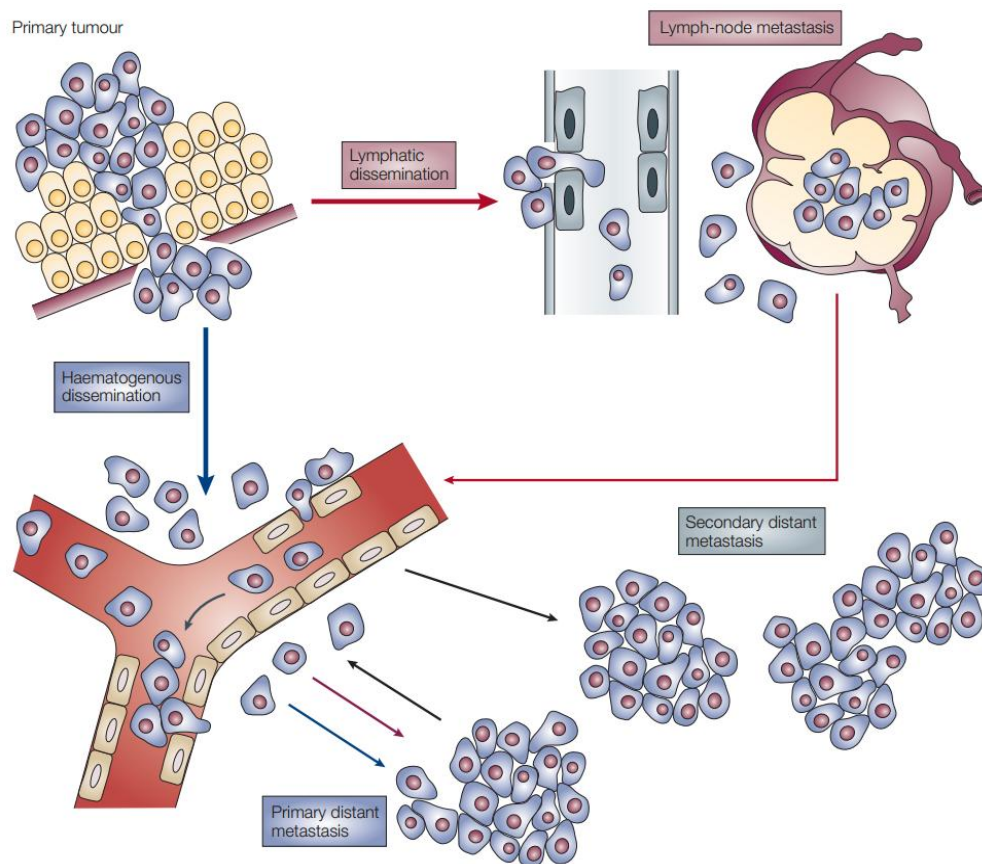


Figure 6 : Schéma de la cascade métastatique.

Les cellules cancéreuses peuvent disséminer à partir du site de la tumeur primaire via les vaisseaux sanguins (flèche bleue) ou lymphatiques (flèche rouge). Arrivées dans ces nouveaux sites, les cellules vont développer une nouvelle tumeur. Cependant dans certains cas, les cellules pourront rester dans un état de dormance prolongée (survie et absence de prolifération). Une dissémination hématogène secondaire peut se produire également à partir des métastases vers d'autres sites distants. Les cellules vont former une tumeur secondaire ou métastase des métastases (Pantel and Brakenhoff, 2004).

Le processus d'invasion cellulaire aboutissant à la dissémination métastatique met en jeu les différents mécanismes suivants :

- **Perte de l'adhérence cellulaire:**

La dissémination métastatique commence par le détachement des cellules cancéreuses de la tumeur primaire. La tumeur primaire est constituée de cellules plus ou moins cohésives: les altérations de l'adhérence intercellulaire, et de l'adhésion des cellules cancéreuses à la MEC, sont des étapes importantes pour la migration cellulaire. La famille des cadhérines joue un rôle important dans l'adhésion intercellulaire et par conséquent joue un rôle prédominant dans les métastases du cancer du sein (Li and Feng, 2011). Parmi les membres de cette famille, l'E-cadhérine (épithéliale) une molécule transmembranaire qui permet aux cellules

épithéliales de se lier entre elles en présence de calcium extracellulaire. Elle joue un rôle fondamental anti-métastatique et la perte de sa fonction adhésive est observée dans nombre de tumeurs agressives, y compris dans celles issues des cancers du sein (Kowalski et al., 2003; De Leeuw et al., 1997). L'adhésion des cellules cancéreuses à la MEC est médiée par les intégrines: des récepteurs transmembranaires qui s'associent à différents composants de la MEC tels que la fibronectine, la laminine, le collagène, le fibrinogène et la vitronectine (Li and Feng, 2011). Plusieurs sous-unités d'intégrines comme $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αv , $\beta 1$ et $\beta 3$ sont surexprimées dans le cancer du sein et sont associées aux processus métastatiques (Rathinam and Alahari, 2010).

- **Dégradation de la matrice extracellulaire:**

Le mécanisme d'invasion des cellules cancéreuses est précédé par un point capital: le clivage protéolytique des composants de la matrice extracellulaire par des protéases. Les cellules du stroma tumoral telles que les macrophages, semblent représenter le type majeur de cellules qui approvisionne le microenvironnement de la tumeur en protéases. Cependant, ces protéases sont non seulement sécrétées par des cellules du microenvironnement tumoral mais également par les cellules cancéreuses elles-mêmes. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études se sont focalisées sur l'implication des MMPs et les activateurs de plasminogène de type urokinases (protéase à sérine) (uPA) dans le phénomène de progression néoplasique (Egeblad and Werb, 2002; Laufs et al., 2006; Lynch and Matrisian, 2002). Toutefois, il est maintenant reconnu que les protéases acides telles que les cathepsines à cystéine et les cathepsines à aspartate, jouent un rôle essentiel dans la progression du cancer. Des études récentes montrent que les cathepsines à cystéine sont surexprimées dans de nombreux cancers dont le cancer du sein (Gocheva and Joyce, 2007; Mohamed and Sloane, 2006). Il existe 11 membres dans la famille des cathepsines à cystéine humains (cathepsines B, C, F, H, L, K, O, S, V, W, X (ou Z)). Dans les cellules normales, les cathepsines à cystéine sont exprimées principalement dans les lysosomes et jouent un rôle dans le recyclage protéique, l'apoptose, l'autophagie ainsi que dans la présentation de l'antigène par les cellules immunitaires (Brix et al., 2008; Conus and Simon, 2008). La cathepsine K est bien connue pour contribuer au remodelage et à la résorption osseuse (Mohamed and Sloane, 2006). Dans le cancer, la localisation lysosomiale des cathepsines à cystéine est souvent altérée. Les cathepsines à cystéine sont retrouvées dans le milieu extracellulaire aussi bien sous formes immatures (zymogènes) que sous formes matures, et sont impliqués dans différents mécanismes de la tumorigénèse *in vivo*, comme l'angiogénèse, l'invasion à travers la matrice

extracellulaire, et dans les métastases (Gocheva and Joyce, 2007; Mohamed and Sloane, 2006). Toutefois les mécanismes impliqués dans leur libération, ainsi que leur activation dans le milieu extracellulaire restent mal connus à ce jour. Le rôle pro-métastatique des cathepsines à cystéine a été démontré dans un modèle de cancer du pancréas chez la souris. Le traitement des souris avec un inhibiteur à large spectre des cathepsines à cystéine diminue l'angiogénèse et l'invasion (Joyce et al., 2004), un effet qui est renforcé lorsque ces inhibiteurs sont combinés avec la chimiothérapie (Bell-McGuinn et al., 2007).

Parmi tous les membres de la famille des cathepsines à cystéine, les cathepsines B et L semblent être les plus impliquées dans la tumorigénèse (Joyce and Hanahan, 2004; Joyce et al., 2004; Lankelma et al., 2010; Mohamed and Sloane, 2006). Les cathepsines B et L sont des marqueurs pronostiques dans plusieurs types de cancer. Leur expression élevée dans les tumeurs primaires est associée à un mauvais pronostic (Jain et al., 2010; Lah et al., 2000; Nouh et al., 2011). Une expression élevée des cathepsines B est corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein (Jedeszko and Sloane, 2004). Dans un modèle de cancer mammaire chez la souris transgénique (modèle "MMTV-PyMT" caractérisé par l'apparition de tumeurs mammaires qui métastasent dans le poumon avec 80-94% d'incidence), une abolition de l'expression de la cathepsine B réduit et retarde les métastases pulmonaires (Vasiljeva et al., 2008), tandis que l'expression accrue de la cathepsine B stimule le développement des métastases dans le même modèle (Sevenich et al., 2011). En outre, l'activité de ces protéases à cystéine entraîne une augmentation de l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* (Gillet et al., 2009).

Il existe plusieurs mécanismes d'action possibles par lesquels ces protéases peuvent favoriser l'invasion des cellules cancéreuses et l'intravasation (**Figure 7**):

- Le clivage des molécules d'adhésion cellulaire, tels que l'E-cadhérine, conduisant à la perturbation des jonctions cellule-cellule (Gocheva and Joyce, 2007; Masterson and O'Dea, 2007). La perte des contacts cellulaires facilite ainsi la migration des cellules cancéreuses.
- La dégradation ou le renouvellement des protéines de la MEC et de la membrane basale qui permettra aux cellules invasives de migrer dans le système vasculaire et les tissus environnants.
- L'activation des facteurs de croissance et des cytokines contenus dans la MEC (Van Damme et al., 2004), ce qui peut augmenter la chimio attraction et la migration cellulaire.

Tous ces mécanismes agissent de concert et promeuvent l'invasivité des cellules cancéreuses. En conséquence, lorsque les membres de certaines de ces familles de protéases sont génétiquement ou pharmacologiquement inhibés, une réduction marquée de l'invasion des cellules cancéreuses est observée (Egeblad and Werb, 2002; Gocheva et al., 2006; Joyce et al., 2004).

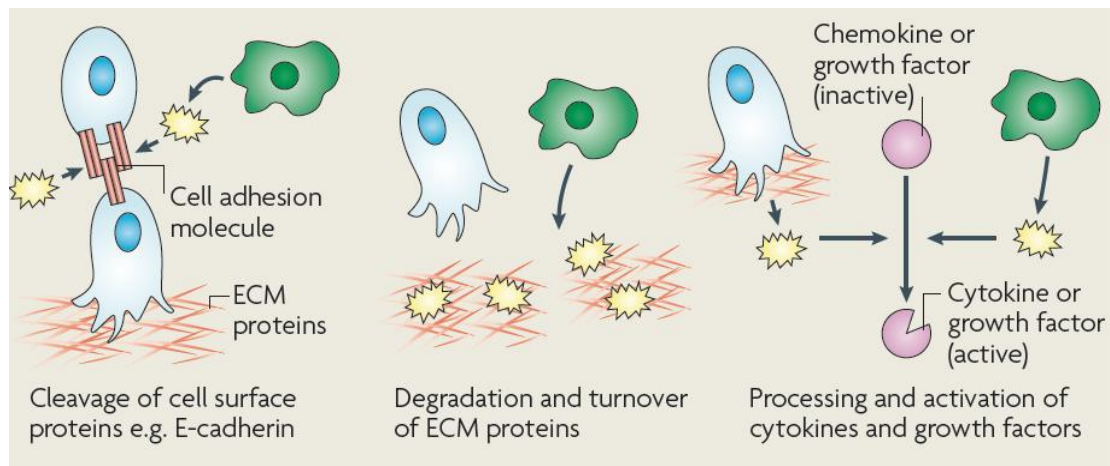


Figure 7 : Mécanismes d'action des protéases pour promouvoir l'invasion des cellules cancéreuses.

Les protéases peuvent cliver des molécules d'adhésion cellulaire, tels que l'E-cadhérine, dégrader ou renouveler les protéines de la MEC, activer des facteurs de croissance et des cytokines (Tiré de Joyce et Pollard, 2009)(Joyce and Pollard, 2009).

- **Migration cellulaire :**

Les cellules cancéreuses qui étaient, jusqu'alors, confinées dans le site de la tumeur primaire vont alors migrer et s'implanter dans un organe situé à distance où elles pourront proliférer, formant ainsi de nouveaux foyers tumoraux, ce qui leur confère un phénotype invasifs.

Sites préférentiels des métastases :

Stephen Paget en 1889, en étudiant le site de localisation des cancers du sein, introduisait la théorie de la "graine et du sol" ("Seed and soil" hypothesis) (Paget, 1989). Selon cette théorie la croissance des métastases ne se fait pas au hasard mais se produit dans certains tissus. Ceci suggère que les cellules cancéreuses s'échappant de la tumeur primitive ne vont croître que dans certains sites qui lui sont favorables. Il existe actuellement un grand nombre d'arguments scientifiques qui contribuent à légitimer cette théorie. Chez l'homme, certaines tumeurs métastasent vers des sites ou organes privilégiés. Par exemple, les cancers du sein métastasent préférentiellement au niveau des poumons et des os, mais aussi à d'autres organes tels que le foie et le cerveau (Minn et al., 2005; Nguyen et al., 2009). D'autres cancers tels que les

mélanomes métastasent au foie, au cerveau et la peau, le cancer de la prostate au niveau des os, et le cancer du poumon au niveau des os également mais aussi vers le foie et le cerveau. Cette spécificité d'organe est étroitement liée au microenvironnement tumoral primaire et métastatique mais également aux cellules cancéreuses et nécessite l'intervention d'une multitude de signaux, et de facteurs tels que les chemokines. Il a été montré que les tissus du cancer du sein expriment fortement les récepteurs de chemokines 4 (CXCR4), tandis que leurs ligands, les chemokines 12 (CXCL12), est principalement exprimé dans les ganglions lymphatiques, les poumons, le foie et la moelle osseuse, mais faiblement exprimé dans l'intestin grêle, les reins, le cerveau, la peau et les muscles squelettiques (Müller et al., 2001). Les organes avec une expression élevée de CXCL12 étaient associés au fait d'être des sites communs pour les cancers du sein métastatique. En outre, Muller et collaborateurs ont démontré que les interactions entre CXCR4 et CXCL12 encourageaient la migration des cellules cancéreuses mammaires vers les sites privilégiés des cancers du sein métastatique (Müller et al., 2001). Une autre explication simplement mécanistique, pour expliquer également cette localisation préférentielle des métastases dépend de la taille des cellules cancéreuses et des capillaires sanguins au sein des différents organes. Cette explication est très vraisemblable dans certains cas comme celui de la survenue préférentielle des métastases hépatiques dans le cancer du côlon ou des métastases pulmonaires des cancers du sein.

II. Adénosine 5'-Triphosphate

L'adénosine triphosphate est la principale source d'énergie dans les cellules vivantes, mais l'ATP joue également un rôle physiologique fondamental en tant que messenger extracellulaire qui permet aux cellules et aux tissus de communiquer les uns avec les autres en agissant sur les récepteurs purinergiques de la membrane plasmique nommés P2.

A. Historique de "La double vie de l'ATP"

L'ATP a été isolée pour la première fois par Karl Lohmann en 1929. A cette époque les chercheurs, partout dans le monde, tentaient de déceler la source insaisissable d'énergie cellulaire. Pendant la même époque Szent-Györgyi et Drury trouvent les premiers effets de purines extracellulaires sur le cœur (Drury and Szent-Györgyi, 1929). En 1935 Katashi Makino a proposé une structure de la molécule d'ATP qui était confirmée 10 ans plus tard par Basil Lythgoe et Alexander Robert Todd. La surprenante découverte de Szent-Györgyi et Drury est restée dans l'ombre jusqu'à ce que Geoffrey Burnstock dans les années soixante, émette l'hypothèse que l'ATP et les purines en général pourraient exercer des fonctions extracellulaires (Burnstock et al., 1964), cependant cette hypothèse s'est heurtée au scepticisme des scientifiques qui ne croyaient pas qu'une molécule qui agit comme une source d'énergie intracellulaire pouvait également fonctionner comme un messenger extracellulaire. Quelques années plus tard, à force de persévérance et de travail acharné Burnstock a réussi à confirmer son hypothèse et voilà qu'un nouveau concept au nom de 'la signalisation purinergique' a vu le jour (Burnstock, 1972).

B. Voies de libération de l'ATP

Bien que la concentration d'ATP intracellulaire est de l'ordre du millimolaire (3-10 mM), la concentration extracellulaire est considérablement plus faible. On estime que la concentration physiologique de l'ATP dans le sang est de l'ordre de nanomolaire (20-100 nM), et a tendance à augmenter après un effort physique (Forrester, 1972). La libération de nucléotides endogènes représente une étape essentielle dans l'initiation de la signalisation purinergique. Les mécanismes de la libération d'ATP par les cellules sont variés et restent encore mal caractérisés à ce jour (Orriss et al., 2009). Il est largement admis qu'une fuite massive d'ATP dans le milieu extracellulaire se produit suite aux dommages de la membrane

plasmique ou suite à une nécrose cellulaire conditionnée par un choc traumatique, lésions d'organes (Burnstock, 2008). Ces conditions représentaient pour beaucoup la seule voie de libération possible d'ATP. Il est maintenant admis que l'ATP est aussi libérée par des mécanismes non lytiques dans des conditions physiologiques. L'ATP est libérée activement par plusieurs cellules excitables/sécrétrices tels que les neurones, les cellules chromaffines, les cellules acineuses pancréatiques et les plaquettes (Orriss et al., 2009). La libération de nucléotides se produit, également, dans plusieurs cellules non-excitables telles que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les astrocytes, les fibroblastes, les hépatocytes, les cellules osseuses, les kératinocytes, les cardiomyocytes, les érythrocytes, les neutrophiles, les monocytes et les macrophages ainsi que d'autres cellules hématopoïétiques (Yegutkin, 2008). L'ATP peut être libérée de deux façons :

- **Libération stimulée**

Une libération d'ATP peut être engendrée en réponse à une variété de stimulus et peut conduire à une augmentation rapide, forte et transitoire de sa concentration vers le milieu extérieur. Une telle libération peut être induite par un stress mécanique se produisant par gonflement osmotique, rétrécissement cellulaire, étirements membranaires (Corriden and Insel, 2010), et changement de milieu de culture... mais aussi par d'autres stimuli tels que la stimulation par des agonistes cholinergiques (Novak et al., 2010; Sorensen and Novak, 2001).

- **Libération constitutive**

Une libération spontanée ou constitutive de nucléotides a été suggérée pour beaucoup de cellules, comme les cellules épithéliales bronchiques, les cellules de gliome de rat C6, les cellules d'astrocytome humain 1321N1 (Lazarowski et al., 2000, 2003), les cellules de la lignée de macrophages BAC1.2F5 (Beigi and Dubyak, 2000) et par l'épithélium olfactif des souris néonatales (Hayoz et al., 2012).

Plusieurs mécanismes de transport spécifiques semblent alors impliqués dans la libération d'ATP. Il ne fait plus aucun doute que, grâce à son gradient de concentration chimique favorable, l'ATP peut facilement être transportée passivement hors de la cellule (Schwiebert and Zsemberly, 2003). Cependant le nucléotide ne diffuse pas directement à travers la membrane plasmique, du fait de ses charges nettes négatives apportées par les

groupements phosphates. Plusieurs mécanismes ont alors été avancés mais font toujours l'objet de débats (**Figure 8**):

- Transport à travers les canaux ioniques membranaires : L'hémicanal connexine a été proposé comme mécanisme de transport de l'ATP et certaines études ont montré que les pannexines seraient des pores pour la libération d'ATP (Huang et al., 2007; Kang et al., 2008). D'autres études ont suggéré également que le récepteur P2X₇ permettrait la libération de l'ATP (Pellegatti et al., 2005; Suadicani et al., 2006).
- Diffusion facilitée impliquant des transporteurs de la famille ABC (*ATP Binding Cassette*), comme le régulateur de la conductance transmembranaire de la mucoviscidose (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, *CFTR*). Les premières études ont suggéré que la protéine CFTR était responsable de la libération d'ATP, mais d'autres travaux menés ultérieurement ont indiqué qu'il était plus probable que la protéine CFTR régule, plutôt que médie, la libération d'ATP (Corriden and Insel, 2010). Les MDR (*multidrug resistant protein*) tels que la P-glycoprotéine (P-gp) pourraient participer à ce mode de transport d'ATP (Bodin and Burnstock, 2001).
- Exocytose vésiculaire des granules de sécrétion contenant les nucléotides. Ce mécanisme pourrait être un phénomène ubiquitaire de la plupart des cellules (Bodin and Burnstock, 2001). Ce mécanisme est bien caractérisé au niveau synaptique où l'ATP sert de neurotransmetteur.

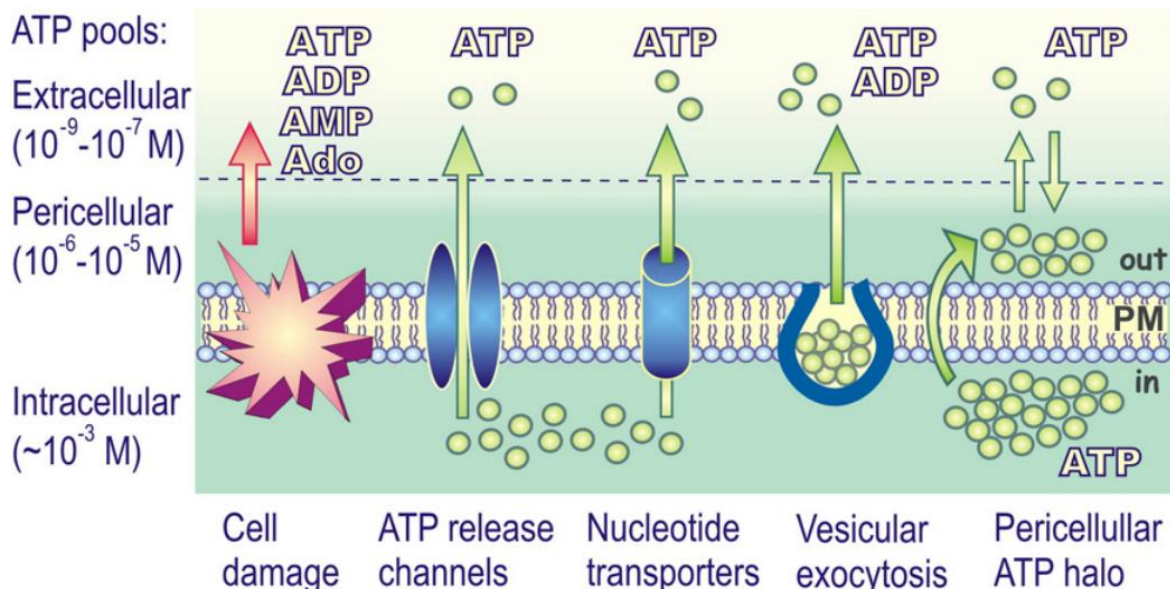


Figure 8 : Les différentes voies de la libération des nucléotides.

(1) Fuite massive de nucléotides par voie lytique suite aux dommages cellulaires, les nucléotides peuvent apparaître aussi dans le milieu extracellulaire via diverses voies non-lytiques, y compris (2) à travers des canaux de libération d'ATP, (3) la diffusion facilitée par des transporteurs de nucléotides spécifiques et (4) exocytose vésiculaire. En outre, la capacité des cellules à conserver un halo d'ATP dans l'espace péricellulaire a été proposée récemment et semble impliquer d'autres mécanismes mal compris (Yegutkin, 2008).

C. Hydrolyse de l'ATP

Une fois hors de la cellule, l'ATP a une demi-vie très courte, qui se mesure généralement en secondes. La concentration d'ATP dans le milieu extracellulaire est en effet la résultante nette de deux processus: la libération et la dégradation de l'ATP (Di Virgilio, 2012). Cependant un processus de synthèse d'ATP via des réactions de transfert de groupement phosphate, par deux enzymes, l'adénylate kinase et la nucléoside diphosphate kinase a été décrit. Ces kinases étaient initialement décrites comme enzymes intracellulaires, mais d'autres études ont reporté leurs localisations au niveau de la membrane plasmique de différents types cellulaires (Yegutkin, 2008). Ce processus de synthèse d'ATP pourrait jouer un rôle très important dans le maintien d'une concentration d'ATP extracellulaire élevée.

La dégradation de l'ATP est contrôlée par l'activité séquentielle de 4 types d'enzymes différents appelés ectoenzymes qui sont localisées sur les surfaces cellulaires ou retrouvées sous formes solubles dans le milieu interstitiel ou les fluides corporels. Il s'agit des ectonucléotidases qui sont principalement impliquées dans la dégradation de l'ATP extracellulaire et comprennent (Bours et al., 2006) : la famille des ectonucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (E-NPPs), la famille des ectonucléotides triphosphates diphosphohydrolases (E-NTPDases), les phosphatases alcalines, et l'ecto-5'-nucléotidase (Figure 9).

- **Les ectonucléotides triphosphates diphosphohydrolases (E-NTPDases):** Ces ectoenzymes catalysent la dégradation séquentielle des nucléosides tri et/ou diphosphates, mais pas les monophosphates et nécessitent des concentrations de Ca^{2+} et Mg^{2+} de l'ordre du millimolaire pour avoir une activité maximale. Huit gènes ENTPD différents codent pour les membres de cette famille de la protéine NTPDase dont NTPDase1, -2, -3 et -8 sont impliqués dans la dégradation de l'ATP et de l'adénosine 5'-diphosphate (ADP) en adénosine 5'-monophosphate (AMP) (Yegutkin, 2008).
- La deuxième famille **des ectonucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (E-NPPs)** se compose de 7 ectoenzymes structurellement apparentées (NPP1 jusqu'à NPP7), cependant seuls les 3 premiers membres de cette famille (NPP1, -2, -3) sont capables d'hydrolyser divers nucléotides: l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) en AMP, l'ATP en AMP et l'ADP en AMP. Un variant d'épissage de NPP2 est impliqué dans la conversion de l'AMP en adénosine (Ado).

- Les **phosphatases alcalines** sont des ectophosphomonoesterases non spécifiques catalysant la dégradation des nucléotides tri-, di-et monophosphates.
- Enfin la quatrième famille est représentée par l'**ecto-5'-nucléotidase/CD73** qui catalyse l'hydrolyse de l'AMP en Ado.

In fine, l'ATP extracellulaire est dégradée en ADP, AMP et finalement en Ado. Alors que l'ADP peut activer d'autres récepteurs P2, l'Ado active les récepteurs P1. Enfin d'autres enzymes telles que, l'adénosine désaminase et la purine nucléoside phosphorylase (PNP), peuvent inactiver l'adénosine en inosine puis en hypoxanthine (Bours et al., 2006; Yegutkin, 2008).

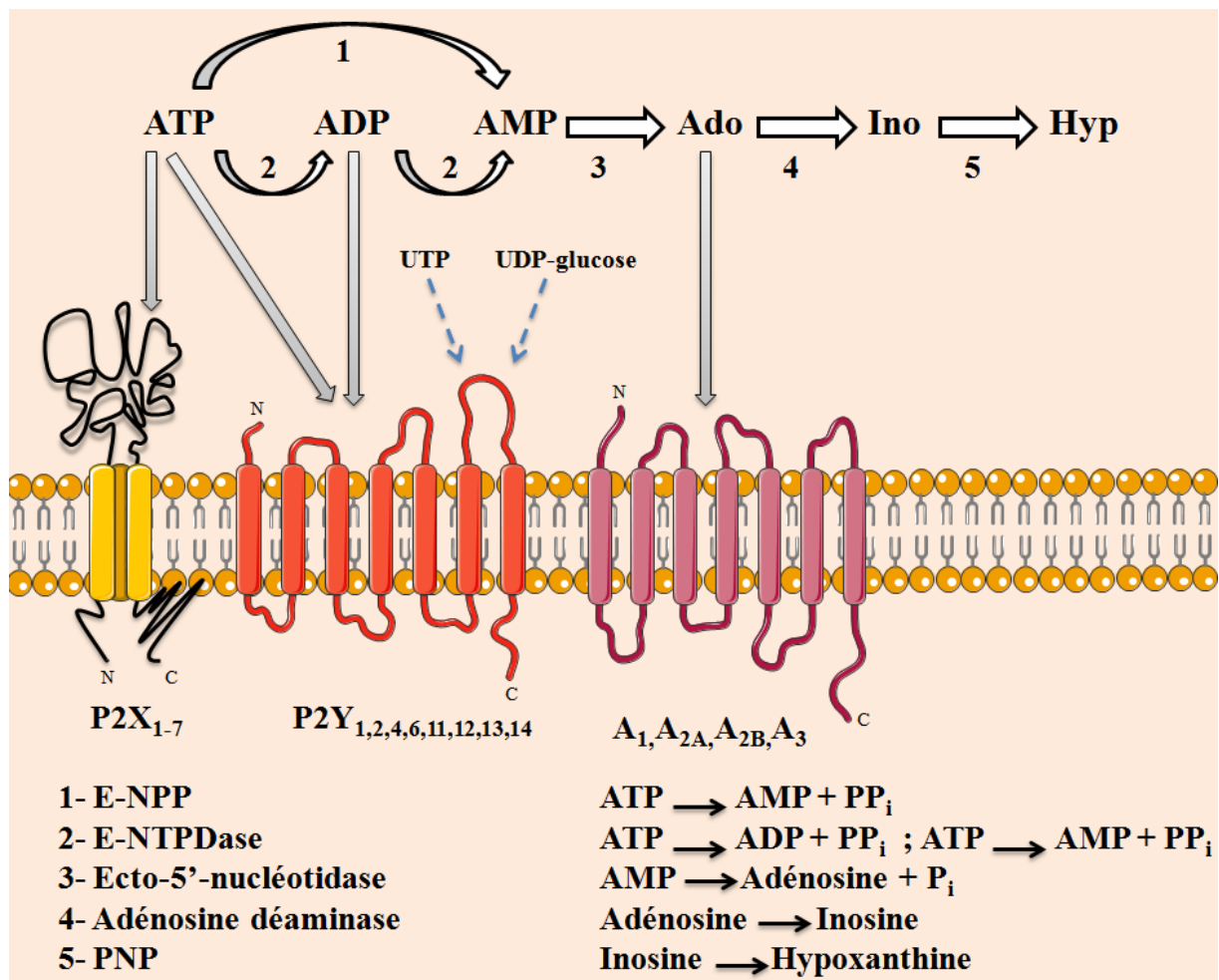


Figure 9 : Schéma illustrant les mécanismes d'inactivation de l'ATP extracellulaire (ou des purines) au niveau de la surface cellulaire.

Les nucléotides sont hydrolysés par plusieurs ectoenzymes (E-NPPs, E-NTPDases, ecto-5'- nucléotidases). L'ado résultant est à son tour désaminée en inosine (Ino) et en hypoxanthine (Hyp) via l'action séquentielle de l'ado désaminase et de la purine nucléoside phosphorylase (Yegutkin, 2008). L'ATP agit sur les récepteurs P2X et certains récepteurs P2Y. D'autres récepteurs P2Y sont activés par l'ADP, l'UTP et l'UDP-glucose. L'adénosine agit sur les quatre récepteurs à l'adénosine. Illustration réalisée grâce à Servier Medical Art.

III. Les récepteurs purinergiques

Ce qui est implicite dans le concept de la signalisation purinergique, c'est l'existence d'une large famille de récepteurs membranaires qui intervient dans la signalisation cellulaire engendrée par l'ATP extracellulaire et d'autres nucléotides (purinergiques et pyrimidiques). C'est en 1978, soit 2 ans après que la notion de récepteurs purinergiques aient été définie, que Burnstock introduisit le concept selon lequel les actions des nucléotides extracellulaires dépendent de récepteurs spécifiques qu'il nomma "récepteurs purinergiques P2" stimulés par l'ATP et/ou l'ADP, par opposition au terme "purinergique P1" réservé aux récepteurs à l'adénosine (Burnstock, 1978). Après de nombreux ajustements au fil des découvertes, une nomenclature a été largement adoptée par le monde scientifique et qui fait état de 2 familles majeurs appartenant aux récepteurs purinergiques P2, les récepteurs P2X ionotropiques (7 sous-types), et les récepteurs P2Y métabotropiques (8 sous-types), et la famille des récepteurs à l'adénosine P1 métabotropiques (4 sous-types).

A. Les récepteurs P1 :

Quatre différents sous-types de récepteurs P1 ont été clonés et caractérisés à ce jour, les récepteurs A₁, A_{2A}, A_{2B} et A₃. Ces récepteurs sont impliqués dans plusieurs fonctions physiologiques et pathophysiologiques, en particulier la modulation du système nerveux central, le système immunitaire, le système cardiovasculaire, l'angiogénèse, la régulation du sommeil, le débit sanguin rénal, la lipolyse, ainsi que des maladies inflammatoires et neurodégénératives et l'ischémie-reperfusion (Chen et al., 2013; Ralevic and Burnstock, 1998). Les récepteurs P1 sont principalement activés par l'adénosine extracellulaire avec des affinités différentes. Tous ces récepteurs sont membres de la famille des récepteurs couplés à des protéines G (RCPG). Ces récepteurs possèdent sept domaines transmembranaires, formés chacun d'une hélice alpha constituées d'approximativement 21 à 28 acides aminés hydrophobes. Leur extrémité N-terminale extracellulaire est relativement courte (7-13 résidus), de même que leur extrémité C-terminale cytoplasmique (32-120 résidus) (Fields and Burnstock, 2006) (**Figure 10**).

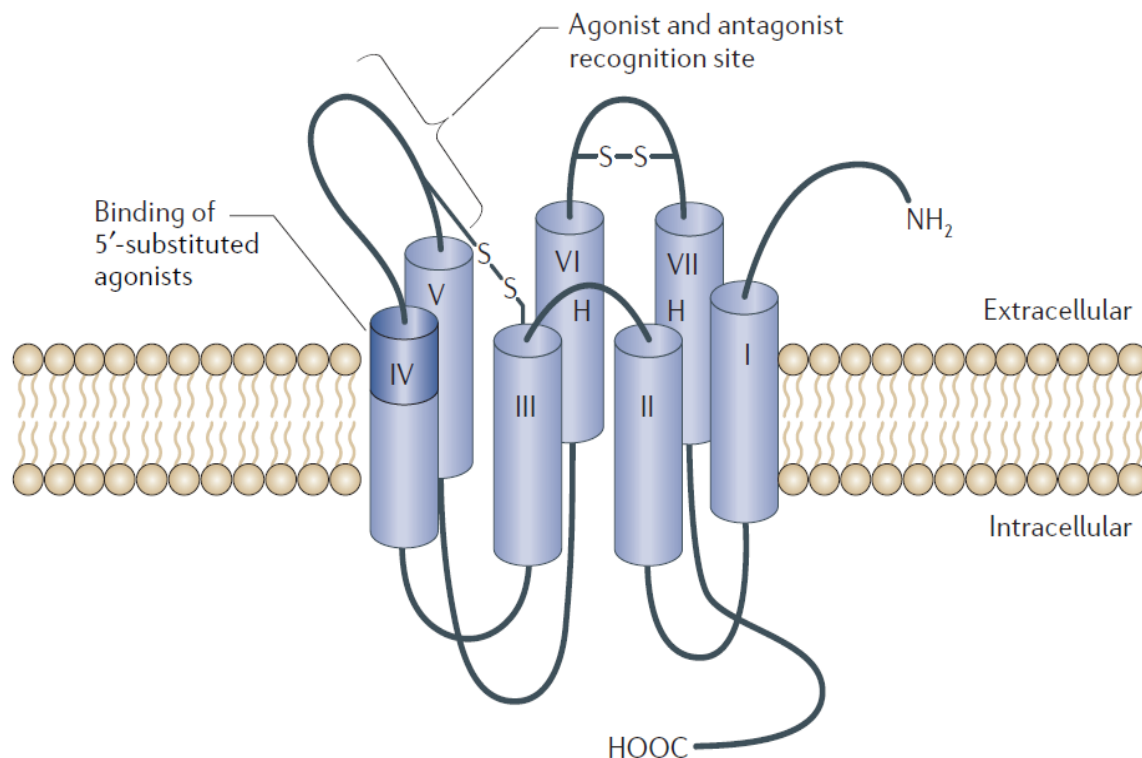


Figure 10 : Structure schématique du récepteur A₁.

Les récepteurs P1 couplés à des protéines G, possèdent sept domaines transmembranaires (I-VII) constitués d'acides aminés hydrophobes, et connectés entre eux par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. L'extrémité N-terminale de la protéine se trouve du côté extracellulaire, l'extrémité C-terminale se trouve du côté cytoplasmique. Les résidus histidine (H) localisés dans les régions transmembranaires VI (position 254) et VII (position 278) (dans le récepteur A₁ bovin) joueraient un rôle dans la fixation du ligand adénosine. Les régions extracellulaires et transmembranaires du récepteur impliquées dans la reconnaissance des agonistes et des antagonistes sont indiquées. S-S indique la présence possible de ponts disulfures intracaténaux (Fields et Burnstock, 2006 modifiées à partir de la publication Ralevic & Burnstock 1998) (Fields and Burnstock, 2006).

Les récepteurs P1 sont couplés principalement à l'adénylate cyclase par différentes protéines G (G_s ou G_i) et peuvent induire de ce fait un spectre large de voies de signalisation intracellulaires. Une stimulation de ces récepteurs à l'adénosine par des agonistes a pour effet soit une inhibition (G_i) soit une activation de l'adénylate cyclase (G_s), entraînant ainsi la diminution ou l'augmentation de la concentration intracellulaire du second messager l'AMPc.

1. Les récepteurs A₁

C'est le sous-type de récepteur le plus conservé parmi les espèces. Ils sont largement exprimés dans tout le corps humain et particulièrement dans le cerveau au niveau des terminaisons nerveuses excitatrices. Ils sont couplés à l'adénylate cyclase via une sous unité alpha de la protéine G_{i/o}. La stimulation de ces récepteurs entraîne ainsi une inhibition de la

production basale de l'AMPc. Ceci constitue la voie de signalisation la plus largement reconnue pour ce récepteur. Cependant l'activation de ce récepteur pourrait aussi activer la phospholipase C (PLC) via une protéine $G_{q/11}$, entraînant l'augmentation de la production d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) et de diacylglycérol (DAG) et donc une mobilisation calcique. La stimulation de récepteur A_1 permet l'activation de différents types de canaux potassiques (y compris les canaux K_{ATP} dans les neurones et le myocarde) et bloque les canaux calciques transitoires. Les Récepteurs A_1 réduisent aussi l'activité neuronale, en bloquant la libération de neurotransmetteurs. Ils possèdent également des effets négatifs chronotropes et inotropes dans le cœur. Ces récepteurs exercent aussi des effets physiologiques important dans de nombreux autres organes et cellules (Burnstock, 2012; Chen et al., 2013).

2. Les récepteurs A_2

Contrairement aux récepteurs A_1 , les récepteurs A_2 sont positivement couplés à l'adénylate cyclase via la protéine G_s essentiellement. Ils sont divisés en deux sous-type A_{2A} et A_{2B} .

a) Les récepteurs A_{2A}

Ils sont fortement exprimés dans le striatum du cerveau, les cellules immunitaires de la rate, le thymus, les leucocytes et les plaquettes sanguines. Des niveaux intermédiaires d'expression se trouvent dans le cœur, les poumons et les vaisseaux sanguins. Les récepteurs A_{2A} peuvent être couplées à la protéine G_s dans les tissus périphériques, mais aussi à la protéine $G_{\alpha_{olf}}$, qui comme la protéine G_{α_s} active l'adénylate cyclase et se trouve dans l'épithélium olfactif et dans le cerveau (Corvol et al., 2001). Dans le cerveau, les Récepteurs A_{2A} règlent l'activité motrice, les comportements psychiatriques, le cycle veille-sommeil et la mort des cellules neuronales en interagissant avec plusieurs neurotransmetteurs. Dans les tissus périphériques, les récepteurs A_{2A} ont un rôle crucial dans la modulation de l'inflammation, la consommation d'oxygène du myocarde, le débit sanguin coronaire, l'angiogénèse et le contrôle de la pathogénèse du cancer (Chen et al., 2013; Fields and Burnstock, 2006).

b) Les récepteurs A_{2B}

Ces récepteurs sont peu abondants mais largement exprimés. Ils sont faiblement sensibles à l'adénosine par rapport au reste des récepteurs (A_1 , A_{2A} et A_3) et sont stimulés par

des concentrations de l'ordre de micromolaire qui ne sont que rarement atteint dans des conditions physiologiques telles que l'hypoxie, l'ischémie ou l'inflammation. Il permet l'adaptation des tissus à hypoxie, une tolérance augmenté à l'ischémie, ou atténuation de l'inflammation aiguës. Le récepteur A_{2B} humain peut également être couplé à une protéine $G_{q/11}$ et donc régule l'activité de la PLC (Chen et al., 2013).

3. Les récepteurs A_3

Il existe des variations considérables dans la pharmacologie, la distribution et la fonction des récepteurs A_3 entre les espèces animales. Il est faiblement exprimé dans la plupart des cellules et des tissus humains. Par contre, ce récepteur est surexprimé dans les cellules sanguines de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn et du cancer du côlon par rapport aux sujets sains. Des études précliniques ont démontré des effets anti-inflammatoires, anticancéreux et cytoprotecteurs des agonistes des récepteurs A_3 (Chen et al., 2013). Comme le récepteur A_1 , le récepteur A_3 est couplé à la protéine $G_{i/o}$ et donc régule négativement l'adénylate cyclase (Burnstock, 2007a). L'activation des récepteurs A_3 peut entraîner également une augmentation des taux d' IP_3 et de Ca^{2+} intracellulaires compte tenu de son couplage avec la protéine $G_{q/11}$ dans les cellules leucémiques basophiles et dans le cerveau de rat (Fields and Burnstock, 2006).

B. Les récepteurs P2

Les récepteurs P2 sont sub-divisés en deux grandes familles distinctes, les récepteurs ionotropiques P2X et les récepteurs métabotropiques P2Y. Les récepteurs P2X sont des récepteurs-canaux ioniques qui, en réponse à l'ATP extracellulaire, permettent le passage des cations Na^+ , Ca^{2+} et K^+ selon leur gradient électrochimique (Khakh and North, 2006). Les récepteurs P2Y sont, tout comme les récepteurs P1, des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplées aux protéines G (Abbracchio et al., 2006). À ce jour, sept sous-types de récepteurs P2X et huit sous-types de récepteurs P2Y ont été caractérisés et clonés chez les mammifères (Ralevic and Burnstock, 1998).

1. Les récepteurs P2Y

C'est en 1993, que les premiers récepteurs P2Y ($P2Y_1$ et $P2Y_2$) ont été clonés (Lustig et al., 1993; Webb et al., 1993). S'en suit, le clonage d'autres sous-types de récepteur P2Y ($P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$) (Ralevic and Burnstock, 1998). La numérotation non-consécutive de ces récepteurs est dû à l'identification, la désignation erronée et prématurée d'autres sous-types de

récepteurs chez des espèces autres que les mammifères ou des récepteurs possédant une séquence proche de celle des récepteurs P2Y mais pour lesquels aucune réponse fonctionnelle aux nucléotides n'est connue (Abbracchio et al., 2006). En 2001, le récepteur P2Y₁₂ a été isolé par clonage (Hollt et al., 2001), tandis que deux autres récepteurs P2Y₁₃ et P2Y₁₄ ont été caractérisés plus tard au cours d'une étude systématique des récepteurs orphelins (Chambers et al., 2000; Communi et al., 2001). Huit sous-types de récepteurs P2Y humains ont jusqu'ici été identifiés, les récepteurs P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ et P2Y₁₄ (Abbracchio et al., 2006). Le récepteur orphelin GPR₈₀/GPR₉₉ a été initialement désigné comme le récepteur P2Y₁₅ sur la base qu'il serait activé par l'AMP, mais il est maintenant bien établi qu'il est en fait un récepteur pour l' α -céto-glutarique (Abbracchio et al., 2005).

a) Structure

Les récepteurs P2Y sont des protéines dont la longueur varie entre 308 à 377 acides aminés et un poids moléculaire allant de 41 à 53 kDa (après glycosylation) (Ralevic and Burnstock, 1998). Ils représentent, comme les récepteurs P1, la même structure tridimensionnelle que les récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, avec une extrémité amino-terminale extracellulaire qui contient des sites potentiels de glycosylation, et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire qui contient des sites consensus de phosphorylation par des protéines kinases. Les sept domaines transmembranaires accolés formeraient une poche d'accueil susceptible d'interagir avec les ligands. Contrairement aux récepteurs P1, les récepteurs P2Y ne sont pas sensibles à l'adénosine mais à des nucléotides di ou tri-phosphate comme l'ATP et l'ADP, voire l'UTP, l'UDP et l'UDP-hexose. Des expériences de mutagenèse dirigée sur les récepteurs P2Y₁ et P2Y₂, ont permis d'identifier, dans les régions transmembranaires 3, 6 et 7, des acides aminés chargés positivement qui jouent un rôle crucial dans l'activation du récepteur par les nucléotides (Erb et al., 1995; Jiang et al., 1997). La liaison des ligands se fait par interactions électrostatiques avec les phosphates de l'ATP (Van Rhee et al., 1995). En outre, quatre résidus cystéine conservés et situés dans les boucles extracellulaires, sont connus pour être indispensables pour l'adressage correct du récepteur à la surface cellulaire (Hoffmann et al., 1999). Il a été reporté que des sous-types des récepteurs P2Y peuvent former des hétéromères (Abbracchio et al., 2006). Le récepteur P2Y₁ pourrait former un complexe avec le récepteur A₁ activé par l'adénosine (Burnstock, 2007b).

D'un point de vue phylogénétique et structural, deux sous-groupes de récepteurs P2Y, dont les séquences protéiques sont très divergentes ont été identifiés (Abbracchio et al., 2006). Le premier sous-groupe correspondant à la sous-famille des récepteurs "P2Y₁-like" comprend les récepteurs P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄ et P2Y₆ qui sont couplés à des protéines G_{q/11} dont la stimulation conduit à l'activation de la PLC β qui provoque la génération d'IP₃ et de DAG. Ce premier groupe partage entre 35 à 52% d'homologie dans la séquence primaire. Le récepteur P2Y₁₁, couplé à la fois à la protéine G_{q/11} qui entraîne la stimulation de la PLC et à la protéine G_s qui active l'adénylate cyclase et stimule la production de l'AMPc, est considéré aussi comme membre de cette sous-famille même s'il présente seulement 28 à 30% d'homologie avec les quatre autres membres de la sous-famille des récepteurs "P2Y₁-like". Il n'est par ailleurs pas présent chez les rongeurs (Harden et al., 2010). Le second sous-groupe correspond à la sous-famille des récepteurs "P2Y₁₂-like" et comprend les récepteurs P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ qui présentent une homologie de séquence allant de 45 à 50%. Contrairement à la sous-famille des récepteurs "P2Y₁-like", P2Y₁₂, P2Y₁₃ et P2Y₁₄ semblent couplés aux protéines G_i dont l'activité inhibe l'adénylate cyclase et la production d'AMPc (**Figure 11**).

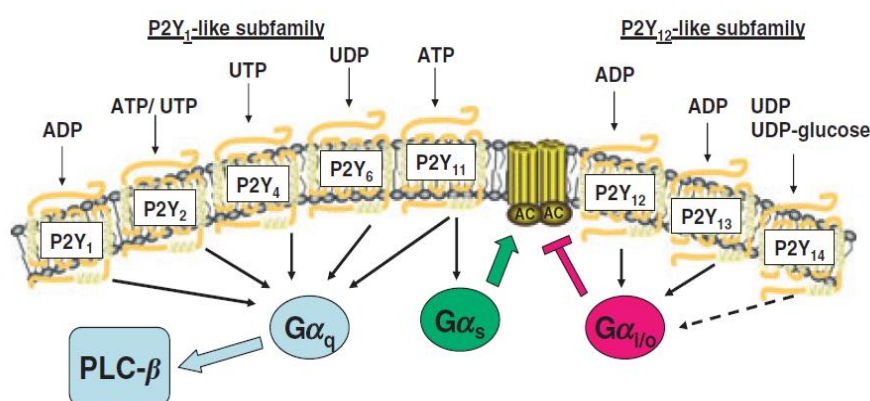


Figure 11 : Les différents récepteurs P2Y.

Les 8 récepteurs P2Y de mammifères et leurs agonistes préférentiels sont indiqués. Les 5 membres de la sous famille des récepteurs "P2Y₁-like" sont couplés à des protéines G de la famille G α_q et activent la PLC β . Le récepteur P2Y₁₁ activé par l'ATP, est aussi couplé à la protéine G_s qui active l'adénylate cyclase et stimule la production de l'AMPc. Les 3 membres de la sous famille des récepteurs "P2Y₁₂-like" sont couplés à des protéines G de la famille G $\alpha_{i/o}$ qui inhibe l'activité de l'adénylate cyclase. Image modifiée d'après T. K. Harden et al, 2010 (Harden et al., 2010).

Il faut signaler que parallèlement à ses voies de couplages majeures d'autres voies de signalisation dépendantes du ligand ont été rapportées. Par exemple, le récepteurs P2Y₁₃ qui, à part son couplage à la protéine G₁₆ et G_i, peut être couplé à la protéine G_s en présence de forte concentration d'ADP (Burnstock, 2007a). L'activation du récepteur P2Y₁₁, par exemple,

par l'ATP génère une augmentation du taux d'AMPc et d'IP₃ alors qu'une activation avec l'UTP induirait uniquement une élévation de calcium intracytoplasmique sans l'augmentation de l'AMPc ni de l'IP₃ (Burnstock, 2007a).

D'un point de vue pharmacologique les récepteurs P2Y peuvent être subdivisés en quatre groupes (Abbracchio et al., 2006) :

- les récepteurs ayant plus d'affinité pour les purines et activés préférentiellement par l'ATP et l'ADP. Ce groupe comprend les récepteurs P2Y₁, P2Y₁₁, P2Y₁₂ et P2Y₁₃ (chez les rongeurs et les humains). Les récepteurs P2Y₁₁ humains semblent être activés par l'UTP également (White et al., 2003).
- les récepteurs ayant plus d'affinité pour les pyrimidines (répondant à l'UTP et à l'UDP). Ce groupe comporte les récepteurs humains P2Y₄ et P2Y₆.
- les récepteurs présentant une sélectivité mixte, parmi lesquels le récepteur P2Y₂ humain et de rongeur et le récepteur P2Y₄ de rongeur ; et comme indiquée dans le premier groupe, éventuellement le récepteur P2Y₁₁.
- le récepteur P2Y₁₄ répondant uniquement aux pyrimidines-hexose tels que l'UDP-glucose et à l'UDP-galactose.

b) Pharmacologie

Tableau 2 : Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des récepteurs P2Y.

	Agonistes	Antagonistes	Couplage primaire aux protéines G	Second messenger
P2Y₁	MRS2365 >2-MeSADP=Ap ₅ (YB)>> ADPβS >ATP>2-MeSATPADP	MRS2500>MRS2279>MRS2179, PIT, A3P5P	G _q /G ₁₁	Activation de la PLC-β
P2Y₂	2-Thio-UTP> UTP, MRS2698≥ATP, INS 365>INS 37217, UTP _γ S > Ap ₄ A>MRS2768, Up ₄ -phenyl ester	AR-C126313>Suramin> RB2, PSB-716, MRS2576	G _q /G ₁₁ (G _i /G ₀)	Activation de la PLC-β
P2Y₄	2'-Azido-dUTP> UTP _γ S, UTP ≥ ATP≥ Ap ₄ A Up ₄ U	ATP(humain)>Reactive Blue2> Suramin, MRS2577, PPADS	G _q /G ₁₁ (G _i)	Activation de la PLC-β
P2Y₆	MRS2693>UDPβS, PSB-0474>INS48823,Up ₃ U, 3-phenacyl-UDP>>UDP>UTP>> ATP, α,β-meUDP	MRS2578(non compétitif)> Reactive Blue2, PPADS, MRS2567, MRS2575(humain)	G _q /G ₁₁	Activation de la PLC-β
P2Y₁₁	ATP _γ S> AR-C67085MX > BzATP≥ATP,NF546, NAD ⁺ , NAADP ⁺	NF157>Suramin> RB2, 5'-AMPS, NF340, AMP-α-5,	G _q /G ₁₁ et (G _s)	Activation de la PLC-β
P2Y₁₂	2-MeSADP≥ADP>ATP,ADP-β-S	AR-C69931 MX> AZD6140, INS50589>RB2>2-MeSAMP AR-C66096, CT50547, PSB-0413, Carba-nucleosides, MRS2395, AR-C67085	G _{ai}	inhibition de l'adénylate cyclase
P2Y₁₃	ADP=2- MeSADP>2-MeSATP, ATP	AR-C69931 MX> AR-C67085> MRS2211, 2-MeSAMP	G _i /G ₀	inhibition de l'adénylate cyclase
P2Y₁₄	MRS2690>UDP>UDPglucose≥ UDP-galactose, UDP-glucosamine	*	G _i /G ₀	inhibition de l'adénylate cyclase

* : Aucun antagoniste n'a été reporté.

D'après (Burnstock, 2012; Jacobson and Boeynaems, 2010).

c) Distribution

Les récepteurs P2Y sont impliqués dans la régulation d'un large éventail de réactions physiologiques (Abbracchio et al., 2006; Burnstock, 2007a) et sont particulièrement importants dans le cerveau (P2Y₁ et P2Y₂), dans le système nerveux autonome et dans le tissu vasculaire (la majorité voir la totalité de ces récepteurs P2Y), dans l'épithélium des voies respiratoires, dans le tractus gastro-intestinal, les reins, les yeux et d'autres tissus (P2Y₂, P2Y₄ et P2Y₆), dans les plaquettes (P2Y₁) et dans les cellules immunitaires et inflammatoires (P2Y₂ et P2Y₆) (Harden et al., 2010). En plus de sa présence dans les plaquettes où il joue un rôle très important dans l'agrégation plaquettaire, le récepteur P2Y₁₂ est largement distribué dans le cerveau (Hollt et al., 2001). Il est également impliqué dans l'effet chimiotactique de l'ADP sur les cellules microgliales au cours de l'inflammation (Haynes et al., 2006). Le récepteur P2Y₁₃ est également exprimé dans le cerveau et est présent en grande quantité dans la rate (Communi et al., 2001). Le récepteur P2Y₁₄ est exprimé à des niveaux relativement élevés dans le cerveau, le placenta, dans les neutrophiles, les lymphocytes, les mégacaryocytes, les cellules épithéliales de différents tissus et dans le muscle lisse gastro-intestinal (Abbracchio et al., 2006; Harden et al., 2010).

2. Les récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont à la fois des récepteurs membranaires et des canaux ioniques (récepteurs ionotropiques) dont l'ouverture est dépendante de la fixation de l'ATP sur une boucle extracellulaire. Ils appartiennent à la famille des canaux ioniques dépendants de ligands qui comprend 3 catégories structurales: (1) la superfamille des récepteurs pentamériques *Cys-loop* (qui comprend les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, les récepteurs 5-HT₃ activé par la sérotonine, les récepteurs activés par le zinc (*zinc-activated channels*, ZAC), les récepteurs GABA (acide gamma-aminobutyrique) de type A et les récepteurs de la glycine (*strychnine-sensitive glycine receptors*), (2) les récepteurs tétramériques au glutamate (qui comprend les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) et les récepteurs kaïnate) et finalement (3) on trouve les récepteurs P2X trimériques (Collingridge et al., 2009) (**Figure 12**). Les premiers récepteurs P2X (P2X₁ et P2X₂) ont été clonés en 1994 (Brake et al., 1994; Valera et al., 1994), et depuis, sept membres de cette famille ont été clonés et caractérisés (P2X₁ à P2X₇) (North, 2002).

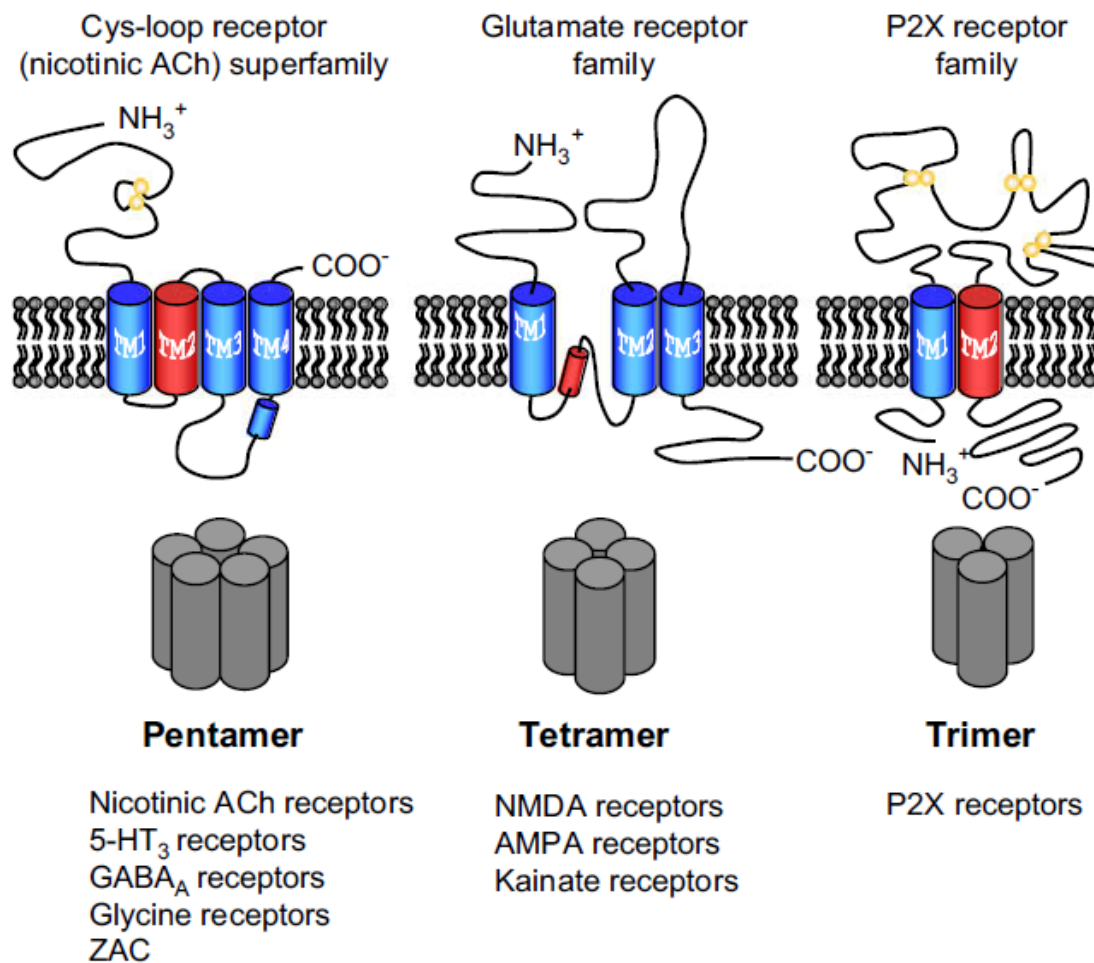


Figure 12 : Représentation schématique des trois catégories structurales des canaux ioniques dépendants des ligands.

La superfamille des récepteurs pentamériques *Cys-loop*, qui comprend les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (ACh), les récepteurs de la sérotonine 5-HT₃, les récepteurs GABA_A, les récepteurs de la glycine et les récepteurs activés par le zinc (ZAC), les deux extrémités sont extracellulaires. Les récepteurs tétramériques au glutamate comprennent les récepteurs NMDA, les récepteurs AMPA et les récepteurs kainate, l'extrémité N-terminale est extracellulaire, la C-terminale est intracellulaire. Les récepteurs-canaux P2X qui sont trimériques, les deux extrémités sont intracellulaires. Les résidus cystéine qui participent à la formation de ponts disulfure sont indiqués par les cercles jaunes. Les cylindres rouges indiquent les régions en hélice qui participent à la conduction/sélectivité ionique (Collingridge et al., 2009).

a) Structure

Tous les membres des canaux ioniques dépendants de ligands extracellulaires sont composés d'au moins deux domaines fonctionnels: un domaine extracellulaire où vient se fixer l'agoniste physiologique et un domaine transmembranaire qui forme le canal ionique. Parmi tous ces membres les récepteurs P2X sont les plus simples structuellement (**Figure 13**). Le clonage des récepteurs P2X a permis de révéler que les protéines qui forment ces récepteurs possèdent deux régions transmembranaires hydrophobes (TM1 et TM2), séparées par une longue boucle extracellulaire (environ 280 acides aminés) et des extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques. Le premier domaine transmembranaire semble être impliqué dans

l'activation du canal (Burnstock, 2007a) tandis que des expériences de mutagenèse dirigée suggère que le deuxième domaine transmembranaire peut former le pore (Jiang et al., 2001; Rassendren et al., 1997a). La boucle extracellulaire contient 10 résidus cystéine conservés formant des ponts disulfures, deux à six sites potentiels de N-glycosylation, un processus important pour l'adressage adéquat des récepteurs P2X au niveau de la membrane plasmique et ainsi le bon fonctionnement de ces récepteurs (North, 2002). La boucle extracellulaire contient également, une région hydrophobe pouvant jouer un rôle dans la régulation du récepteur/canal par le magnésium, le calcium, le zinc, le cuivre, et les protons et un site de liaison pour l'ATP (Ennion et Evans, 2002 ; North, 2002). Les extrémités N- et C- terminales sont de longueur variable. Les extrémités N-terminales de toutes les sous-unités sont assez courtes (environ 20-30 acides aminés). Fait intéressant, toutes les sous unités P2X contiennent un site consensus de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC; Thr-X-Lys/Arg) sur l'extrémité N-terminale qui semble jouer un rôle dans les cinétiques des courants engendrés par les récepteurs P2X (Burnstock and Kennedy, 2011).

Les récepteurs P2X possèdent une homologie de 30–50% entre eux (Burnstock, 2007a). Les protéines des récepteurs P2X ont une longueur qui varie entre 379 acides aminés, pour le récepteur P2X₆, à 595 acides aminés, pour le récepteur P2X₇, dû notamment à son extrémité C-terminale très longue (242 acides aminés pour le récepteur P2X₇ et 28 acides aminés pour le récepteur P2X₆) (Burnstock and Kennedy, 2011; Coddou et al., 2011). Cette extrémité C-terminale présente le plus de différences dans la séquence d'acides aminés entre les différents récepteurs P2X. La modulation de la longueur ou de la composition de cette extrémité modulent la cinétique des courants engendrés par les récepteurs P2X, ainsi que leurs propriétés de perméation, de désensibilisation (Khakh, 2001) ou de facilitation (Roger et al., 2008, 2010a). Ce modèle structural proposé a été récemment confirmé dans une étude récente de la structure cristalline tridimensionnelle du récepteur P2X₄ de poisson zèbre (Gonzales et al., 2009; Kawate et al., 2009).

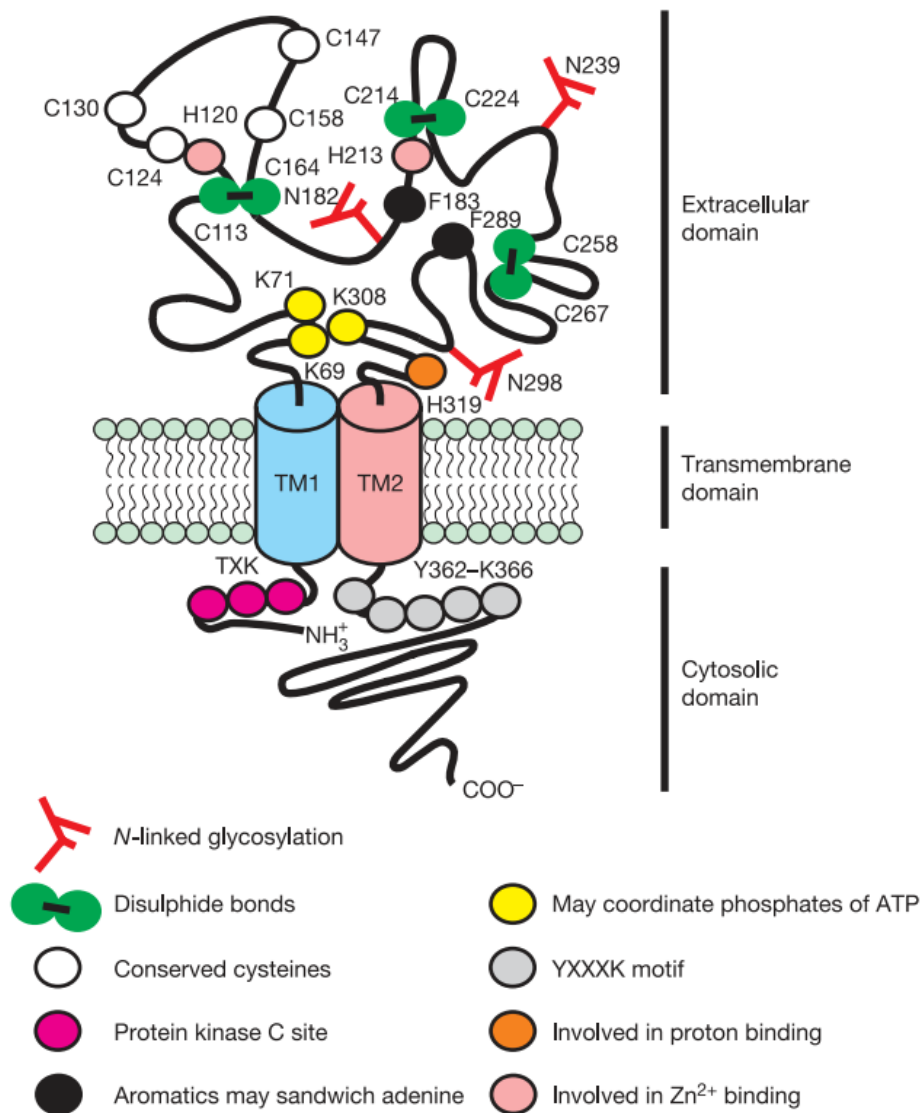


Figure 13 : Topologie et principales caractéristiques des sous-unités des récepteurs P2X.

Le canal possède deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2) séparés par une boucle extracellulaire. Cette dernière contient 10 résidus cystéine conservés formant des ponts disulfures. Il existe deux à six sites potentiels de N-glycosylation. Les résidus lysines (K) conservés chargés positivement 69,71 et 308 peuvent être impliqués dans la régulation de la fixation des groupements phosphates de l'ATP chargés négativement. Les résidus phénylalanines (F) 183 et 289 peuvent coordonner la liaison de l'anneau adénine. Les extrémités N- et C-terminales sont intracellulaires. L'extrémité N-terminale contient un site consensus de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC; Thr-X-Lys/Arg). L'extrémité C-terminale contient un motif de "trafficking". Ce point de vue théorique est basé principalement sur des expériences avec les récepteurs P2X₁ et P2X₂. Les chiffres indiqués sont pour les récepteurs P2X₂ de rat. D'après Baljit S. Khakh & R. Alan North, 2006 (Khakh and North, 2006).

b) Multimérisation

Comme la structure de base d'un monomère des récepteurs P2X possède seulement deux domaines transmembranaires, une seule sous unité ne peut constituer un récepteur fonctionnel. Le récepteur fonctionnel est en effet multimérique et est vraisemblablement constitué de trois sous-unités qui s'associent pour former des homo- ou hétérotrimères.

D'après des expériences en système d'expression, la plupart des récepteurs P2X recombinants impliquant trois sous-unités identiques sont fonctionnels. Le récepteur P2X₆ est le seul qui ne forme pas d'homotrimères fonctionnels (Torres et al., 1999). Son expression à l'état homomérique est améliorée suite à une N-glycosylation excessive qui tend à augmenter la quantité des sous-unités transportées du réticulum endoplasmique jusqu'à la membrane plasmique (Jones et al., 2004). L'existence sous la forme d'homotrimère, des récepteurs P2X₆ *in vivo* a été même remise en question (Khakh, 2001).

Les différentes sous unités peuvent interagir les unes avec les autres aboutissant ainsi à la formation des hétérotrimères. À ce jour, sept paires de sous unités recombinantes ont été décrites pour former des hétérotrimères fonctionnels des récepteurs P2X avec des propriétés pharmacologiques et biophysiques qui diffèrent de celles de homotrimères: P2X_{2/3} (Lewis et al., 1995), P2X_{4/6} (Lê et al., 1998), P2X_{1/5} (Haines et al., 1999), P2X_{2/6} (King et al., 2000), P2X_{1/4} (Nicke et al., 2005), P2X_{1/2} (Brown et al., 2002) et P2X_{2/5} (Compan et al., 2012). À l'inverse de la sous unité P2X₆, la sous-unité P2X₇ a pendant longtemps été considérée comme étant la seule sous-unité ne formant pas d'hétérotrimères fonctionnels (North, 2002; Torres et al., 1999). En 2007, Guo et ses collaborateurs ont suggéré la formation d'hétéromères fonctionnels entre les récepteurs P2X₄ et P2X₇ et ceci dans un système d'expression hétérologues et dans les macrophages de souris (Guo et al., 2007), mais, des études ultérieures ont conclu que ces récepteurs s'assemblent de manière prédominante sous forme d'homotrimères (Boumechache et al., 2009; Nicke, 2008). L'hétéromultimérisation des récepteurs P2X₂ et P2X₃ (P2X_{2/3}) est clairement établie dans les cellules de ganglion noueux, le récepteur P2X_{4/6} dans les neurones du système nerveux central, tandis que le récepteurs P2X_{1/5} semblent être exprimés dans certains vaisseaux sanguins et les récepteurs P2X_{2/6} dans le tronc cérébral (Fields and Burnstock, 2006).

c) Pharmacologie

L'ATP extracellulaire est le seul agoniste physiologique des récepteurs P2X. Cependant les récepteurs P2X sont dépourvus des séquences consensus communes de liaison de l'ATP, telles que le motif Walker ou les transporteurs ABC, que l'on trouve dans d'autres protéines sensibles à l'ATP. Ceci indique qu'un nouveau site de liaison de l'ATP est présent dans les récepteurs P2X (Roberts et al., 2006). Les premières mesures électrophysiologiques réalisées dans les neurones du ganglion de la racine dorsale (neurones DRG) chez le rat, semblaient indiquer que la fixation de trois molécules d'ATP était nécessaire pour activer un canal P2X (Bean, 1990). Des analyses ultérieures réalisées en canal unitaire sur des récepteurs

P2X₂ ont confirmé cette idée (Ding and Sachs, 1999). Toutefois, une étude récente semble indiquer que deux molécules d'ATP suffisent pour l'activation du récepteur (Stelmashenko et al., 2012). Avant l'étude récente de la cristallographie du récepteurs P2X₄ du poisson zèbre, des approches de mutagenèse ont été menées sur les récepteurs P2X₁, P2X₂, P2X₃ et P2X₄ afin de localiser le site de liaison de l'agoniste. Ces études ont abouti à l'identification des résidus d'acides aminés chargés positivement impliqués dans la liaison des groupements phosphates de l'ATP (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). En particulier, les résidus Lysine chargés positivement présents dans la position 68, 70, 309 sont proposés pour interagir avec les groupements phosphates chargés négativement de l'ATP, tandis que l'anneau adénine semblerait être pris en sandwich entre deux régions de résidus aromatiques conservés aux positions Phe₁₈₅/Thr₁₈₆ et Asn₂₉₀/Phe₂₉₂ (Kaczmarek-Hájek et al., 2012).

Tableau 3 : Propriétés fonctionnelles et pharmacologiques des récepteurs P2X.

	Constante de temps de désensibilisation	Agonistes	Antagonistes	Perméabilité relative P_{Ca}/P_{Na}
P2X ₁	Rapide	BzATP > ATP = 2-MeSATP ≥ α,β -meATP = L- β,γ -meATP PAPET-ATP	NF449 > IP ₅ I > TNP-ATP > RO0437626 > NF279, NF023, RO1, MRS2159	$P_{Ca}/P_{Na}=4.8$
P2X ₂	Très lente	ATP ≥ ATP _{γ} S ≥ 2-MeSATP >> α,β -meATP; β,γ -CF ₂ ATP (sensible au pH et au zinc)	PSB-10211 > RB2, isoPPADS > PPADS > Suramin, NF770, NF778, aminoglycoside	$P_{Ca}/P_{Na}=2.8$
P2X ₃	rapide	2-MeSATP ≥ ATP ≥ Ap ₄ A ≥ α,β -meATP; PAPET-ATP; BzATP	TNP-ATP, isoPPADS > A317491 > NF110 > PPADS, Ip ₅ I, phenol red, RO4, RN-1838, Spinorphin, AF353	$P_{Ca}/P_{Na}=1.2$
P2X ₄	lente	ATP >> α,β -meATP >> CTP, 2-MeSATP; Potentialisation par l'ivermectine (modulateur)	5-BDBD >> TNP-ATP, PPADS > BBG, Paroxetine, phenolphthalein, CO donor (CROM2)	$P_{Ca}/P_{Na}=4.2$
P2X ₅	Très lente	ATP = 2-MeSATP=ATP _{γ} S >> α,β -meATP > AP ₄ A	BBG > PPADS, Suramin	$P_{Ca}/P_{Na}=1.5$
P2X ₆	—	Seulement fonctionnels en hétérotrimères	—	
P2X ₇	Pas de désensibilisation (phénomène de facilitation *)	BzATP > ATP ≥ 2-MeSATP >> α,β -meATP	KN62, BBG, KN04, MRS2427, O-ATP, RN-6189, AZ10606120, A740003, A-438079, A-804598, GSK-1370319, Compound 31(GSK), AZD-9056, CE-224535, Emodine**	—

D'après (Burnstock, 2012; Jarvis and Khakh, 2009), * (Roger et al., 2008, 2010a), ** (Liu et al., 2010).

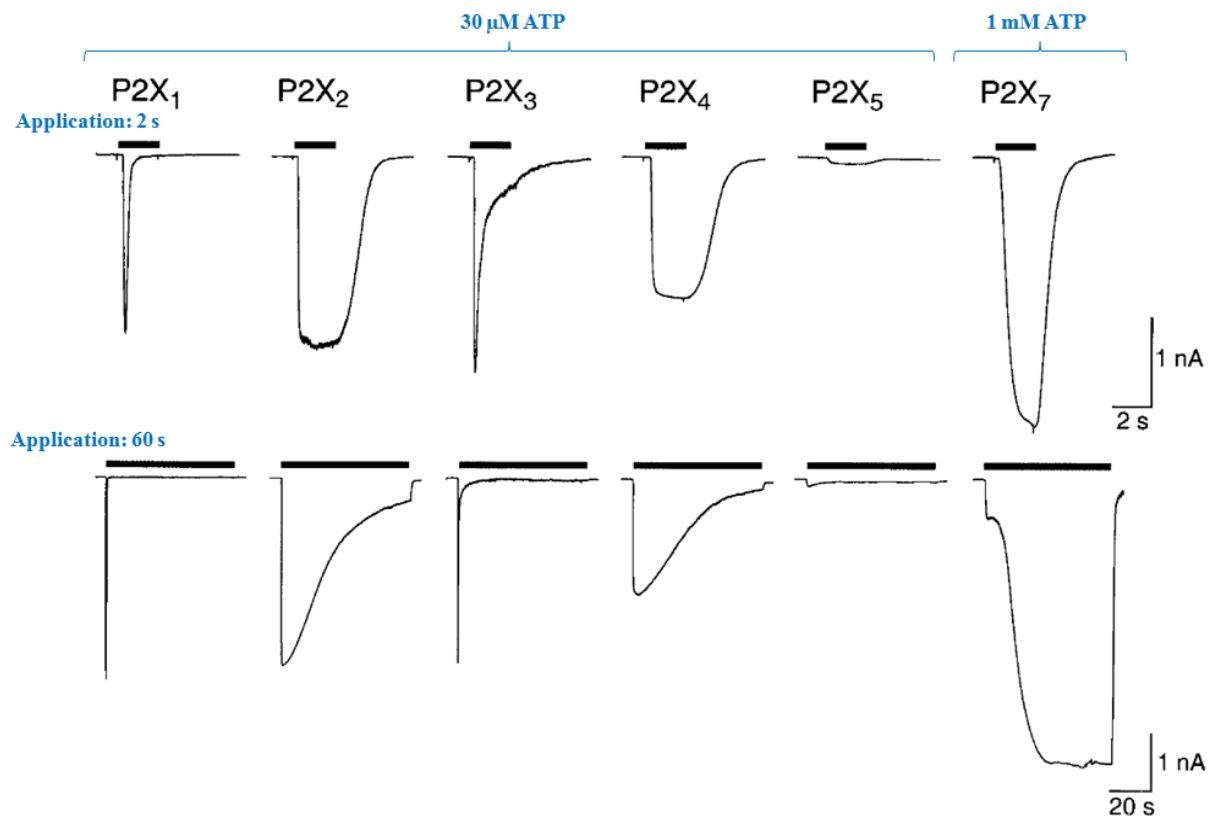


Figure 14 : Propriétés de désensibilisation des différents récepteurs P2X homomériques de rat exprimés dans les cellules HEK293.

Une application brève d'ATP (2 secondes) à la concentration indiquée dans la figure, est responsable de la désensibilisation rapide des récepteurs P2X₁ et P2X₃. Une application prolongée d'ATP (60 secondes) entraîne une désensibilisation plus lente des récepteurs P2X₂, P2X₄ et P2X₅. Seuls les récepteurs P2X₇ ne montre pas de désensibilisation mais plutôt une facilitation du courant. Figure modifiée d'après North, 2002 (North, 2002).

Tous les récepteurs P2X sont des canaux cationiques non sélectifs démontrant une perméabilité pour le sodium, le potassium et le calcium. Leur activité tend à dépolariser le potentiel de membrane.

d) Distribution

Les récepteurs P2X sont largement, mais spécifiquement distribués, entre les différents tissus de l'organisme chez les mammifères.

Le récepteur P2X₁ est fortement exprimé dans les cellules musculaires lisses de divers organes, y compris dans la vessie, le canal déférent, et les artères. Ces récepteurs interviennent dans la contraction de ces muscles lisses. Ils se trouvent également, à des niveaux très importants, dans les mégacaryocytes et les plaquettes sanguines (Kaczmarek-Hájek et al., 2012; Khakh and North, 2006). L'activation des récepteurs P2X₁ potentialisent l'activation des plaquettes. Les mastocytes pulmonaires humains semblent exprimer des

récepteurs P2X₁ fonctionnels. Les récepteurs P2X₁ interviennent également dans l'autorégulation des reins (Kaczmarek-Hájek et al., 2012).

Le récepteur P2X₂ est l'un des récepteurs les plus répandus parmi toute la famille des récepteurs P2X. Il est très exprimé dans le système nerveux central et périphérique. En outre, le récepteur P2X₂ semble être exprimé dans de multiples tissus non-neuronaux, comme la glande médullosurrénale (dans les cellules chromaffines), l'urothélium, le muscle vasculaire lisse, le muscle squelettique (au cours du développement et de la régénération), le muscle cardiaque et les cellules interstitielles des canaux déférents (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). Le récepteur P2X₂ semble être impliqué dans la nociception (Kim et al., 2003).

Le récepteur P2X₃ (chez l'homme) est localisé de façon prédominante au niveau des neurones sensitifs. Il est exprimé dans la moelle épinière, les ganglions de la racine dorsale, l'intestin (neurones du plexus myentérique), le cœur, la vessie (urothélium et suburothélium), et dans la pulpe dentaire (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). Il est impliqué dans la signalisation nociceptive (Burnstock and Kennedy, 2011).

Le récepteur P2X₄ est largement distribué. Une expression abondante de ce récepteur a été démontrée dans plusieurs régions des systèmes nerveux central et périphérique, ainsi que tous les organes vitaux et reproductifs, le muscle squelettique et lisse, les cellules épithéliales et endothéliales, mais aussi dans d'autres tissus. De nombreuses études ont montré l'implication du récepteur P2X₄ dans l'inflammation chronique et dans la douleur neuropathique (Guo et al., 2005; Inoue et al., 2004; Schwab et al., 2005; Ulmann et al., 2008). La sous-unité P2X₄ est composée de 388 acides aminés. Parmi toutes les sous-unités de récepteurs P2X, c'est celle qui a la séquence en acides aminés la plus proche de la sous-unité P2X₇ (environ 49 % d'identité) (North, 2002). Les récepteurs P2X₄ sont localisés de manière prédominante au niveau intracellulaire car ils sont internalisés par endocytose via des vésicules recouvertes de clathrine et sont principalement localisés dans les lysosomes (Bobanovic et al., 2002; Stokes and Surprenant, 2009).

Le récepteur P2X₅ semble être prédominant dans le système nerveux central ainsi que le système immunitaire chez l'homme. Il semblerait que ce récepteur joue un rôle dans le développement ou la régénération du muscle squelettique (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). Le récepteur se trouve également à des niveaux relativement élevés dans différents tissus cancéreux (carcinomes basocellulaires et spinocellulaires ainsi que les cancers de la prostate) ce qui indique que l'activation du récepteur P2X₅ pourrait également réguler la croissance et la différenciation des cellules cancéreuses (Burnstock and Di Virgilio, 2013).

Le récepteur P2X₆ est exprimé de façon prépondérante dans le muscle squelettique. La fonction physiologique (*in vivo*) du récepteur P2X₆ reste mal comprise. Cependant des études ont suggéré l'implication des récepteurs P2X₆ dans la régénération des muscles dystrophiques. D'autres auteurs ont proposé un rôle de P2X₆ dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Kaczmarek-Hájek et al., 2012).

Le récepteur P2X₇ présente des particularités structurales, pharmacologiques et biophysiques qui diffèrent des autres récepteurs P2X et le monde scientifique est chaque jour confronté à des surprenantes (sans jeu de mot !) découvertes concernant ce récepteur. La partie qui va suivre est consacrée entièrement à ce récepteur "à multiples facettes".

IV. Récepteur P2X₇

Le récepteur P2X₇, initialement désigné par ‘P2Z’, avait été décrit à la surface des mastocytes en 1980 (Cockcroft and Gomperts, 1980). Il fut ensuite caractérisé à la surface d'autres cellules d'origine hématopoïétique telles que les macrophages ou les lymphocytes et cloné d'abord chez le rat (Surprenant et al., 1996), puis chez l'homme (Rassendren et al., 1997b). Il fut alors identifié comme étant le 7^{ème} membre de la famille P2X, P2X₇.

A. Gène

Le gène humain codant pour le récepteur P2X₇ (*P2RX7*) comprend 13 exons. Il est localisé au niveau du chromosome 12 (12q24.31), le chromosome sur lequel est également situé le gène codant pour le récepteur P2X₄. Plusieurs isoformes du récepteurs P2X₇ humain ont été identifiés à ce jour (P2X₇B-J), P2X₇A étant le récepteur complet composé de 595 acides aminés. Plus de 650 polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) ont été rapporté dans le gène P2X₇ humain (Sluyter and Stokes, 2011). Certains d'entre eux semblent causer une perte ou un gain de fonction. Plusieurs de ces variants génétiques du récepteurs P2X₇ ont été associés à diverses maladies, notamment la leucémie lymphocytaire chronique, le diabète et les troubles de l'humeur (Kaczmarek-Hájek et al., 2012). La régulation de l'expression des récepteurs P2X₇ peut se faire à plusieurs niveaux : (1) régulation transcriptionnelle par des éléments cis-régulateurs (*cis-regulatory enhancer element*) ou par hyperméthylation, (2) régulation post-transcriptionnelle par des micro-ARN (miR) tels que miR-150 et miR-186. La glycosylation des récepteurs P2X₇ est importante pour leur acheminement et leur adressage à la membrane (Gorodeski, 2009).

B. Structure

Le récepteur P2X₇ répond à la même structure que précédemment décrite (voir chapitre structure des récepteurs P2X page 54). Toutefois, il se distingue structurellement des autres membres des récepteurs P2X par sa longue extrémité C-terminale intracellulaire (239 acides aminés) contenant plusieurs sites d'interactions protéines-protéines. Parmi ces sites d'interactions, un site potentiel pour la liaison des lipopolysaccharides (LPS), un site potentiel pour la liaison avec la β -arrestine, un domaine SH3 et un site de liaison à la calmoduline (Costa-Junior et al., 2011; Roger et al., 2008). Kim et ses collaborateurs (2001) ont montré

que les récepteurs P2X₇ peuvent former un complexe de signalisation avec de multiples autres protéines. Les protéines interagissant avec les récepteurs P2X₇ sont les protéines de structure (la laminine α -3, l'intégrine β -2, l' α -actinine 4, la β -actine, la supervilline, les 3 protéines de choc thermique Hsp 90, Hsp 70 et Hsc 71 et la protéine MAGuK), et les protéines de signalisation (la phosphatase RPTP β et la phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K)) (Kim et al., 2001). L'extrémité C-terminale intervient dans la régulation de la translocation du récepteur P2X₇ vers la membrane plasmique (Denlinger et al., 2003; Smart et al., 2003) et dans la modulation du fonctionnement du canal (Becker et al., 2008). Cette extrémité est impliquée également dans le phénomène de facilitation par lequel les courants entrants ainsi que la sensibilité à l'agoniste augmentent avec des applications répétées d'agoniste (Roger et al., 2008, 2010a).

C. Pharmacologie

1. Les agonistes du récepteur P2X₇

Le récepteur P2X₇ possède une affinité plus faible pour l'ATP que les autres récepteurs P2X. Le BzATP est l'agoniste le plus puissant (avec une EC₅₀= 50 μ M par rapport à une EC₅₀= 3 à 4 mM pour l'ATP). Cependant il n'est pas spécifique du récepteur P2X₇, mais active aussi d'autres récepteurs P2X. Lorsque le récepteur P2X₇ est facilité, les valeurs d'EC₅₀ pour le BzATP et l'ATP sont de 25 μ M et 2 mM respectivement (Roger et al., 2008, 2010a; Surprenant et al., 1996). 2-meSATP et ATP γ S sont des agonistes partiels tandis que $\alpha\beta$ -meATP et $\beta\gamma$ -meATP ont très peu d'effet sur l'activation du récepteur P2X₇. Une caractéristique importante du récepteur P2X₇ est son activation par ADP-ribosylation, une réaction qui nécessite l'enzyme ADP-ribosyltransférase et le NAD comme substrat. Il a été reporté que les cellules T régulatrices expriment à la fois les récepteurs P2X₇ et l'enzyme ADP-ribosyltransférase. L'activation des récepteurs P2X₇ par ADP-ribosylation dans ces cellules a été également observée dans les cellules HEK293 qui sont co-transfectées avec les deux protéines (Schwarz et al., 2009). Il a été également montré que le transfert, via l'ADP-ribosyltransférase ART2.2, du groupement ADP-ribose sur le résidu Arg 125 du récepteur P2X₇ entraîne l'activation de celui-ci (Adriouch et al., 2008; Seman et al., 2003).

2. Les antagonistes du récepteur P2X₇

La suramine est un bloqueur des récepteurs P2Y et P2X et ne semble pas avoir un effet sur les récepteur P2X₇ de toutes les espèces (Bianchi et al., 1999; Surprenant et al., 1996),

tandis que PPADS (*Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid*), un autre antagoniste non sélectif des récepteurs P2X, est en effet un inhibiteur des récepteurs P2X₇ avec des IC₅₀ variables allant de 1 à 60 µM (Chessell et al., 1998; Coddou et al., 2011). Le NF279, un analogue de la suramine, inhibe le récepteur P2X₇ humain avec une IC₅₀ de 3 µM, mais des concentrations supérieures à 100 µM sont nécessaires pour inhiber le récepteur P2X₇ du rat (Donnelly-Roberts et al., 2009). MRS2159, un puissant inhibiteur du récepteur P2X₁ de rat, inhibe également le récepteur P2X₇ de la souris, du rat et de l'humain (Donnelly-Roberts et al., 2009). L'ATP oxydé est un antagoniste irréversible qui nécessite d'être pré-incubé à des concentrations de 100 à 300 µM pour être efficace (Hibell et al., 2001; Surprenant et al., 1996). Le Brilliant Blue G (BBG) inhibe également le récepteur P2X₇ de rat et humain avec des valeurs d'IC₅₀ d'environ 15 et 250 nM, respectivement (Jiang et al., 2000).

Plusieurs inhibiteurs des protéines kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes, y compris le calmidazolium et le KN-62, inhibent également le courant induit par l'activation du récepteur P2X₇ humain par le BzATP. Le KN-62 est l'un des inhibiteurs les plus puissants pour les récepteurs P2X₇ de la souris et homme, mais étonnamment inactif chez le rat. Le KN-04, un dérivé de KN62, qui est inactif envers la CaMKII, mais inhibe le courant induit par le récepteur P2X₇ (Humphreys et al., 1998). Ceci indique que l'inhibition se fait par un mécanisme indépendant de la CaMKII.

En 2006, le groupe de Jarvis dans les laboratoires Abbott (Chicago, États-Unis) a développé des antagonistes spécifiques du récepteurs P2X₇: Ces deux inhibiteurs sont à la fois réversibles et compétitifs, ce qui les démarque des autres antagonistes du récepteur P2X₇. L'A-438079, qui bloque sélectivement l'influx calcique induit par le BzATP avec une IC₅₀ de 100 nM et 300 nM pour le récepteur P2X₇ de rat et humain respectivement et ne semble pas actif sur les autres récepteurs P2X (Donnelly-Roberts et al., 2009; Nelson et al., 2006). L'A-740003 est un antagoniste sélectif et puissant du récepteur P2X₇ humain et de rat avec des valeurs de IC₅₀ de 18 et 40 nM pour le récepteur P2X₇ du rat et humain (Honore et al., 2006). L'A-438079 et l'A-740003 ont été utilisés avec succès dans des expériences *in vivo* par administration intrapéritonéale dans le but d'étudier certains modèles de maladies associées aux récepteurs P2X₇ (Honore et al., 2006; Nelson et al., 2006). L'AZ10606120, L'AZ11645373 et l'A-804598 sont d'autres antagonistes du récepteur P2X₇ étudiés récemment (Coddou et al., 2011; Jarvis and Khakh, 2009).

Les réponses à l'ATP sont potentialisées dans un milieu contenant une faible concentration en ions bivalents, comme le Ca²⁺, le Mg²⁺, le Zn²⁺ ou le Cu²⁺ (Surprenant et al., 1996).

D. Perméabilisation membranaire

Lors d'une stimulation transitoire, le récepteur P2X₇ se comporte comme un canal sélectif aux cations perméable au Na⁺, K⁺, et Ca²⁺. Toutefois des stimulations soutenues de ce récepteur mènent à une transition qui conduit à la formation d'un large pore membranaire non sélectif perméable à des molécules cationiques d'un poids moléculaire allant jusqu'à 900 Da (Steinberg et al., 1987; Surprenant et al., 1996; Wiley et al., 1992). Ce processus connu sous le nom de 'Perméabilisation cellulaire' est parmi les caractéristiques les plus étudiées du récepteur P2X₇. Ce phénomène reste cependant encore mal connu de nos jours. La formation du pore peut être démontrée expérimentalement par l'accumulation intracellulaire d'agents intercalants de l'ADN cationiques et fluorescents, comme le YO-PRO1 (Poids Moléculaire (PM) : 375 Da), le bromure d'éthidium (PM : 314 Da), ou alternativement par l'augmentation progressive de la perméabilité à des cations organiques chargés positivement, comme le NMDG (N-méthyl-D-glucamine) (PM : 195 Da).

Ce phénomène ne semble pas unique au récepteur P2X₇, mais se produit également avec les récepteurs P2X₂, P2X₄, P2X_{2/3} et P2X_{2/5}, bien que moins fréquemment ou systématiquement dans certains cas (Jiang, 2012). Deux principaux mécanismes ont été proposés pour expliquer l'augmentation, de façon dépendante du temps, de la perméabilité membranaire suite à l'activation du récepteur P2X₇ : (1) Il a été suggéré qu'une dilatation progressive de la voie de conduction ionique du récepteur P2X₇ se produit pendant l'application prolongée de l'agoniste entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité (Gudipaty et al., 2001; Surprenant et al., 1996). (2) La formation du pore induite par le récepteur P2X₇ pourrait aussi faire intervenir d'autres protéines pores perméables à des molécules plus larges, telles que des connexines ou pannexines. Il a été montré que la protéine transmembranaire pannexine-1 intervient dans la formation du pore (un hémicanal) et permet ainsi l'entrée de molécules fluorescentes dans la cellule via son couplage avec le récepteur P2X₇ (Pelegrin and Surprenant, 2006).

E. Distribution

L'expression du récepteur P2X₇ a été initialement décrite dans des cellules d'origine hématopoïétiques, mais il est maintenant évident que le récepteur P2X₇ est également présent dans d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales, mésenchymateuses et neuronales (Burnstock and Knight, 2004). En ce qui concerne les lignées hématopoïétiques, le récepteur P2X₇ est présent dans les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les

lymphocytes NK, les lymphocytes B, les lymphocytes T les érythrocytes et les éosinophiles. De nombreuses études ont montré que le récepteur P2X₇ était aussi exprimé dans les mastocytes humains, les cellules microgliales, les ostéoclastes et les ostéoblastes. P2X₇ est également présent sur d'autres types cellulaires, y compris les fibroblastes, les cellules endothéliales, et les cellules épithéliales dans différents tissus, notamment de la peau, du col utérin, du pancréas et du côlon (Gorodeski, 2009). En outre, P2X₇ est présent sur différents types de cellules macrogliales (comme les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules de Schwann).

Plusieurs fonctions cellulaires et voies de signalisation dépendantes du récepteur P2X₇ ont été mises en évidence par le biais d'études *in vivo* sur des modèles animaux. Parmi les fonctions et les voies de signalisation les mieux décrites figurent :

- La stimulation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires tels que l'interleukine (IL)-1 β et IL-18 suite à l'activation de l'inflammasome NALP3 et Caspase-1 dans les cellules myéloïdes humaines (les macrophages) (Di Virgilio, 2007).
- Le contrôle de la prolifération / ou la mort cellulaire (Di Virgilio et al., 2009).
- La fusion des phagosomes avec les lysosomes permettant l'élimination des pathogènes intracellulaires dans les macrophages humains (mycobactéries intracellulaire, Chlamydia et le Toxoplasme) (Coutinho-Silva et al., 2009).
- L'exposition (*Shedding*) de CD21 (*complement receptor type 2*), CD62L (L-sélectine: molécule d'adhésion cellulaire retrouvé dans les lymphocytes) (Sengstake et al., 2006), CD23 (*the low affinity IgE receptor*) (Farrell et al., 2010).
- La libération de la MMP-9 (appelée également gélatinase B) et des cathepsines par des cellules lymphoïdes et myéloïdes (Lopez-Castejon et al., 2010; Sluyter and Stokes, 2011).

Par ailleurs, le récepteur P2X₇ est impliqué dans d'autres événements cellulaires tels que l'exposition rapide et réversible des phosphatidylsérine sur le feuillet externe de la membrane plasmique, "le blebbing" ou bourgeonnement membranaire, la libération de microparticules et d'exosomes, la formation de cellules multinucléées, ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives d'azote (Sluyter and Stokes, 2011).

V. Le récepteur P2X₇ dans les cancers

Le récepteur P2X₇ est majoritairement considéré, par la plupart des chercheurs, comme étant un récepteur cytotoxique activé par l'ATP extracellulaire. La cytotoxicité induite par l'activation du récepteur P2X₇ peut se traduire par une nécrose ou une apoptose cellulaire, en fonction des conditions expérimentales et du type cellulaire impliqué. Par ailleurs, l'effet cytotoxique de l'ATP s'il se produit dans plusieurs lignées et types cellulaires, n'est pas systématique et ne se manifeste pas dans d'autres types cellulaires. En outre, la cytotoxicité quand elle est observée, est souvent le résultat d'une stimulation avec des fortes concentrations d'ATP, soutenue dans le temps (> 30 min). Ceci est susceptible de se produire *in vivo*, dans des conditions de stress cellulaire ou de dommage tissulaire, comme cela peut être le cas lors d'infections mais aussi dans des conditions physiopathologiques graves telles que le cancer. Dans ce cas, l'ATP extracellulaire se trouve à de très fortes concentrations dans le microenvironnement tumoral en comparaison avec les tissus non tumoraux (Michaud et al., 2011; Pellegatti et al., 2008). Le nombre d'études s'intéressant à l'expression et la fonctionnalité des récepteurs P2X₇ dans plusieurs types de cancer et leur implication physiopathologique n'a cessé de croître sur ces dernières années. Différentes équipes ont signalé une augmentation de l'expression (ARN messager et protéine) de ce récepteur dans plusieurs tumeurs et cellules cancéreuses (Künzli et al., 2007; Slater et al., 2003, 2004a, 2004b, 2005; Solini et al., 2008). Dans la plupart des cas, ces études ne font pas d'analyse de l'activité fonctionnelle du récepteur (Künzli et al., 2007; Slater et al., 2003, 2004a, 2004b, 2005). Dans d'autres études, une des fonctionnalités du récepteur P2X₇ a été étudiée (souvent la perméabilisation membranaire) dans des lignées cellulaires établies à partir des tumeurs primaires (Greig et al., 2003; White et al., 2005). Un bilan très intéressant et plus détaillé découlant de ces études est présenté ci-après en fonction de chaque type de cancer.

A. Cancer du sein

Dans le cadre d'une étude réalisée sur le cancer du sein, 40 échantillons de différentes catégories histologiques ont été analysés par immunohistochimie (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine et en utilisant un anticorps dirigé contre le récepteur P2X₇). Les auteurs ont montré que les protéines P2X₇ n'étaient pas détectées dans l'épithélium normal et ni même dans les hyperplasies. En revanche toutes les cellules épithéliales cancéreuses issues des

carcinomes lobulaires ou canaux *in situ* ou invasifs étaient intensément marquées. Les carcinomes lobulaires et canaux *in situ* avaient un marquage intracellulaire des récepteurs P2X₇ tandis que les cellules épithéliales cancéreuses invasives ont montré une intensité de marquage au niveau de la surface cellulaire. Toutefois les auteurs suggèrent que les récepteurs P2X₇ pourraient être non fonctionnels et seraient par conséquent incapables d'induire l'apoptose (Slater et al., 2004b). Dans cette étude, aucune technique (le patch clamp, la fluorimétrie calcique, l'incorporation d'éthidium) n'a été employée par les auteurs dans le but de vérifier la fonctionnalité des récepteurs P2X₇.

B. Cancer de la prostate

La même équipe que précédemment citée, dans une étude réalisée sur le cancer de la prostate, a constaté qu'il existait une différence d'expression des récepteurs P2X₇ entre des biopsies non cancéreuses par rapport à des biopsies cancéreuses (par immunohistochimie) (Slater et al., 2004a). Slater et ses collaborateurs ont montré que dans une cohorte de 116 spécimens présentant le cancer de la prostate, les récepteurs P2X₇ étaient exprimés indépendamment du score de Gleason (Étude microscopique des cellules cancéreuses permettant de préciser l'agressivité du cancer. Ce score varie de 2 à 10 : 2 correspondant à une tumeur faiblement agressive, 10 à une agressivité élevée) ou de l'âge du patient. Les auteurs suggèrent que les récepteurs P2X₇ étaient non fonctionnels dans cette cohorte de 116 spécimens. Ils ont remarqué que les récepteurs P2X₇ étaient aussi exprimés dans les cellules épithéliales non cancéreuses adjacentes aux marges de la tumeur, mais pas dans les tissus normaux chez des patients ne présentant aucun signe de cancer. Ceci soulevait la possibilité de l'apparition précoce de ces récepteurs au cours du processus de cancérisation et de leur utilisation comme un marqueur précoce du cancer de la prostate (Slater et al., 2004a). Dans une autre étude, ils ont montré que l'expression du récepteur P2X₇ dans l'épithélium glandulaire était un marqueur précoce du cancer de la prostate et était en corrélation avec les niveaux croissants de l'antigène prostatique spécifique (PSA) (Slater et al., 2005).

C. Cancer du pancréas

Dans une étude sur les pathologies du pancréas, des tissus issus de pancréas normaux, de patients souffrants de pancréatite chronique et de patients ayant le cancer du pancréas, ont été analysés (Künzli et al., 2007). Les résultats de RT-PCR indiquaient que les ARNm des récepteurs P2X₇ étaient exprimés à des niveaux faibles dans les biopsies normales, mais leur expression était augmentée de manière significative dans les biopsies de pancréatite

chronique. Dans les biopsies cancéreuses, les ARNm des récepteurs P2X₇ n'étaient pas significativement surexprimés par rapport aux biopsies normales. Les transcrits des récepteurs P2X₇ étaient surexprimés dans les biopsies de pancréatite chronique par rapport à celles du cancer de pancréas. Les analyses par western blot ont montré que les niveaux d'expression protéique des récepteurs P2X₇ ont augmenté de 3 et de 2,2 fois respectivement pour les biopsies de pancréatite chronique et celles cancéreuses par rapport aux biopsies normale (cependant tous les résultats obtenus sont non significatifs). Les analyses par immunohistochimie montraient que les récepteurs P2X₇, dans les tissus normaux, étaient principalement exprimés dans les macrophages et dans d'autres cellules immunitaires mais pas dans les cellules du parenchyme. Les récepteurs P2X₇ étaient également exprimés au niveau des cellules immunitaires, dans les biopsies de pancréatite chronique, tandis qu'ils étaient presque indétectables dans les tissus cancéreux (sauf un marquage clair au niveau des immunocytes).

D. Cancer papillaire de la thyroïde

Dans une étude menée sur le cancer papillaire de la thyroïde, les auteurs ont reporté une augmentation d'expression d'ARNm (RT-qPCR) et de la protéine (immunohistochimie) des récepteurs P2X₇ (aussi bien les formes cancéreuses classiques que folliculaires), par rapport à des biopsies de thyroïdes normales. Les récepteurs P2X₇ étaient également surexprimés (ARNm par RT-PCR et protéine par western blot) dans deux lignées cellulaires du cancer de la thyroïde (FB1 et FB2) par rapport à des thyrocytes normaux. Les récepteurs P2X₇ étaient fonctionnels dans ces deux lignées cellulaires. En effet, la stimulation des cellules avec des doses croissantes d'ATP et de BzATP entraînait une augmentation du calcium intracellulaire et aussi une grande libération d'IL-6. Ces effets étaient abolis en présence des inhibiteurs des récepteurs P2X₇ oATP et du KN62 (Solini et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré qu'un polymorphisme du gène du récepteur P2X₇ "1513A>C" (la substitution E496A induisant une perte de fonction) présentait une forte association avec la variante folliculaire de ce même type de cancer (Dardano et al., 2009). Dans une autre étude, un total de 62 échantillons : 43 en provenance de patients atteints de cancer papillaire de la thyroïde et 19 provenant de patients ayant un goitre nodulaire bénin, étaient étudiés par immunohistochimie. Les auteurs ont montré que les expressions de la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP) et du récepteur P2X₇ étaient élevées dans les cancers papillaires thyroïdiens par rapport aux goitres nodulaires bénins. Ces données montrent également que les scores de marquage immunohistochimique pour XIAP et le

récepteur P2X₇ étaient significativement plus élevés chez les patients cancéreux avec métastases ganglionnaires, que chez les patients sans métastases. Les patients avec les métastases ganglionnaires présentaient par ailleurs, des tumeurs primaires avec un volume plus important. Les auteurs révèlent ainsi que l'expression de XIAP et du récepteur P2X₇ étaient associées à la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques et pourraient ainsi prédire l'agressivité du cancer papillaire de la thyroïde. Cependant le mécanisme sous-jacent à cette relation n'est pas clair. Les auteurs proposent ces deux protéines comme des potentiels nouveaux marqueurs pronostiques des carcinomes papillaires de la thyroïde (Gu et al., 2010).

E. Cancer de la peau

Le cancer de la peau recouvre deux catégories de tumeurs cutanées distinctes :

- Les non-mélanomes : carcinomes baso- ou spino-cellulaires. Le premier type se développe au départ des cellules basales de l'épiderme mais n'entraîne pas de lésions à distance (métastases). Le deuxième type se développe également au départ de l'épiderme et contrairement au premier type peut métastaser.
- Le mélanome est le cancer de la peau le plus dangereux. Il atteint les cellules pigmentées de l'épiderme (les mélanocytes).

1. Carcinomes basocellulaires et spinocellulaires

Une analyse immunohistochimique montre que les récepteurs P2X₇ sont exprimés dans le centre nécrotique des carcinomes basocellulaires nodulaires mais également dans les cellules apoptotiques dans les carcinomes basocellulaires et spinocellulaires infiltrants. Une étude sur une lignée humaine de cellules de carcinome spinocellulaire (A431) a été effectuée et montrent que le récepteur P2X₇ était exprimé (immuno-marquage). Les tests de prolifération cellulaire ont montré que la stimulation par le BzATP et par de fortes concentrations d'ATP (de l'ordre de millimolaire) induisait une diminution significative du nombre des cellules *in vitro*. Les auteurs de cette étude suggèrent que les récepteurs P2X₇ seraient fonctionnels et seraient par conséquent capables d'induire l'apoptose. Toutefois, aucune technique (le patch clamp, la fluorimétrie calcique, l'incorporation d'éthidium) n'a été employée par les auteurs dans le but de vérifier la fonctionnalité des récepteurs P2X₇ (Greig et al., 2003).

2. Mélanome

Une étude par analyse immunohistochimique sur 80 biopsies de mélanome superficiel extensif a montré que l'expression des récepteurs P2X₇ était augmentée par rapport à des échantillons non cancéreux (Slater et al., 2003). Le marquage des récepteurs P2X₇ semblait montrer également une augmentation de son expression sur une surface étendue à 2 mm autour du mélanome jusqu'à la couche de kératinocyte de l'épiderme adjacent. Ce marquage n'est plus observé au delà de cette distance, et le récepteur P2X₇ n'était pas exprimés dans l'épithélium normal. De façon intéressante, la protéine d'adhésion cellulaire E-cadhérine était exprimée au niveau de la membrane plasmique des kératinocytes de l'épithélium normal, mais n'était pas détectable dans les mélanocytes normaux ou dans les cellules de mélanome. Slater et collaborateurs ont proposé qu'il y avait une intense activité apoptotique dans le mélanome (Slater et al., 2003). Cependant des études fonctionnelles sur des lignées cellulaires provenant de mélanome nécessitent d'être réalisées. Une étude ultérieure, réalisée par un autre groupe, a montrée que les récepteurs P2X₇ étaient exprimés dans 14 échantillons de mélanome humain. Les récepteurs P2X₇ étaient également exprimés (ARNm et protéine) dans une lignée de cellule de mélanome A375. Les récepteurs P2X₇ semblaient fonctionnels (incorporation de YO-PRO-1), et leur activation pharmacologique par le BzATP déclenchait l'apoptose. Les auteurs suggèrent que ces récepteurs pourraient représenter une nouvelle cible pour le traitement du mélanome (White et al., 2005).

F. Leucémie lymphoïde chronique

L'expression des récepteurs P2X₇ a été décrite dans les lymphocytes leucémiques humains (Adinolfi et al., 2002; Cabrini et al., 2005). Adinolfi et ses collaborateurs ont étudié l'expression et le fonctionnement des récepteurs P2X₇ dans des cellules de patients atteints par la leucémie lymphoïde chronique (LCC). 13 des patients étudiés présentaient une forme évolutive de LCC et 8 présentaient une forme indolente de cette maladie. Les données ont montré que les concentrations en calcium intracellulaire basal étaient significativement élevées dans les lymphocytes provenant de patients présentant une forme évolutive par rapport aux lymphocytes de la forme indolente. En outre, l'augmentation du calcium intracellulaire, suite à la stimulation des récepteurs P2X₇ par l'ATP, était beaucoup plus importante dans les lymphocytes provenant de patients de la forme évolutive. Ces mêmes lymphocytes exprimaient les récepteurs P2X₇ (ARNm et protéine) à un niveau plus élevé que les lymphocytes provenant des patients atteints de la forme indolente de la maladie. L'ATP

extracellulaire inhibe la prolifération des lymphocytes isolés des patients touchés par la forme évolutive de LCC, mais pas la forme indolente. Les auteurs ont suggéré que l'expression ainsi que le fonctionnement des récepteurs P2X₇ peuvent être corrélés avec la sévérité de la leucémie lymphoïde chronique (Adinolfi et al., 2002). Une autre étude a montré qu'un polymorphisme du gène du récepteur P2X₇ "1513A>C" (la substitution E496A induisant une perte de fonction) voit sa fréquence augmentée chez 36 patients atteints de LCC et était associé à un risque accru de développer cette maladie (Wiley et al., 2002). Une autre étude a montré que l'expression du récepteur P2X₇ était significativement plus élevée (ARNm et protéine) dans des cellules mononuclées de la moelle osseuse de patients atteints de leucémie lymphoblastique aiguë (ainsi que la leucémie myéloïde chronique et aiguë) par rapport aux cellules mononuclées de la moelle osseuse de personnes saines (Zhang et al., 2004). Dans une étude récente, des expériences de PCR en temps réel et de Western blot sur des échantillons de cellules mononucléaires de la moelle osseuses de leucémies aiguës pédiatriques, ont montré que les récepteurs P2X₁, P2X₄, P2X₅ et P2X₇ étaient surexprimés par rapport à des échantillons témoins, tandis que les récepteurs P2X₂, P2X₃ et P2X₆ étaient absents ou peu exprimés dans les deux groupes. Les niveaux d'expression les plus élevés pour les récepteurs P2X₇ ont été retrouvés chez des patients en rechute. Ils ont également montré une diminution significative de l'expression des récepteurs P2X₄, P2X₅ et P2X₇ après rémission complète suite à la chimiothérapie. Enfin, ils ont montré que les cellules mononucléaires de la moelle osseuse de leucémies aiguës pédiatriques expriment des récepteurs P2X₇ fonctionnels (mesure du calcium intracellulaire suite à la stimulation des récepteurs P2X₇ par 100 μ M de BzATP). Les auteurs suggèrent que les récepteurs P2X₁, P2X₄, P2X₅ et spécialement le récepteur P2X₇ pourrait être impliquer dans l'apparition d'un phénotype malin et ainsi jouer un rôle important dans les leucémies pédiatriques (Chong et al., 2010).

G. Les tumeurs cérébrales (Neuroblastome)

L'expression protéique des récepteurs P2X₇ a été détectée à la fois dans les tumeurs primaires de neuroblastome (par immunohistochimie) et dans des lignées cellulaires de neuroblastome (par cytométrie en flux et western blot) (Raffaghello et al., 2006). Dans la lignée cellulaire ACN, le récepteur P2X₇ semble être fonctionnel (fluorimétrie calcique) mais sa stimulation *in vitro* par l'ATP (doses croissantes allant de 0.25 mM jusqu'à 5 mM) n'induisait pas l'activation des caspase-3 ni l'apoptose des cellules de neuroblastome. En revanche, la stimulation des récepteurs P2X₇ avec des doses d'ATP allant jusqu'à 1 mM entraînait la prolifération de ces cellules. La stimulation de la croissance cellulaire était en

partie due à la substance P libérée par les cellules cancéreuses elles-mêmes. Les auteurs proposent que les cellules de neuroblastome semblent réduire au silence l'activité pro-apoptotique des récepteur P2X₇ et semblent coupler la stimulation de ces récepteurs à la libération des facteurs trophiques agissant localement (Raffaghello et al., 2006). Il a été reporté que la différenciation des cellules de souris de neuroblastome 'neuro-2a' en cellules de types neuronales induite par l'acide rétinoïque implique une diminution de l'expression protéique et du fonctionnement (mesure du calcium intracellulaire) du récepteur P2X₇ (Wu et al., 2009). Il a également été démontré que les antagonistes des récepteurs P2X₇ (oATP, A438079, BBG) ou l'utilisation de siRNA ciblant l'expression de P2X₇ induisaient une excroissance des neurites. Cette expression diminuée des récepteurs P2X₇ induisait également une diminution dans la concentration du calcium intracellulaire basale. Il a été conclu que la diminution de l'expression des récepteurs P2X₇ était associée à la différenciation neuronale et que l'activation des récepteurs P2X₇ permettait de maintenir la survie des cellules de neuroblastome N2a (Wu et al., 2009). Une autre étude sur les mêmes cellules de neuroblastome N2a a également montré que l'inhibition des récepteurs P2X₇ conduisait à une augmentation de la formation des neurites et que ces récepteurs sont impliqués dans le maintien des cellules de neuroblastome à l'état non différencié. Les auteurs ont également montré que l'inhibition des récepteurs P2X₇ par le BBG induisait une diminution de l'activité de la protéine kinases Ca²⁺/calmoduline-dépendantes (CaMKII), l'activation accrue de la *Focal Adhesion Kinase* (FAK) et l'augmentation la phosphorylation de Akt et de la *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3) (Gómez-Villafuertes et al., 2009).

H. Cancer de l'utérus et du col de l'utérus

1. Cancer de l'utérus

Il a été reporté que les niveaux d'expression des récepteur P2X₇ sont plus faibles dans les tissus épithéliaux cancéreux utérins par rapport aux tissus normaux correspondants. Les auteurs suggèrent que le récepteurs P2X₇ pourrait être utilisé comme un nouveau biomarqueur pour différencier les tissus épithéliaux utérins normaux des tissus cancéreux (Li et al., 2006). Dans une autre étude, cette équipe a montré que l'expression, transcriptionnelle et protéique, du récepteur P2X₇ diffère entre les tissus normaux et hyperplasiques par rapport aux tissus pré-cancéreux et cancéreux de l'endomètre. Cette expression était significativement plus faible *in vivo* dans les tissus de l'hyperplasie complexe avec atypie ou d'adénocarcinome de l'endomètre par rapport aux tissus de l'endomètre normale, d'hyperplasie simple ou

d'hyperplasie complexe (Li et al., 2007). Il a été proposé que l'expression réduite des récepteurs P2X₇ dans les cellules de cancer de l'utérus pourrait être le résultat d'une augmentation de l'expression des micro-ARN, miR-186 et miR-150, régulant l'expression du récepteur P2X₇ (Zhou et al., 2008). L'importance physiopathologique de ce phénomène n'est pas clairement élucidée.

2. Cancer du col de l'utérus

Il a été proposé que les œstrogènes préviennent les effets apoptotiques induits par la stimulation des récepteurs P2X₇ dans les cellules normales mais pas dans les cellules cancéreuses épithéliales humaines du col de l'utérus (Wang et al., 2004a). Les auteurs suggèrent que les œstrogènes peuvent avoir un effet permissif pour le développement et la croissance du cancer du col de l'utérus.

I. Conclusions

À l'exception du cancer de l'utérus où l'expression des récepteurs P2X₇ semble être diminuée, tous les autres cancers étudiés à ce jour montre une surexpression du récepteur P2X₇. Un constat captivant est que contrairement aux hypothèses initiales, le récepteur P2X₇ semble pouvoir stimuler la croissance cancéreuse en diminuant l'apoptose ou en stimulant la prolifération des cellules cancéreuses (par exemple en favorisant la sécrétion de facteurs de croissance). Dans le cancer papillaire de la thyroïde, la stimulation du récepteur P2X₇ déclenche la libération d'IL-6, un facteur de croissance pour les thyrocytes (Solini et al., 2008). Dans le neuroblastome humain, ce récepteur supporte la libération de substance P, un facteur de croissance pour ces cellules cancéreuses (Raffaghello et al., 2006). Toutes ces études se sont focalisées principalement à la régulation de la prolifération cellulaire et l'apoptose, mais d'autres paramètres importants comme la migration et l'invasion des cellules cancéreuses n'avaient pas été étudiés. Nous avons cherché à savoir à travers mes travaux de thèse l'implication des récepteurs P2X₇ dans les propriétés invasives des cellules cancéreuses et en particulier dans les phénomènes de migration et de dégradation de la MEC qui sont des paramètres importants dans le développement des métastases.

Résultats

I. Implication du récepteur purinergique P2X₇ dans l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires humaines

A. Introduction

La dissémination des cellules cancéreuses dépend de la capacité des cellules cancéreuses à migrer et est associée à l'invasivité des cellules cancéreuses, caractérisée par leur capacité à franchir la membrane basale et à remodeler la matrice extracellulaire qui les entoure (Yamaguchi and Oikawa, 2010). Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études se sont focalisées sur l'implication des MMP dans le clivage protéolytique des composants de la matrice extracellulaire et à leur rôle dans la progression néoplasique (Egeblad and Werb, 2002). Toutefois des études récentes montrent que les cathepsines à cystéine sont surexprimées et associées à la progression de nombreux cancers dont le cancer du sein (Mohamed and Sloane, 2006). En effet, une expression élevée de la cathepsine B a été corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, comme dans d'autres cancers (Jedeszko and Sloane, 2004). En outre l'activité de ces protéases à cystéine entraîne une augmentation de l'invasivité des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* (Gillet et al., 2009). Les cathepsines à cystéine, classiquement décrites comme étant majoritairement localisées dans le compartiment lysosomal, se retrouvent libérées dans le microenvironnement tumoral aussi bien sous la forme de zymogènes que de formes matures (Mohamed and Sloane, 2006). Cependant les voies de signalisation régissant leur libération, ainsi que leur activation dans le milieu extracellulaire restent mal connues à ce jour. La composition biochimique du microenvironnement tumoral extracellulaire et en particulier la présence de facteurs autocrines et paracrines est cruciale dans la modulation de la croissance et de l'échappement des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses, elles-mêmes, sont à l'origine de la libération de ces facteurs dans l'interstitium tumoral. Des résultats récents montrent que la concentration en ATP est augmentée dans le tissu interstitiel des tumeurs et pourrait jouer le rôle de facteur autocrine/paracrine. Ainsi les sites tumoraux sont connus pour présenter de très fortes concentrations d'ATP, tandis que ce nucléotide est normalement indétectable dans les tissus sains (Pellegatti et al., 2008).

Ce nucléotide agit comme une molécule de signalisation extracellulaire (Corriden and Insel, 2010) et active des récepteurs purinergiques membranaires que l'on peut subdiviser en deux groupes : les récepteurs P2Y qui sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires, couplés à des protéines G hétérotrimériques, et les récepteurs P2X qui sont des récepteurs canaux perméables aux cations Ca^{2+} , Na^{+} et K^{+} (Khakh and North, 2006). En tant que médiateur extracellulaire, l'ATP participe à la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire physiologique mais également la transformation néoplasique (Corriden and Insel, 2010). De nombreuses études portent un très grand intérêt sur les récepteurs P2X₇ qui semblent avoir un niveau d'expression très élevé dans différentes tumeurs (sein, prostate, mélanomes,...) et non dans les tissus non cancéreux correspondants (Adinolfi et al., 2002; Raffaghello et al., 2006; Slater et al., 2004b). Certaines études réalisées sur les cancers du sein et de la prostate, suggèrent que le récepteur P2X₇ pourrait être non fonctionnel (Slater et al., 2004a, 2004b) mais que son niveau d'expression pourrait néanmoins servir de marqueur précoce dans le cancer (Slater et al., 2005). Dans d'autres études menées sur d'autres types de cancer, P2X₇ semble avoir des effets anti-apoptotiques (Deli et al., 2007) afin de soutenir la croissance cellulaire (Raffaghello et al., 2006) ou la libération d'IL-6 par les cellules cancéreuses. De façon contradictoire, le récepteur P2X₇ se voyait doté d'une activité pro-apoptotique dans les cellules épithéliales saines du col de l'utérus (Wang et al., 2004b) et que son expression serait réduite dans ce type de cancer (Li et al., 2006). Cependant le rôle de ce récepteur, ainsi que les potentielles voies de signalisation qu'il active dans le processus tumoral restent inconnus. Nous avons voulu examiner à travers cette étude l'expression ainsi que la fonctionnalité de ce récepteur dans des cellules cancéreuses mammaires hautement invasives et nous avons cherché à savoir son implication dans les propriétés de survie cellulaire mais aussi et surtout en particulier dans les phénomènes de migration et d'invasion cellulaire qui sont des paramètres importants dans le développement métastatique.

Les résultats associés à cette partie expérimentale ont été publiés dans le journal *Oncogene*.

B. Article 1

B Jelassi, A Chantôme, F Alcaraz-Pérez, A Baroja-Mazo, ML Cayuela, P Pelegrin, A Surprenant and S Roger. "P2X₇ receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness". *Oncogene* (2011) 30, 2108-2122.

ORIGINAL ARTICLE

P2X₇ receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness

B Jelassi¹, A Chantôme¹, F Alcaraz-Pérez², A Baroja-Mazo³, ML Cayuela², P Pelegrin^{3,4}, A Surprenant⁴ and S Roger¹

¹Inserm U921, Université François Rabelais de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, Tours, France; ²Telomerase, Cancer and Aging Group, University Hospital 'Virgen de la Arrixaca'-FFIS, Carretera Palmar, Murcia, Spain; ³Inflammation and Experimental Surgery Group, University Hospital 'Virgen de la Arrixaca'-FFIS, Carretera Palmar, Murcia, Spain and ⁴Faculty of Life Science, Michael Smith Building D3315, University of Manchester, Manchester, UK

ATP-gated P2X₇ receptors (P2X₇R) are unusual plasma membrane ion channels that have been extensively studied in immune cells. More recently, P2X₇R have been described as potential cancer cell biomarkers. However, mechanistic links between P2X₇R and cancer cell processes are unknown. Here, we show, in the highly aggressive human breast cancer cell line MDA-MB-435s, that P2X₇ receptor is highly expressed and fully functional. Its activation is responsible for the extension of neurite-like cellular prolongations, of the increase in cell migration by 35% and in cell invasion through extracellular matrix by 150%. The change in cancer cell morphology and the increased migration appeared to be due to the activation of Ca²⁺-activated SK3 potassium channels. The enhanced invasion through the extracellular matrix was related to the increase of mature forms of cysteine cathepsins in the extracellular medium, which was independent of SK3 channel activity and not associated with cell death. Pharmacological targeting of P2X₇R *in vivo* was crucial for cell invasiveness in a zebrafish model of metastases. Our results demonstrate a novel mechanistic link between P2X₇R functionality in cancer cells and invasiveness, a key parameter in tumour growth and in the development of metastases. They also suggest a potential therapeutic role for the newly developed P2X₇R antagonists.

Oncogene (2011) 30, 2108–2122; doi:10.1038/onc.2010.593; published online 17 January 2011

Keywords: P2X₇ receptors; migration; SK3 channels; cancer cell invasion; cystein cathepsins

Introduction

Breast cancer is the most common female cancer and the first cause of women death by cancer worldwide. Most

cancer patients do not die because of local complications of their primary solid tumour growth, which are relatively well treated, but rather to the appearance of metastases. The development of metastases consists of a complex series of events accomplished by tumour cells after they acquire numerous abilities, one of which being the acquisition of an invasive potency. This mainly lies into an enhanced migration and the ability to digest the extracellular matrix (Gupta and Massague, 2006). Cell migration involves dynamic cytoskeletal changes and is highly regulated by the intracellular concentration of calcium. Basement membranes underlying epithelial cells as well as extracellular matrices constitute barriers for transformed cells to invade subjacent stroma. Their proteolytical disruption, by extracellular proteases, allows tumour cells to progress to malignancy and metastasis. In the last decade, studies mainly focused on the involvement of matrix metalloproteinases in the neoplastic progression (Egeblad and Werb, 2002), but recently, it appeared that cysteine cathepsins are highly upregulated in a wide variety of cancers, including breast cancer (Mohamed and Sloane, 2006). Indeed elevated cathepsin B expression correlates with poor prognosis in breast cancer as in other cancers (Jedezsko and Sloane, 2004) and its activity has been shown to enhance breast cancer cells invasiveness *in vitro* (Gillet *et al.*, 2009). Cathepsins classical localization within intracellular lysosomes is found to be modified in tumours. They can be secreted both at their pro- and active forms by cancer cells (Frosch *et al.*, 1999; Roshy *et al.*, 2003). However, the signalling pathway regulating their release and activation in the extracellular medium has to be clarified.

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is a well known source of free energy for cells and is found at high concentrations (5–10 mM) in intracellular compartments. In some physiological occasions, ATP can be released extracellularly in very high concentrations. This also happens in necrotic cell death and pathological conditions. ATP is secreted by cancer cells into their microenvironment at relatively high concentrations (Raffaghello *et al.*, 2006) and is released in sites of tissues damage such as perilesional regions of cancers (Wang *et al.*, 2004b). Indeed, tumour sites are known

Correspondence: Dr S Roger, Inserm U921, Université François Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé, Tours 37032, France.

E-mail: sebastien.roger@univ-tours.fr

Received 8 July 2010; revised 1 December 2010; accepted 4 December 2010; published online 17 January 2011

to contain much higher concentrations of ATP than healthy tissues where it would normally be undetectable (Pellegatti *et al.*, 2008). Extracellular ATP acts as a signalling molecule by activating plasma membrane G protein-coupled P2Y receptors and/or ligand-gated ion channels P2X receptors (Burnstock, 2006). Among the members of the P2X receptors family, the latest cloned P2X₇ receptors (P2X₇R) (Rassendren *et al.*, 1997) are very unique by different features, some of them are: (1) their sensitivity to ATP (North, 2002), (2) their facilitation under successive or sustained applications of agonist (Hibell *et al.*, 2000; Roger *et al.*, 2008, 2010a) and (3) the appearance of a large, non-selective membrane pore after sustained stimulations with ATP (Pelegrin and Surprenant, 2006). Recently, several tumours have been shown to express P2X₇R at unusually high levels (Adinolfi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Slater *et al.*, 2004a, b; Wang *et al.*, 2004a; Raffaghello *et al.*, 2006; Deli *et al.*, 2007; Solini *et al.*, 2008), however, their functionality and involvement in the physiology of cancer cells remain unclear. In some studies performed on breast and prostate cancers, it was suggested that P2X₇R might be non-functional (Slater *et al.*, 2004a, b), but proposed to serve as an early marker for cancer (Slater *et al.*, 2005). In other cancers, P2X₇R activity could be responsible for anti-apoptotic effects (Deli *et al.*, 2007), for sustaining cell growth (Raffaghello *et al.*, 2006) or for the release of IL-6 by cancer cells (Solini *et al.*, 2008). On the contrary, it was proposed to induce apoptosis in normal cervical epithelial cells (Wang *et al.*, 2004a) and that its expression was decreased in cervical cancers (Li *et al.*, 2006). Therefore, in this study, we investigated the expression, characterized the functionality of P2X₇R in highly metastasizing breast cancer cells and tried to clarify their involvement in oncogenic properties.

Results

Human cancer cells express functional P2X₇R

We first analyzed the mRNA expression of P2X₇R in human non-cancerous and cancerous mammary cells (Figure 1a). Importantly, P2X₇R were not expressed in non-cancerous mammary cells (MCF-10A, 184A1 and Human Mammary Epithelial Cell) whereas they were markedly expressed in highly invasive MDA-MB-435s cells. Many polymorphisms have been identified in the *P2RX7* gene, some of them being responsible for important functional alterations and associated to many diseases (Cabrin *et al.*, 2005; Shemon *et al.*, 2006; Roger *et al.*, 2010b). We therefore performed P2X₇R complementary DNA sequencing in MDA-MB-435s cells. We did not identify any particular polymorphism the receptor expressed in cancer cells corresponded to the full-length P2X₇A splice variant. In accordance with results coming from RT-PCR, western blot experiments indicated that P2X₇R proteins were only found in MDA-MB-435s cancer cells (Figure 1b). Although these cancer cells mainly expressed P2X₇R, low levels of mRNA for P2X₄, P2X₅ and P2X₆ receptors were also

detected (Figure 1c). As in cancer cells mRNA expression does not always correlate to the translation in functional proteins (Roger *et al.*, 2007), we performed patch clamp experiments to assess the functionality of such receptors. We conducted experiments using 10 μ M ATP, which is supposed to activate all P2X receptors except P2X₇R, but did not record any ATP-evoked current from cancer cells. Only millimolar concentrations of ATP were able to trigger the appearance of an inward and facilitating current (Figure 1d). These are among the well-known specificities of P2X₇R-evoked currents. Figure 1e shows representative inward currents that never desensitized, recorded from a representative cancer cell during an ATP dose-response protocol. This protocol was used to draw the ATP concentration-peak current relationship from MDA-MB-435s cancer cells. This was compared with the relationship coming from HEK293 cells expressing human P2X₇R (hP2X₇R) (Figure 1d). Fitting these relationships with sigmoidal equations gave ATP EC₅₀ of 3.3 ± 0.2 mM and 3.4 ± 0.7 mM for ATP-evoked currents coming from MDA-MB-435s and hP2X₇R expressing HEK293 cells, respectively.

As shown in Figure 2a, multiple applications of 5 mM ATP to cancer cells were responsible for a dramatic increase of ATP-evoked currents. This property is a particularity of P2X₇R and is called facilitation (Hibell *et al.*, 2000; Roger *et al.*, 2008, 2010a). This led to a seven times increase of the current density from the first to the eighth ATP application (Figure 2b). The use of the BzATP agonist gave us an EC₅₀ of 263 ± 22 μ M (Figure 2c). This is in line with the fact that P2X₇R are more sensitive to BzATP than to ATP (North, 2002). ATP-evoked currents from MDA-MB-435s cancer cells were inhibited by human P2X₇R antagonists KN62 and A740003 (Figure 2d and supplementary Figure 1a). Current inhibition curves indicated IC₅₀ of 16.3 ± 2.1 nM ($n = 3-9$ cells) and 9.8 ± 0.9 nM ($n = 2-9$ cells) for KN62 and A740003, respectively (Figure 2d), which are the classical concentrations used for antagonizing hP2X₇R activity (Donnelly-Roberts and Jarvis, 2007). Sustained activation of P2X₇R is also known to induce membrane permeation following the activation of pannexin-1 and allowing the uptake of membrane-impermeant fluorescent dyes such as ethidium (Pelegrin and Surprenant, 2006). Ethidium uptake was also recorded in MDA-MB-435s cells stimulated with ATP (5 mM), which was completely inhibited when KN62 (1 μ M) was added to the external solution (Figure 2e). Extracellular applications of ATP were responsible for the increase of the internal calcium concentration, monitored by Fluo-4 fluorescence. Although 5 mM ATP was responsible for a KN62-sensitive intracellular calcium rise, applying 10 μ M ADP, UTP or ATP in the external solution was not able to increase the internal calcium (Figure 2f), which is coherent with the fact that MDA-MB-435s cells only express P2Y₁₁R among all metabotropic P2Y receptors, which are often coupled to a cyclic AMP signalling pathway (supplementary Figure 1B). Taken together, all these results suggest that P2X₇R are the only P2X receptors functional in MDA-MB-435s breast cancer cells.

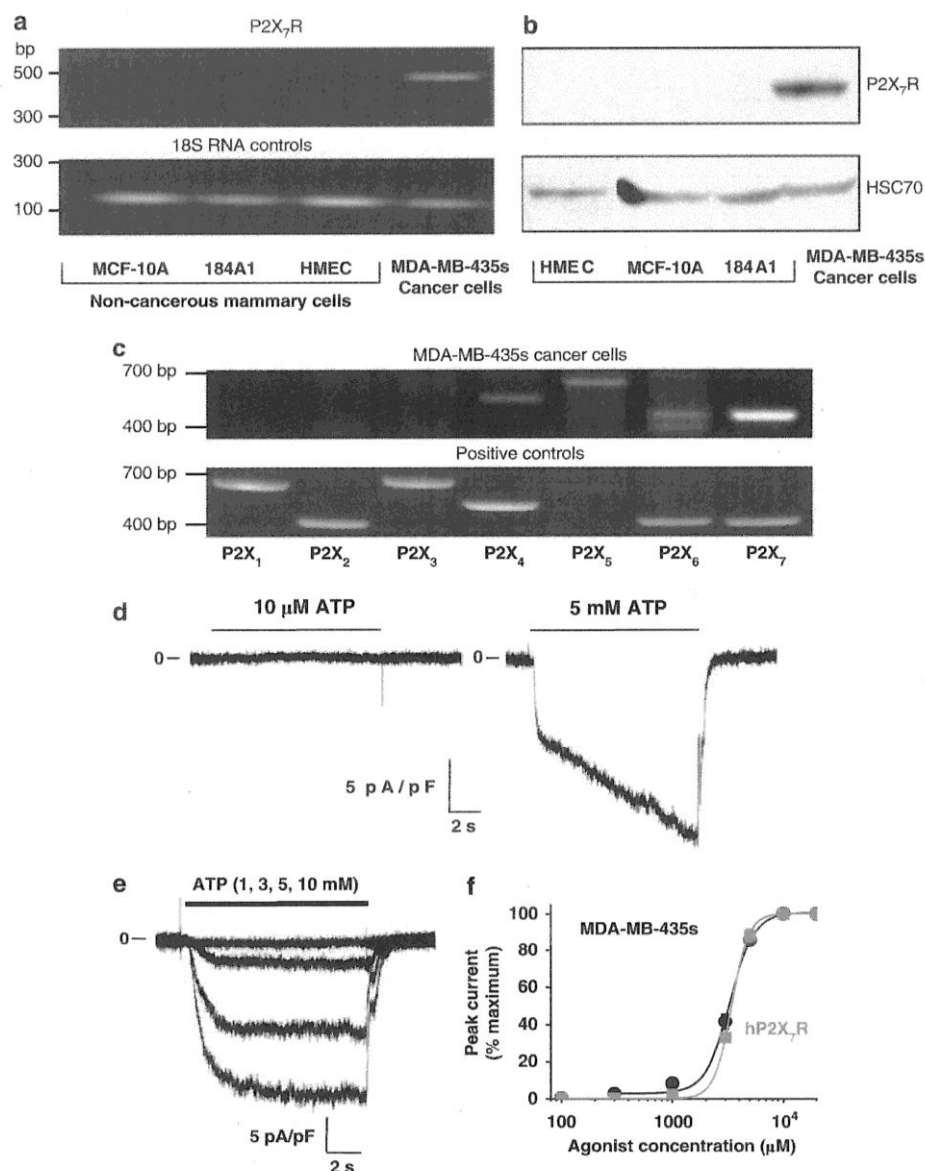


Figure 1 Expression and functionality of ATP-gated P2X receptors in the breast cancer cell line MDA-MB-435s. (a) RT-PCR experiments (30 cycles) showing the expression of mRNA for P2X₇R in human non-cancerous mammary cells (MCF-10A, 184A1 and HMEC) and highly invasive MDA-MB-435s breast cancer cells. (b) Western blots experiments showing the protein expression of P2X₇R in MDA-MB-435s cancer cells and not in human non-cancerous mammary cells (MCF-10A, 184A1 and HMEC). HSC70 was used as a control protein. (c) Expression of mRNA for P2X₁₋₇ receptors. RT-PCR experiments (30 cycles) show the weak expression of mRNA for P2X₄R, P2X₅R and P2X₆R, and a strong expression of P2X₇R in the highly invasive MDA-MB-435s human breast cancer cell line. Positive controls of the primers were performed using corresponding human P2X receptor cDNA. (d) Whole-cell patch clamp recordings from MDA-MB-435s cancer cells. Membrane potential was held at -60 mV and whole-cell currents were recorded during ATP applications. Effect of 10-s long applications of $10 \mu\text{M}$ (left) and 5 mM (right) ATP on whole-cell currents. Although $10 \mu\text{M}$ ATP is not able to produce any current, 5 mM ATP is responsible for a facilitating P2X₇R-like inward current. (e) Representative currents recorded from one MDA-MB-435s cell, in response to 10-s long applications of increasing concentrations of ATP (1, 3, 5 and 10 mM), after full facilitation. (f) ATP concentration-response curves for inward currents recorded after full facilitation. ATP-evoked currents, from 3–9 MDA-MB-435s cells (black circles) and from 2–9 HEK293 cells transfected with human P2X₇R (gray squares), are expressed as a percentage of the maximum obtained with 10 mM ATP. The EC_{50} obtained from sigmoidal fits were $3.3 \pm 0.2 \text{ mM}$ in MDA-MB-435s cells ($n = 3-9$ cells) and $3.4 \pm 0.7 \text{ mM}$ ($n = 16$ cells) in hP2X₇R-HEK293 cells.

P2X₇R activation induces SK3-dependent changes in cell morphology and enhancement of cancer cell migration
As exposed previously, several tumours have been shown to overexpress P2X₇R; however, their participation in

controlling cell proliferation or even apoptosis is not clear. As some studies proposed a role in apoptosis, we studied the survival of MDA-MB-435s cancer cells over 24 h under P2X₇R stimulation (supplementary Figure 1C).

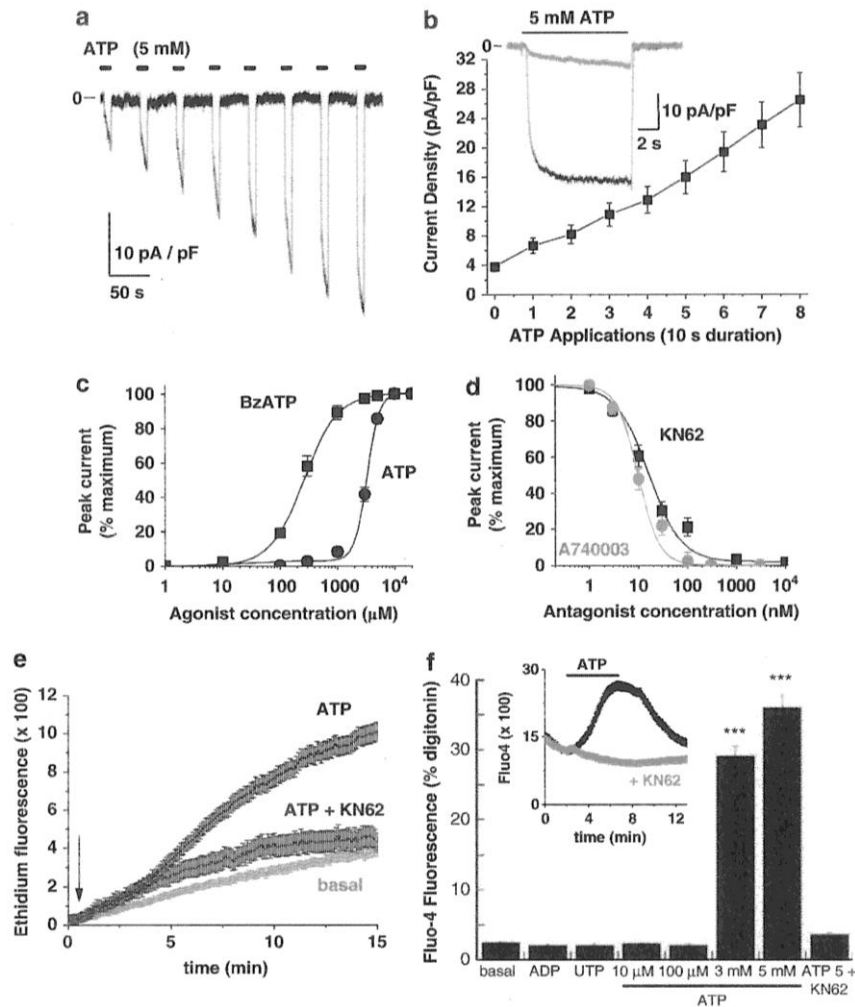


Figure 2 Characterization of ATP-gated P2X₇R functionality in the breast cancer cell line MDA-MB-435s. (a) Whole-cell patch clamp recordings at a holding potential of -60 mV. Eight 10-s long applications of ATP (5 mM), separated by 40-s intervals in normal PSS, resulted into facilitating inward currents characteristic for P2X₇R. (b) Facilitation phenomenon responsible for the increase of the (absolute) inward current density upon numerous 10-s long applications of 5 mM ATP, separated by 40-s intervals in normal PSS. The inset is showing that the facilitation phenomenon was responsible for a dramatic increase of the 5 mM ATP-evoked current, from the first application (gray trace) to the fully activated state (black trace). (c) ATP (black circles) and BzATP (black squares) concentration-response curves for inward currents, after full facilitation. ATP and BzATP-evoked currents, coming from 3–9 MDA-MB-435s cells, are related to the maximal effect obtained with 10 mM ATP and 3 mM BzATP, respectively. EC_{50} obtained from sigmoidal fits were 3.3 ± 0.2 mM and 263 ± 22 μM for ATP and BzATP, respectively. (d) KN62 (black squares) and A740003 (grey circles) inhibition curves on ATP (5 mM)-evoked currents, obtained from 3–10 MDA-MB-435s cells. Curves were fitted by a sigmoidal equation giving an IC_{50} of 16.3 ± 2.1 nM for KN62 and 9.8 ± 0.9 nM for A740003. (e) Ethidium uptake in MDA-MB-435s cells in presence of 5 mM ATP or not (basal). ATP was added, as indicated by the arrow, to the PSS containing 25 μM EtBr. The ATP-induced ethidium uptake was completely abolished in presence of the hP2X₇R antagonist KN62 (1 μM). The figure represents the average fluorescence of three independent experiments ($n = 70$ –150 cells). (f) Fluo-4 fluorescence expressed as a percentage of the response induced by digitonin-induced permeabilisation, in basal condition or upon stimulation with ADP (10 μM), UTP (10 μM) or ATP (at the concentrations indicated in the figure) in presence or not of KN62 (1 μM). The inset is showing representative intracellular calcium changes in response to 5 mM ATP, applied during the time represented by the horizontal bar, in presence or not of 1 μM KN62. These are averaged data from three independent experiments ($n = 60$ cells). Statistically different from basal condition at *** $P < 0.001$ using Student's *t*-test.

Treating the cells in increasing concentrations of ATP, from 30 μM to 3 mM, had no significant effect on cell viability compared with a control condition without ATP. However, ATP concentrations higher than 3 mM induced a significant cell death, which was prevented by co-incubation with KN62 or A740003 (supplementary Figure 1C). This indicated that P2X₇R could be

responsible for cancer cell death at very high, but not at lower activation levels and durations. In many cell types, the sustained activation of P2X₇R also results in morphological events such as plasma membrane blebbing (Roger *et al.*, 2008) or cell shrinkage with a loss of cell prolongations (Raffaghello *et al.*, 2006). In contrast, we found that activation of P2X₇R in cancer cells caused

the elongation of 'neurite-like' cell prolongations (Figure 3a). Indeed the proportion of cells bearing at least one cellular extension increased in an ATP dose-dependent manner in the concentrations range of P2X₇R activation (1–3 mM), from $10.8 \pm 2.0\%$ in control condition to $39.6 \pm 3.1\%$ in presence of 3 mM ATP

(Figure 3b). This effect of millimolar concentrations of ATP was also observed in cells transfected with scramble siRNA-A as a control while it was completely abolished in presence of hP2X₇R antagonists or when cells were transfected with siRNA directed against P2RX7 mRNA (siP2X₇). Transfection of cells with

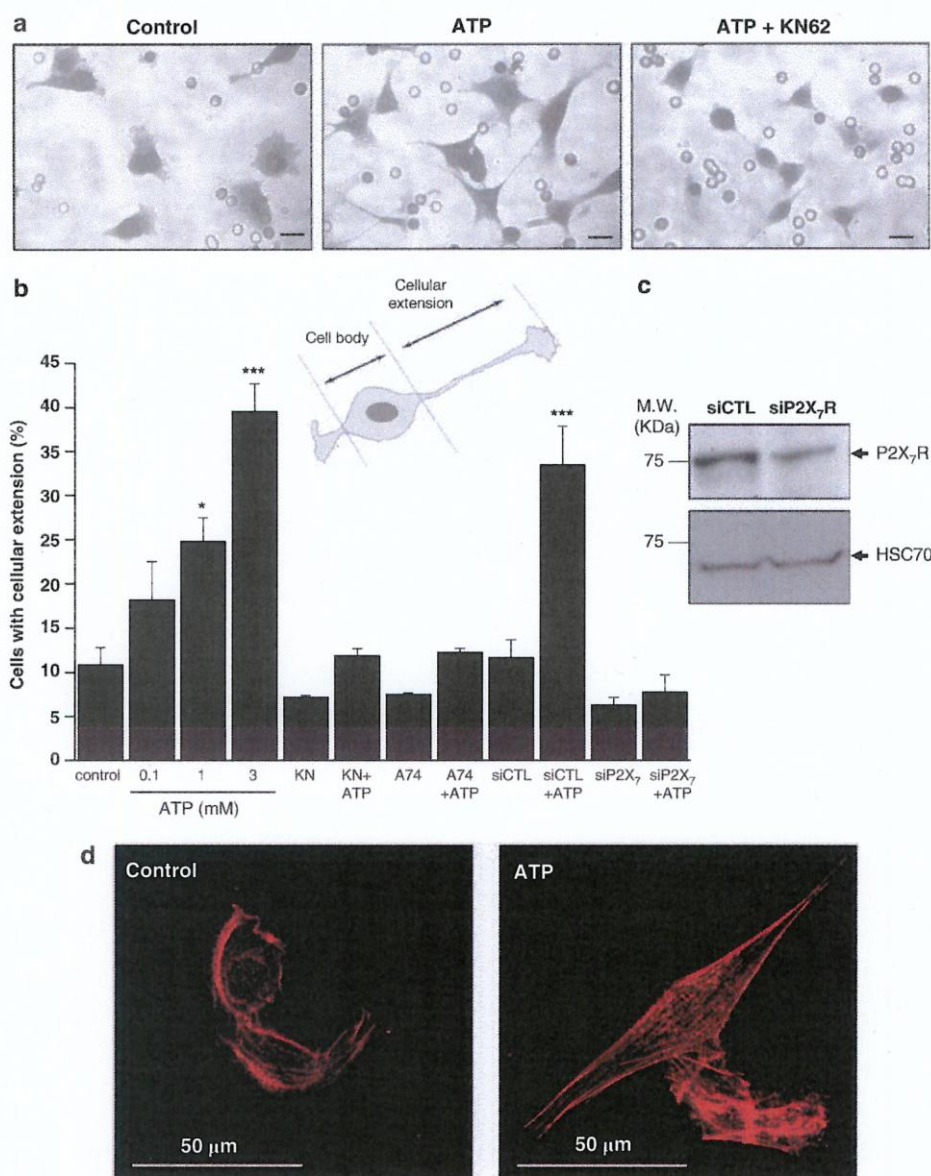


Figure 3 Morphological effects of P2X₇R stimulation on MDA-MB-435s cancer cells. **(a)** Representative pictures obtained from MDA-MB-435s breast cancer cells showing different morphologies observed, in absence (control) or in presence of 3 mM ATP, or 3 mM ATP + 1 μ M KN62. Cells were stained with haematoxylin and pictures were taken on invasion inserts after 24 h incubation, at the $\times 20$ objective. The scale bar indicates 20 μ m. **(b)** Histograms showing the proportion of cells exhibiting at least one cellular extension under control condition (no ATP) or after stimulation with ATP, at indicated concentrations, in presence or not of 1 μ M KN62 or 300 nM A740003. This was performed in wild-type cell or in cells transfected with siRNA directed against P2RX7 mRNA (siP2X₇) or scramble siRNA-A as a control (siCTL). As described by the cartoon on top, were only considered as 'cellular extensions' and counted (using ImageJ software 1.38I) cell projections showing a size bigger than the cell body. **(c)** Western blots experiments showing the protein expression of P2X₇R in MDA-MB-435s cancer cells transfected with siRNA directed against P2RX7 mRNA (siP2X₇) or scramble siRNA-A as a control (siCTL). HSC70 was used as a control protein. **(d)** Confocal imaging experiments showing MDA-MB-435s cells on a film of Matrigel and cultivated for 24 h in absence (Control) or in presence de 3 mM ATP (ATP). Actin fibers were stained with Alexa fluor 594-phalloidin. Statistically different from control condition at * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ using Student's *t*-tests.

siP2X₇ resulted in a 70% reduction of P2X₇R protein expression (Figures 3b and c, Supplementary Figure 1D). In basal conditions, that is, in the absence of ATP stimulation, P2X₇R antagonists or siP2X₇ slightly, but not significantly, reduced the proportion of cells showing cellular extensions. Same correlations were found when counting the proportion of cells bearing multiple extensions (Supplementary Figure 2A). These morphological changes observed in presence of extracellular ATP are the hallmarks of increased migratory abilities. This fact correlated with the formation of actin stress fibres under ATP stimulation (Figure 3d). Moreover, stimulating the cells with 1 and 3 mM ATP significantly increased cell migration by 13 and 32%, respectively (Figure 4a). P2X₇R receptors antagonists KN62 and A740003 reduced cell migration by about 5% when applied alone and completely abolished the ATP-mediated increase of cell migration. In cells transfected

with siP2X₇, ATP was not able to increase cell migration (Figure 4b).

Recently, it has been shown that SK3 channels, from the family of small-conductance Ca²⁺-activated potassium channels (SK_{Ca}), were important regulators of breast (Potier *et al.*, 2006), colon (Potier *et al.*, 2010) and melanoma (Chantome *et al.*, 2009) cancer cells migration. We first verified that siRNA directed against mRNA for P2X₇R did not interfere with SK3 protein expression (supplementary Figure 2B). We hypothesized that the P2X₇R-mediated calcium influx (Figure 2f) could activate SK3 receptors and thereby enhance the change in cell morphology leading to the increase of cell migration. Indeed, we showed that ATP stimulation of cancer cells increased apamin-sensitive currents (Supplementary Figure 3). Then, we developed MDA-MB-435s-derived cell lines transduced with lentiviral vectors expressing either an untargeted short hairpin RNA (shRdm) or a short hairpin RNA specific for the SK3 transcript (shSK3). The expression of SK3 and P2X₇R proteins in these cell lines can be observed in Figure 5a. In shSK3 cancer cells, the stimulation with ATP did not induce the formation of cellular prolongations (Figure 5b). Blocking SK_{Ca} channels with apamin reduced cancer cell migration by about 50% in wild-type MDA-MB-435s cells (Figure 5c). Very interestingly, ATP was no longer able to promote cell migration in presence of apamin, supporting the fact that the promigratory effect of P2X₇R could be due to a potentiation of SK_{Ca} channels activity. With the MDA-MB-435s shRdm cell line, we found the same effects of ATP and apamin on cell migration than with wild-type cells. In contrast, MDA-MB-435s shSK3 cell line exhibited a 50% reduction in basal cell migration, which was insensitive to ATP stimulation (Figure 5c).

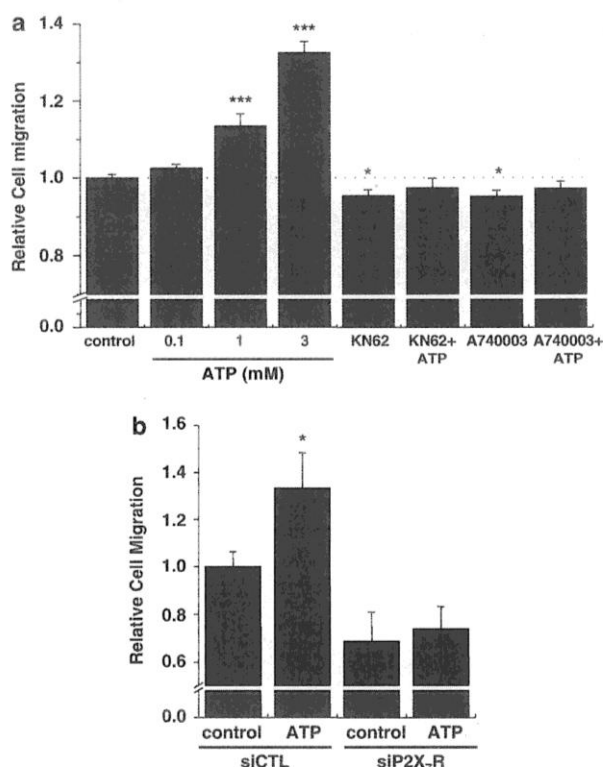


Figure 4 P2X₇ Receptors enhance MDA-MB-435s cancer cell migration. (a) Wild-type MDA-MB-435s cell migration depending on the presence of increasing doses ATP (0.1; 1 and 3 mM), in presence or not of hP2X₇ antagonists (1 μ M KN62 or 300 nM A740003). The normalized cell migration was calculated as the ratio of the total number of migrating cells in each condition to the total number of migrating cells in the control condition. The figure represents results from 3–8 independent experiments. (b) Same migration experiments were performed on MDA-MB-435s cancer cells transfected with siRNA directed against P2X₇ mRNA (siP2X₇) or scramble siRNA-A as a control (siCTL) ($n=3$ independent experiments). Statistically different from control condition: * $P<0.05$; *** $P<0.001$ using Mann-Whitney rank sum tests.

P2X₇R enhances cysteine cathepsins-dependent cell invasiveness

The ability of cancer cells to invade and spread all over the body relies on their capacity to migrate, as studied above, but also on their capacity to degrade their surrounding extracellular matrix. Therefore, we studied the invasive properties of MDA-MB-435s cancer cell in relation with P2X₇R stimulation, by using invasion inserts with filters coated with Matrigel (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) which mimics the extracellular matrix. As shown on Figure 6a, whereas 0.1 mM ATP had no significant effect, 1 and 3 mM ATP massively increased cell invasion by 37 and 150%, respectively. This ATP-induced invasion increase was completely inhibited in the presence of KN62 and A740003. Similar results were obtained with the human lung cancer cell line A549 (See Supplementary Figure 4). This effect of ATP was found in MDA-MB-435s cells transfected with siRNA-A as a control, but totally abolished in cells transfected with siP2X₇ (Figure 6b) confirming results obtained with antagonists. Silencing P2X₇R expression also resulted in a 24% reduction of basal cancer cell invasiveness in the absence of ATP stimulation. Interestingly, the use of the broad-spectrum

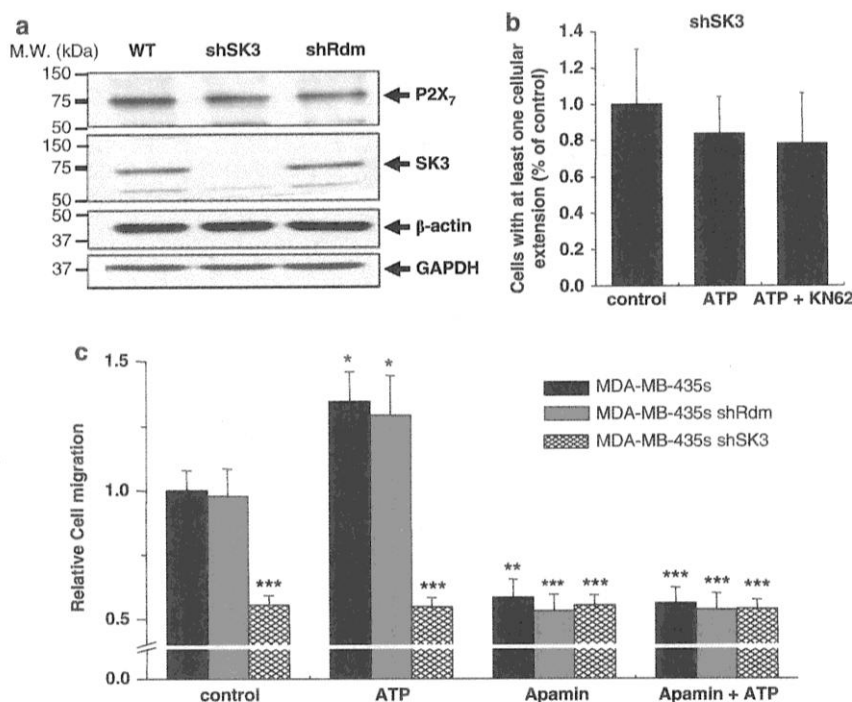


Figure 5 P2X₇R-induced cellular prolongations and cell migration depend on SK3 channels. **(a)** Western-blot analyses of P2X₇R, SK3, β-actin and GAPDH proteins in WT, shSK3 and shRdm cell lines. **(b)** Histograms showing the proportion of shSK3 MDA-MB-435s cells exhibiting at least one cellular extension under control condition (no ATP) or after stimulation with 3 mM ATP, in presence or not of 1 μM KN62. Results are expressed as a ratio to the control condition without ATP. **(c)** Effect of ATP (3 mM) and Apamin (1 nM) on the relative cell migration of MDA-MB-435s wild type (WT), MDA-MB-435s transduced with a lentiviral vector expressing an untargeted short hairpin RNA (shRdm) and MDA-MB-435s transduced with a lentiviral vector expressing a short hairpin RNA specific for the SK3 transcript (shSK3) ($n = 3$ independent experiments). The normalized cell migration was calculated as the ratio of the total number of migrating cells in each condition to the total number of MDA-MB-435s WT migrating cells in control condition. Statistically different from control condition: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ using Mann-Whitney rank sum tests.

inhibitor of cysteine cathepsins E64 was responsible for 80% decrease of the cell invasion (Figure 6c), without interfering with cell migration (Supplementary Figure 5a). As cathepsins seem to be the predominant proteases for MDA-MB-435s cells invasion, we investigated their activity towards the Z-Phe-Arg-AMC fluorogenic substrate in supernatants of cells incubated or not with ATP. In basal conditions, cell-free supernatants were responsible for a cathepsin activity, which was massively increased (> 5-fold increase) after cell stimulation for 24 h with 3 mM ATP (Figure 6d). This effect was inhibited when cells were co-stimulated with KN62, while apamin had no effect. To confirm the specificity of cathepsin activity in supernatants, we pre-incubated samples coming from ATP-stimulated cells with the cathepsin inhibitor E64 and in that case fluorescence release was almost inexistent (Figure 6d). Among all members of cysteine cathepsins, the cathepsin B has been involved in the progression of different cancers (Mohamed and Sloane, 2006). Cathepsin B was immunodetected under its inactive proform (46 kDa) and two active forms, the single- (31 kDa) and double-chain (24–25 kDa) forms (Figure 6e). Whereas, ATP stimulation did not modify the concentration of internal forms (pro-cathepsin B is better seen with longer exposition time in cell lysates,

see Supplementary Figure 5B), it was responsible for the specific increase of active forms of cathepsin B in supernatants concomitantly with a reduction of the proform amount. This effect was inhibited in presence of KN62 whereas apamin had no effect on ATP-induced cathepsin B release and activation in supernatants (Figure 6e). Relative amounts of pro- and active forms of cathepsins B, L, H, S and K were assessed from western blot experiments coming from cells stimulated with ATP (Figure 5f, Supplementary Figure 4C). ATP treatment was responsible for 1.5- to 5.5-fold increases of active forms of all cathepsins in supernatants (Figure 6f). In contrast, ATP induced a significant reduction of proforms for cathepsins B and L. Differentially it was responsible for an increase of pro-cathepsins S and K.

P2X₇R activity is required for in vivo MDA-MB-435s invasiveness

We finally analyzed the *in vivo* relevance of P2X₇R function on MDA-MB-435s metastases, taking advantage of the zebrafish as a model to study the invasive and metastatic behaviour of human tumour cells (Marques *et al.*, 2009). First, we validated this model by comparing the ability of highly invasive MDA-MB-435s cells with

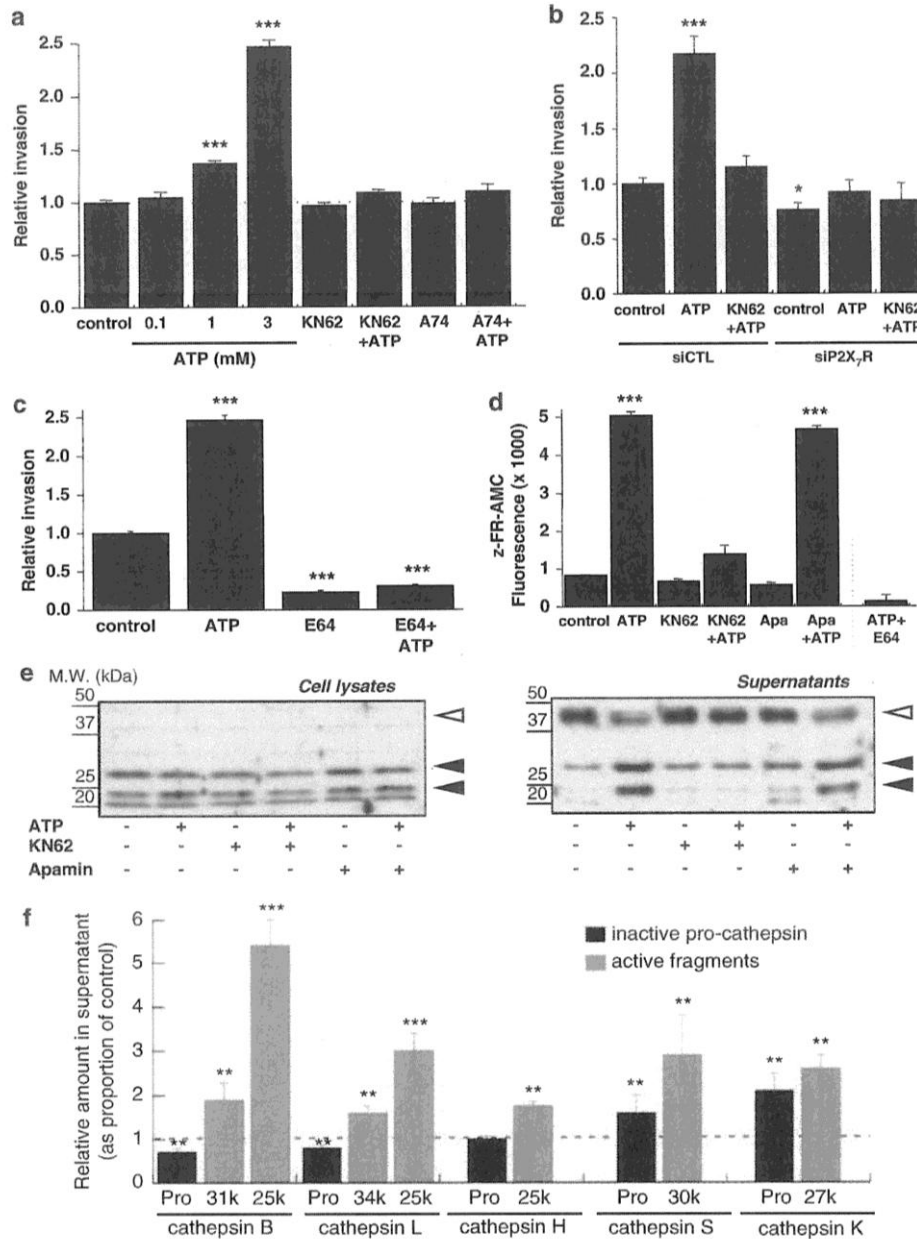


Figure 6 Involvement of P2X₇R in the cysteine cathepsin-dependent MDA-MB-435s cells invasiveness. **(a)** Relative wild-type MDA-MB-435s cell invasion through Matrigel-coated inserts, in absence (control) or in presence of increasing doses of ATP (0.1; 1 and 3 mM) or hP2X₇R antagonists KN62 (1 μ M) or A740003 (A74, 300 nM). The figure represents results from eight independent experiments. **(b)** Same invasion experiments were performed on MDA-MB-435s cancer cells transfected with siRNA directed against P2RX7 mRNA (siP2X7) or scramble siRNA-A as a control (siCTL), in control condition (no ATP), or in presence of 3 mM ATP with or without 1 μ M KN62 ($n=3$ independent experiments). **(c)** Relative wild-type MDA-MB-435s cell invasion through Matrigel-coated inserts, in presence or not of the broad-spectrum cysteine cathepsin inhibitor E-64 (100 μ M) in presence or not of 3 mM ATP ($n=4$ independent experiments). **(d)** Enzymatic assay performed on cell-free concentrated supernatants (in sodium-acetate buffer pH5.5, containing 2mM dithiothreitol, and 2mM EDTA) in the presence of the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC (40 μ M) specific for cysteine cathepsins after incubating cells for 24 h with ATP (3 mM) in presence or not of 1 μ M KN62 or 1 nM Apamin (Apa). Specificity of the cysteine cathepsin-dependent substrate hydrolysis was checked by preincubating the sample from ATP-stimulated condition with E64 (100 μ M) ($n=3$ independent experiments). **(e)** Western blot analyses for cathepsin B in wild-type MDA-MB-435s cells lysates or concentrated cell-free supernatants after 24 h treatment with ATP (3 mM) in presence or not of KN62 (1 μ M) and Apamin (1 nM). Different forms of cathepsin B are detected: the proform (46 kDa, white arrow) and the two active forms, single-chain (31 kDa, SC) and double chain (24–25 kDa, DC) indicated by black arrows. **(f)** Relative amounts of proforms (Pro) and active forms of cathepsins B, L, H, S and K in supernatants of wild-type cells stimulated for 24 h treatment with ATP (3 mM). Amounts of cathepsins were calculated from densitometric analyses from western-blot experiments using the software Quantity One (Bio-Rad) and expressed as a proportion of the control condition without ATP. Statistics were done using a Mann–Whitney rank sum test. Statistically different from control condition at * $P<0.05$; ** $P<0.01$. *** $P<0.001$.

poorly invasive EO33 oesophagus adenocarcinoma cell line to escape the yolk sac of zebrafish embryos. In total, 46.4% of the zebrafish embryos injected with MDA-MB-435s cells presented more than three cells outside of the yolk sac 48 h after injection, whereas only 25.9% of the embryos presented metastases after injection of EO33 cells (Figure 7a). These differences in metastases correlated with P2X₇R expression levels, MDA-MB-435s cells expressed almost 200 more times P2X₇R transcript than EO33 cells (Figure 7b). Treatment with selective P2X₇R antagonist A-438079 was able to significantly reduce the number of zebrafish embryos with metastases after injection of MDA-MB-435s cells

(Figures 7a and c), but did not affect the invasive *in vivo* behaviour of EO33 cells (Figure 7a).

Discussion

P2X₇R is an intriguing receptor from which pharmacological activation is generally associated to cytotoxic effects (Surprenant *et al.*, 1996; Di Virgilio *et al.*, 1998) therefore leading to the hypothesis that their overexpression or stimulation could be deleterious for cells. Surprisingly, it was found that P2X₇R is expressed at very high levels in several tumours, compared with

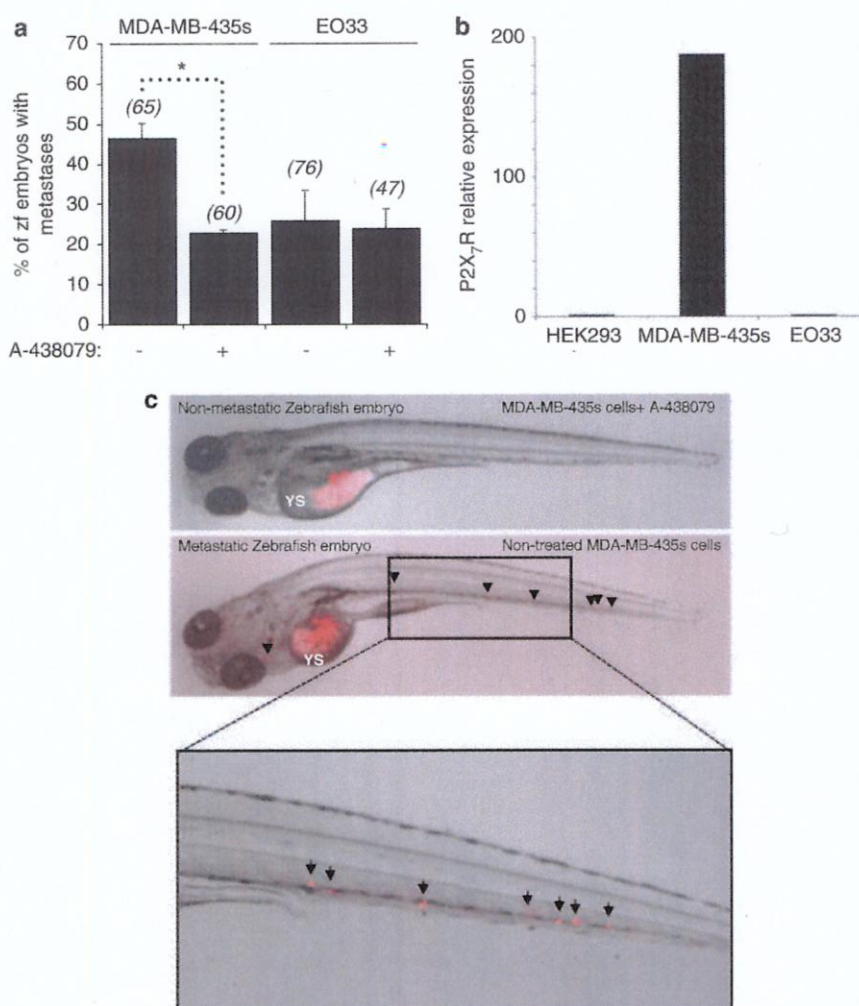


Figure 7 P2X₇R-dependent *in vivo* invasion of MDA-MB-435s cells from the yolk sac of zebrafish embryos. **(a)** Percentage of zebrafish embryos with more than three cells outside the yolk sac, representing the *in vivo* invasiveness capacity of MDA-MB-435s and EO33 cancerous cell lines treated or not with 10 μ M of A-438079 P2X₇R antagonist. Histogram represents the mean value of metastasis percentage $\pm$ s.e.m. from a total of embryos stated in the figure for each treatment coming from three different experiments ($n=3$). Statistically different from control condition using *t*-test at $*P<0.05$. **(b)** Quantitative RT-PCR for P2X₇R in HEK293, MDA-MB-435s and EO33 cells; data is normalized to GAPDH and relative to HEK293 expression level. **(c)** Representative images of a zebrafish embryo with no metastases where the labelled antagonist-treated MDA-MB-435s cells remained in the yolk and never invaded the embryo (upper panel) and an embryo with metastases where the non-treated MDA-MB-435s cells invaded, migrated and formed distant micrometastases (middle panel, arrowheads). Magnification of the tail region of an embryo with metastasis is shown in the lower panel.

normal tissues (Adinolfi *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Slater *et al.*, 2004a, b; Wang *et al.*, 2004a; Raffaghello *et al.*, 2006; Deli *et al.*, 2007; Solini *et al.*, 2008) and was even proposed to represent an early cancer marker (Slater *et al.*, 2005). In fact, among all cancer types tested, cervical cancer is the only exception to our knowledge with a decreased expression of P2X₇R in cancer cells (Li *et al.*, 2006). Contrarily to initial assumptions, P2X₇R were reported to have anti-apoptotic effects (Deli *et al.*, 2007) and even to promote cell growth (Adinolfi *et al.*, 2005; Raffaghello *et al.*, 2006; Di Virgilio *et al.*, 2009) in some cancer cells. All these studies mainly focused on the regulation of cell proliferation/apoptosis and other important parameters such as cancer cell invasiveness were not assessed.

In this study, we showed, for the first time to our knowledge, the expression and full characterisation of functional ATP-gated P2X₇R in highly invasive breast cancer cells (P2X₇R-current, Ca²⁺ influx and dye uptake). We showed that very high concentrations of ATP (>3 mM) could be responsible for mild P2X₇R-dependent cell death, but more importantly that smaller concentrations still activating P2X₇R (1–3 mM), were responsible for morphological changes leading to the acquisition of a pro-migratory phenotype and no membrane blebbing. The formation of cellular prolongations and cell migration were found to be dramatically potentiated under P2X₇R stimulation through the activation of Ca²⁺-activated potassium channels SK3. This activation of SK3 channels is most probably resulting from the increase of the internal calcium concentration. We also investigated the regulation of invasive properties, which are taking into account the proteolytic disruption of the extracellular matrix. Our results indicated that P2X₇R activation enhanced cancer cell invasiveness *in vitro* and *in vivo*, through the increase of active forms of external proteases.

Most dramatic results on cellular extension, cell migration and invasiveness were obtained after P2X₇R stimulation with millimolar concentrations of extracellular ATP. These very high concentrations of external ATP are known to occur in tumours, particularly at the vicinity of necrotic areas (Raffaghello *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004b), whereas it is undetectable in normal tissues (Pellegatti *et al.*, 2008). However, the use of antagonists (KN62 or A740003) or siP2X₇R in basal conditions, without applying ATP, were responsible for small reductions of these three parameters. These results raise the possibility of a constitutive activity of P2X₇R in cancer cells. One possible explanation for this could be the tonic release of ATP by cancer cells responsible for autocrine/paracrine regulations. Indeed, P2X₇R have already been demonstrated to be responsible for trophic activities on different cell types, including cancer cells, in the absence of ATP stimulation (Adinolfi *et al.*, 2005, 2010; Di Virgilio *et al.*, 2009). Alternatively, one other hypothesis could be a basal, channel-independent, activity of the receptor in the complete absence of any purinergic stimulation. This aspect will have to be further clarified.

Although there are five catalytic types (aspartic, cysteine, metallo, serine and threonine) of proteases

that can degrade the extracellular matrix, we showed that the basal as well as the P2X₇R-dependent invasiveness of MDA-MB-435s cells were mainly due to the activity of cysteine cathepsins. Cathepsins were initially characterized as specific lysosomal markers, and the release of mature forms in the extracellular compartment was observed from epithelial cells (Rodriguez *et al.*, 1997) as well as immune cells (Lopez-Castejon *et al.*, 2010) and proposed to be mainly due to lysosomal exocytosis. These proteases are often upregulated in various human cancers including breast cancer and are implicated in numerous tumorigenic processes, such as invasion and metastasis (Mohamed and Sloane, 2006). They are known to be extracellularly active, even if the events leading to their extracellular secretion or activation are not well understood. Importantly, we confirm in this study that high amounts of immature forms of cathepsins are tonically released by cancer cells at much higher contents than active forms, which as already been reported (Roshy *et al.*, 2003; Gillet *et al.*, 2009). These cathepsins might be constitutively extruded from cellular compartments different from lysosomes, from which it is expected to only find active forms. We showed that stimulating P2X₇R in cancer cells led to the increase of mature forms of all cysteine cathepsins tested and to the increase of matrix invasion. This phenomenon seemed to be completely independent on the SK3 channels activation and might represent a P2X₇R-dependent inducible secretion/or activation pathway. We can observe that cathepsins S and K proforms and active forms were increased upon P2X₇R activity. In contrast, only cathepsins B and L mature forms were increased, concomitantly to the reduction of proforms, after ATP stimulation. Indeed, we can hypothesize that there are two different pools of P2X₇R-regulated cathepsins. Although the first pool of proteases (containing cathepsins S and K) could come from a P2X₇R-regulated release pathway, the second pool of cathepsins (B and L) could be extracellularly matured. One possible explanation is the P2X₇R-dependent activation or release of a protease that cleaves pro-forms of cathepsins B and L into active forms in the extracellular space.

Interestingly, the expression of other ion channels have been shown to be deregulated in cancer compared with non-cancer cells, among them are voltage-gated sodium channels (Roger *et al.*, 2006). These channels have also been demonstrated to enhance the cysteine cathepsin-dependent invasiveness of breast cancer cells through the sodium influx (Gillet *et al.*, 2009). P2X₇R being non-specific cation-permeant channels, this raises the question of a possible involvement of internal sodium in the regulation of cathepsins activity/release and in the invasiveness of cancer cells.

In addition, we used the zebrafish model to study the *in vivo* invasive properties of MDA-MB-435s cancer cells (Marques *et al.*, 2009). Pharmacologically targeting of P2X₇R with selective inhibitor A-438079 decreased the metastases rate of MDA-MB-435s cells from the yolk sac of zebrafish embryos, but did not altered metastases rate of a non-expressing P2X₇R cancer cell

line, confirming the *in vivo* involvement of P2X₇R in the invasiveness properties of MDA-MB-435s.

In conclusion, we have shown a new oncogenic role for P2X₇R in the migration and cathepsin-dependent invasiveness of cancer cells. These phenomenon are critical for cancer cell spreading in tissues and therefore to the development of metastases. As such, P2X₇R could be considered as an important invasiveness promoter and might represent a new target for anti-metastatic agents.

Materials and methods

Cells and culture

Human MDA-MB-435s breast cancer cells and EO33 oesophageal adenocarcinoma cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium, supplemented with 5% foetal calf serum. The immortalized normal mammary epithelial cell lines MCF-10A and 184A1 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12, 1:1 mix containing 5% horse serum (Invitrogen, Illkirch, France), insulin (10 µg/ml), epidermal growth factor (20 ng/ml), hydrocortisone (0.5 µg/ml), and, for MCF-10A and 184A1, 100 ng/ml cholera toxin and 1 ng/ml cholera toxin plus 5 µg/ml transferrin, respectively. Cell lines were from the American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, France). Human Mammary Epithelial Cells are long-term primary culture of non-cancerous mammary epithelial cells, maintained in an adapted mammary epithelial growth medium (MEGM Bullet kit, Cambrex, East Rutherford, NJ, USA). Human Embryonic Kidney (HEK293) cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's F12 medium, supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum and 2 mM L-glutamine. All cell types were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Zebrafish maintenance and *in vivo* zebrafish metastatic assays
Zebrafish (*Danio rerio*) AB, from the Zebrafish International Resource Centre, was maintained in re-circulating tanks according to standard procedures ('The zebrafish handbook: a laboratory use of zebrafish, *Brachydanio rerio*'). Adult fish were maintained at 26°C, with a light/dark cycle of 14/10 h and were fed twice daily, once with dry flake food (PRODAC, Malaga, Spain) and once with live artemia (MC 450, IVE AQUACULTURE, INVE Aquaculture, Vigo, Spain). Zebrafish embryos were maintained in egg water at 28.5°C, fed during 5 days with NOVO TOM and with live artemia at 11 days of life. The experiments performed comply with the Guidelines of the European Union Council for animal experimentation (86/609/EU) and were approved by the Bioethical Committee of the University Hospital Virgen de la Arrixaca.

MDA-MB-435s or EO33 cells were trypsinized, washed and stained with the vital cell tracker red fluorescent CM-Dil (Vibrant, Invitrogen). Labelled cells were incubated for 30 min with 10 µM of the specific P2X₇R antagonist A-438079 (Tocris, Bristol, UK) or vehicle (DMSO), centrifuged, resuspended in 67% of DPBS, 5 fetal calf serum, 0.05% Phenol Red and injected into the yolk sac of dechorionated zebrafish embryos using the method described in Marques *et al.*, 2009. Briefly 100–150 labelled cells in 4 nl were injected into the yolk sac of zebrafish embryos using a manual injector (Narishige, East Meadow (Long Island), NY, USA). Fish with fluorescent cells outside the implantation area at 2 h were excluded from

further analysis. All other fish were incubated at 35°C for 48 h and analyzed with a SteReo Lumar.V12 stereomicroscope with an AxioCam MR5 camera (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA). Evaluation criteria for invasion were that at least three cells had to be identified outside of the yolk. Injection of A-438079 or DMSO vehicle into the yolk sac of zebrafish embryos did not affect the development of the fish and did not affect the viability of MDA-MB-435s or EO33 cells.

Small interfering RNA transfection and small hairpin RNA

MDA-MB-435s breast cancer cells were transfected with siRNA directed against P2RX7 mRNA (siP2X7) or scramble siRNA-A as a control which were purchased from Tebu-Bio (Le Perray en Yvelines, France). Cells were transfected with 20 nM siRNA by using Lipofectamine RNAi max (Invitrogen). Experiments were performed 24 h after transfection.

To inhibit SK3 channel expression, we constructed a lentiviral vector encoding a short hairpin RNA (shRNA) specifically targeting the human *KCa2.3* gene as using the same protocol than already reported, but adapted to breast cancer cells (Chantome *et al.*, 2009). Briefly, the sequence encoding shSK3 was obtained by PCR elongation of two partially complementary primers; this also allowed us to introduce two restriction enzyme sites to facilitate manipulations. Forward primer: shSK3-BamH I 5'-ggATCCCCCCTTCCTggCgAgTACAATTCAAgAgATT-3'; shSK3-Hind III 5'-AAgCTTAAACCATTCCTggCgAgTACAATCTCTTgAATT-3', as a reverse primer. The underscored sequences are complementary. For control experiments, following the same protocol as above, we constructed a lentiviral vector expressing an untargeted shRNA (pLenti-shRdm). For this, we used the following primers, shRD1_S: 5'-ggATCCCCgCCgACCAATTCACggCCgTTCAAgAgACg-3' and shRD1_AS: 5'-AAgCTTAAAAAGCCgACCAATTCACggCCgTCTCTTgAACg-3'. These experiments resulted in two cell lines: MDA-MB-435s shSK3 and MDA-MB-435s shRdm.

Electrophysiological recording

Electrophysiological recordings were performed in the whole cell configuration of the patch clamp technique as already reported (Roger *et al.*, 2008). Patch pipettes were pulled from borosilicate glass (WPI, Stevenage, UK) to a resistance of 4–6 MΩ. Currents were recorded under voltage-clamp mode using a MultiClamp 700A patch clamp amplifier (Axon Instrument, Foster City, CA, USA) and analogical signals were filtered at 10 kHz and digitized using a 1322A Digidata converter. Cell capacitance and series resistances were electronically compensated. Membrane potential was held at –60 mV. Experiments were performed at room temperature (20–25 °C) in a standard external physiological saline solution (PSS) and pipettes were filled with different intracellular solutions (see Solutions). Agonists (Adenosine 5'-triphosphate, ATP; or 2',3'-O-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP, Bz-ATP) were externally applied using a RSC200 fast-flow delivery system (BioLogic Science Instruments, Claix, France) for 10 s, at the concentration indicated in Figure legends. For the facilitation protocol, numerous 10-s long applications of 5 mM ATP were performed, separated by 40-s intervals in normal PSS. Human P2X₇R antagonists (KN62 and A740003) were perfused into the bath for 2 min before recording their effect in presence of 5 mM ATP. Concentration-response curves to agonists were realized by first obtaining a maximum response to 10 mM agonist and then by applying decreasing concentrations of agonist, before or after full P2X receptors facilitation (as indicated in Figure Legends). Concentration-responses curves were plotted using Origin Microcal 6.0 software (Microcal Software Inc.,

Northampton, MA, USA) and EC₅₀ were defined using the Sigmoidal equation provided by this software. Current amplitudes were normalized to cell capacitances and expressed as current densities (pA/pF).

Solutions

The external PSS had the following composition (in mM): 147 NaCl, 10 *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2ethansulphonic acid (HEPES), 13 D-Glucose, 2 KCl, 2 CaCl₂ and 1 MgCl₂. Agonist and antagonist solutions were prepared in PSS at the concentrations indicated in the figure legends. The intracellular solution had the following composition (in mM): 147 NaCl, 10 HEPES and 10 ethylene glycol-bis-(2-aminoethyl ether)-*N*, *N*, *N'*, *N'*-tetraacetic acid (EGTA). Osmolarity and pH values were 295–315 mOsm and 7.3, respectively. The loading buffer for Fluo-4AM calcium measurements had the following composition (in mM): 136 NaCl, 1.8 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 5 NaHCO₃, 2 CaCl₂ and 1.2 MgSO₄, 20 HEPES, 6 D-Glucose and 5 EGTA.

Reverse transcription PCR (RT-PCR) and quantitative RT-PCR analysis

Reverse transcription PCR experiments were done according to standard protocols. Total RNA extractions from MDA-MB-435s were performed using RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), followed by reverse transcription using SUPERScript III (Invitrogen) RNAse H-reverse transcriptase with oligo-dT. Specific primers for human P2X₁₋₇ and P2Y receptors were used in PCR (see Table 1). The efficacy of these primers was checked with corresponding hP2X/hP2Y receptor complementary DNA in pcDNA3.1 plasmids (Supplementary Figure 1a, bottom panel and supplementary Figure 2b, bottom panel). The temperature profile for PCR was 1 min at 94 °C followed by amplification for 30 cycles which consisted of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 1 min at 72 °C and a final extension for 5 min at 72 °C. PCR products were then analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel containing ethidium bromide, and visualized by UV transillumination. Detailed methods used for qRT-PCR have been described previously (Pelegri and Surprenant, 2006). Specific primers were purchased from Qiagen (QuantiTech Primer Assays), for each primer set the efficiency was >95% and a single product was seen on melt curve analysis. Relative gene expression levels were calculated using the 2^{-ΔΔC_t} method

normalizing to GAPDH expression levels and the fold differences in expression was relative to HEK293 cells expression level.

Western blotting

Western blot experiments for cystein cathepsins detection were performed on MDA-MB-435s cell lysates and concentrated supernatants. Cells were grown to 80% confluence in a six-well plate. After 24 h treatment (ATP or/and antagonists) in Optimem medium (Invitrogen), cell supernatants were taken and concentrated using 10000 MWCO filters (Millipore, Billerica, MA, USA). Cells were washed twice in phosphate-buffered saline then lysed in RIPA buffer (20 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ and 1 mM CaCl₂) with 1% Triton X-100 and supplemented complete protease inhibitor cocktail (Roche, Welwyn Garden City, UK) for 1 h at 4 °C. Cell lysates were then centrifuged at 16,000 *g* for 10 min to pellet debris. Total protein samples were removed and assayed for protein content using the Bio-Rad Protein Assay kit (Bio-Rad, Bath, UK). Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer was added and the samples were boiled for 4 min at 100 °C. Samples were loaded (5 μg of total proteins for cell lysates and 6 μl of concentrated supernatants) and electrophoretically separated on 12% polyacrylamide gels and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Western blotting was performed to standard protocols and cathepsin proteins were visualized using polyclonal rabbit anti-human cathepsin *B* primary antibodies (1/1,000, Fitzgerald, North Acton, MA, USA), polyclonal rabbit anti-human cathepsin *S* primary antibodies (1/5,000, Calbiochem, Nottingham, UK), polyclonal rabbit anti-human cathepsin *L* primary antibodies (1/2,000, Calbiochem), polyclonal rabbit anti-human cathepsin *K* primary antibodies (1/2,000, Calbiochem) and a goat anti-rabbit horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1/5,000). To study SK3 and P2X₇R proteins, 40 μg of total proteins were loaded then analysed using rabbit polyclonal anti-SK3 channels (1/250, Sigma-Aldrich, L'Isle d'Abeau, France) or a rabbit polyclonal anti-P2X₇ antibody (1/200, Alomone, Jerusalem, Israel) then secondary goat anti-rabbit-HRP-conjugated antibodies (1/1,000, Tebu-Bio). β-actin, GAPDH and HSC70 proteins were used for loading control experiments and were immunodetected using anti-β-actin-HRP conjugated (1/1,000, Tebu-Bio), mouse anti-GAPDH (1/2,000, Sigma-Aldrich) and mouse

Table 1 Primers used for the determination of human purinergic receptor mRNA expressed in cancer cell lines and predicted sizes of amplified fragments

Gene name	Forward primer 5'–3'	Reverse primer 5'–3'	Predicted size of amplified fragments (bp)
P2RX1	TTTCATCGTGACCCGAAGCAG	TCAAAGCGAATCCCAACACC	633
P2RX2	ACCTGCCCGAGAGCATAAG	AATGACCCCGATGACACCACCC	426
P2RX3	CACCTCGGTCTTTGTCATCATCAC	TGTTGAACCTTGCCAGCATTCC	695
P2RX4	ACAGCAACGGAGTCTCAACAGG	CCTTCCCAAAACAATGATGTCG	561
P2RX5	AACCTGATTGTGACCCCAACC	TCGCAGAAGAAAGCACCCCTGC	683
P2RX6	GGTGACCAACTCTTGTCGACG	CCCAGTGAACCTGTGCTACACG	476
P2RX7	TGCGATGGACTTCACAGATTGG	TGCCCTTCACTCTTCGGAAAC	465
P2Y1R	CCGGCTGTCTACATCTTGGT	GGCAGAGTCAGCACGTACAA	152
P2Y2R	CCACCTGCCTTCTCACTAGC	TGGGAAATCTCAAGGACTGG	163
P2Y4R	TGCCTGGTCACTCTTGTTTG	GTACTCGGCAGTCAGCTTCC	205
P2Y6R	CGACCACATGAGCTCCTACA	GAGCTTCTGGGTCTCTGTGAG	198
P2Y11R	AGGGCAAAGTGATGTTCCAC	CCCTCCAGGCTCTTCTTTCT	175
P2Y12R	AACTGGGAACAGGACCACTG	ACATGAATGCCAGATGACA	201
P2Y13R	TCGTGGCTGTCTCTTTGTG	TTTCTTGGCTTGATGCTGTG	249
P2Y14R	TTAAAGGCCTCTGCCTTCA	AGAGCTGGGCACGTAAAAGA	190

anti-HSC70 (1/30,000 Tebu-Bio), respectively. Protein detection was done using the electrochemiluminescence (ECL)-plus kit (Amersham, Pantin, France) and Kodak Bio-Mark MS films (Sigma-Aldrich).

Fluo-4AM and ethidium uptake assays

Changes in free internal calcium concentration were measured with the fluorescent indicator Fluo-4AM. A Nikon confocal microscope with Fluor x20 objective (Nikon, Kingston upon Thames, UK) was used. Cells plated onto 13 mm coverslips were loaded for 30 min at 37°C with 1 µM Fluo-4AM and 0.02% pluronic acid in a loading buffer (see Solutions). Excess dye was removed by rinsing the cells twice with PSS. Cells were then incubated for an additional 10 min in PSS. Cells were superfused (2 ml/min) at concentrations indicated in figure legends. Images were acquired at 4 s intervals; numerous cells in a field of view were measured for 800 s and averaged from three separate experiments to obtain the mean Fluo-4 fluorescent signal. To measure ethidium uptake, ethidium bromide (25 µM) was added to superfusion solutions. Images were acquired at 6 s intervals for 900 s.

Cell survival and morphology

To assess the cell survival, 2×10^5 cells were seeded per well in six-well plates in a control culture medium or in presence of different concentrations of ATP/inhibitors, and were grown for 24 h. Cell numbers were assayed by the tetrazolium salt assay as previously described (Gillet *et al.*, 2009). Cell survival was expressed as formazan 492 nm absorbance and expressed as a ratio by comparison with the control condition, in the absence of drug or ATP (on the same day of the experiment). Results were validated by manual cell counting. Three independent experiments were performed. The analysis of cell morphology was done using the ImageJ software 1.38I (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). They were considered as 'cellular extensions' and counted only cell projections showing a size bigger than the cell body.

Cell migration and cell invasiveness assays

Cell migration was analyzed, in 24-well plates receiving 8 µm pore size polyethylene terephthalate membrane cell culture inserts (VWR International, Leuven, Belgium). The upper compartment was seeded with 2×10^4 viable cells in their basal culture medium. The lower compartment was filled with their culture medium supplemented with 10% fetal calf serum, instead of 5%, as a chemoattractant. After 24 h at 37°C, cells that had migrated and were attached to the lower side were stained with haematoxylin and counted, using a light microscope. Cell invasiveness was assessed using the same inserts as above, but with the membrane covered with a film of Matrigel (Collaborative Research, Le Pont de Claix, France). In that case, 4×10^4 viable cells were seeded in the upper compartment. Cell migration and invasiveness assays were performed in triplicates in 3–8 separate experiments. For easier comparison, results obtained for migration and invasion were normalized to the control condition in absence of drug or ATP.

Confocal microscopy

MDA-MB-435s cells were cultured on glass coverslips covered with a film of Matrigel (Becton Dickinson) for 24 h then treated with 3 mM ATP in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% fetal calf serum for 24 h. Cells were then fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde and permeabilized by incubation for 15 min in 0.1% triton-X-100

in phosphate-buffered saline at room temperature. Unspecific sites were saturated by incubating for 30 min with 3% bovine serum albumin and 3% normal goat serum in phosphate-buffered saline. F-actin was stained by incubating the cells for 60 min with Alexa Fluor 594 phalloidin (1/200, Invitrogen). Confocal microscopy was performed with an Olympus Fluoview 500 microscope (Olympus, Southend-on-Sea, UK).

Cysteine cathepsin activity assays

Supernatants of MDA-MB-435s cancer cells incubated for 24 h in the presence of ATP and/or other drugs were concentrated as described above. The fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC (Z standing for benzyloxycarbonyl and AMC for 7-amino-4-methyl coumarine, 40 µM) was used to measure proteolytic activities of cysteine cathepsin enzymes. The activation buffer for cysteine cathepsins was 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.5, containing 2 mM EDTA and 2 mM dithiothreitol. After activation in the assay buffer for 5 min, kinetic measurements were continuously recorded with the microtiterplate reader at 30°C with $\lambda_{exc} = 335 \pm 60$ nm and $\lambda_{em} = 460 \pm 35$ nm (Packard Instrument company, Meriden, CT, USA). Specificity of the cysteine cathepsin-dependent hydrolysis was verified by preincubating the samples with E64 (L-3-carboxy-trans-2, 3-epoxy-propionyl-leucylamide-(4-guanido)-butane, 100 µM).

Data analysis and statistics

Average results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. from the number of cells or essays indicated in the figure legends. Statistical analyses, were performed using SigmaStat 3.0.1a (Systat software Inc., Chicago, IL, USA), were made using Student's *t*-tests. Alternatively, Mann-Whitney rank sum tests were used when the variance homogeneity test failed. Statistical significance is indicated as: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Chemicals, antibodies and drugs

ATP, BzATP, ADP, UTP, salts and chemicals for the solutions, apamin, ethidium bromide were obtained from Sigma-Aldrich. KN62, E64 and Z-Phe-Arg-AMC were coming from Calbiochem. Fluo-4AM was obtained from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). The P2X₇R antagonist A740003 is a generous gift from Dr M Jarvis (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) and the A438079 was purchased from Tocris (Bristol, UK).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgements

We thank Pr Jean-Christophe Pagès, Dr Christine Collin and Dr Virginie Joulin for the development of small hairpin RNA cell lines, Elizabeth Martin, Mari C. Baños, Encarnación Sánchez and Isabelle Domingo for technical assistance. We are grateful to Pr Gilles Lalmanach for helpful discussions and Pierre-Yves Sizaret for his help with confocal microscopy. We thank Dr Michael Jarvis (Abbott Laboratories, USA) for the generous gift of A740003. This work was supported by the Biotechnology and Biological Sciences Research Council, by a grant from the 'Ligue Nationale Contre le Cancer—Région Centre', the 'Association CANCEN', the

'Ministère de la Recherche et des Technologies', the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' (INSERM) and the 'Partenariat Hubert Curien—Alliance' from the

French Foreign and European Ministry and the French Embassy in the United Kingdom. A C was funded by the 'Institut National du Cancer (INCa)'.

References

- Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, Bolognesi C, Minelli M, Wieckowski MR et al. (2005). Basal activation of the P2X₇ ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol Biol Cell* **16**: 3260–3272.
- Adinolfi E, Cirillo M, Woltersdorf R, Falzoni S, Chiozzi P, Pellegatti P et al. (2010). Trophic activity of a naturally occurring truncated isoform of the P2X₇ receptor. *Faseb J* **24**: 3393–3404.
- Adinolfi E, Melchiorri L, Falzoni S, Chiozzi P, Morelli A, Tieghi A et al. (2002). P2X₇ receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood* **99**: 706–708.
- Burnstock G. (2006). Purinergic signalling. *Br J Pharmacol* **147**: S172–S181.
- Cabrini G, Falzoni S, Forchap SL, Pellegatti P, Balboni A, Agostini P et al. (2005). A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X₇ receptor of human leukemic lymphocytes. *J Immunol* **175**: 82–89.
- Chantome A, Girault A, Potier M, Collin C, Vaudin P, Pages JC et al. (2009). KCa2.3 channel-dependent hyperpolarization increases melanoma cell motility. *Exp Cell Res* **315**: 3620–3630.
- Deli T, Varga N, Adam A, Kenessey I, Raso E, Puskas LG et al. (2007). Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int J Cancer* **121**: 55–65.
- Di Virgilio F, Chiozzi P, Falzoni S, Ferrari D, Sanz JM, Venketaraman V et al. (1998). Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ* **5**: 191–199.
- Di Virgilio F, Ferrari D, Adinolfi E. (2009). P2X₇: a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal* **5**: 251–256.
- Donnelly-Roberts DL, Jarvis MF. (2007). Discovery of P2X₇ receptor-selective antagonists offers new insights into P2X₇ receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br J Pharmacol* **151**: 571–579.
- Egeblad M, Werb Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **2**: 161–174.
- Frosch BA, Berquin I, Emmert-Buck MR, Moin K, Sloane BF. (1999). Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B. *Apmis* **107**: 28–37.
- Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P et al. (2009). Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J Biol Chem* **284**: 8680–8691.
- Gupta GP, Massague J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* **127**: 679–695.
- Hibell AD, Kidd EJ, Chessell IP, Humphrey PP, Michel AD. (2000). Apparent species differences in the kinetic properties of P2X₇ receptors. *Br J Pharmacol* **130**: 167–173.
- Jedezsko C, Sloane BF. (2004). Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem* **385**: 1017–1027.
- Li X, Zhou L, Feng YH, Abdul-Karim FW, Gorodeski GI. (2006). The P2X₇ receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**: 1906–1913.
- Lopez-Castejon G, Theaker J, Pelegrin P, Clifton AD, Braddock M, Surprenant A. (2010). P2X₇ receptor-mediated release of cathepsins from macrophages is a cytokine-independent mechanism potentially involved in joint diseases. *J Immunol* **185**: 2611–2619.
- Marques IJ, Weiss FU, Vlecken DH, Nitsche C, Bakkers J, Legendijk AK et al. (2009). Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer* **9**: 128.
- Mohamed MM, Sloane BF. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 764–775.
- North RA. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **82**: 1013–1067.
- Pelegrin P, Surprenant A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X₇ receptor. *Embo J* **25**: 5071–5082.
- Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: *in vivo* imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* **3**: e2599.
- Potier M, Joulin V, Roger S, Besson P, Jourdan ML, Leguennec JY et al. (2006). Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol Cancer Ther* **5**: 2946–2953.
- Potier M, Tran TA, Chantome A, Girault A, Joulin V, Bougnoux P et al. (2010). Altered SK3/KCa2.3-mediated migration in adenomatous polyposis coli (Apc) mutated mouse colon epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **397**: 42–47.
- Raffaghello L, Chiozzi P, Falzoni S, Di Virgilio F, Pistoia V. (2006). The P2X₇ receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res* **66**: 907–914.
- Rassendren F, Buell GN, Virginio C, Collo G, North RA, Surprenant A. (1997). The permeabilizing ATP receptor, P2X₇. Cloning and expression of a human cDNA. *J Biol Chem* **272**: 5482–5486.
- Rodriguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW. (1997). Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* **137**: 93–104.
- Roger S, Gillet L, Baroja-Mazo A, Surprenant A, Pelegrin P. (2010a). C-terminal calmodulin-binding motif differentially controls human and rat P2X₇ receptor current facilitation. *J Biol Chem* **285**: 17514–17524.
- Roger S, Mei ZZ, Baldwin JM, Dong L, Bradley H, Baldwin SA et al. (2010b). Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X₇ receptor functions. *J Psychiatr Res* **44**: 347–355.
- Roger S, Pelegrin P, Surprenant A. (2008). Facilitation of P2X₇ receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J Neurosci* **28**: 6393–6401.
- Roger S, Potier M, Vandier C, Besson P, Le Guennec JY. (2006). Voltage-gated sodium channels: new targets in cancer therapy? *Curr Pharm Res* **12**: 3681–3695.
- Roger S, Döllin J, Barascu A, Besson P, Raynal PI, Iochmann S et al. (2007). Voltage-gated sodium channels potentiate the invasive capacities of human non-small-cell lung cancer cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 774–786.
- Roshy S, Sloane BF, Moin K. (2003). Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev* **22**: 271–286.
- Shemon AN, Sluyter R, Fernando SL, Clarke AL, Dao-Ung LP, Skarratt KK et al. (2006). A Thr357 to Ser polymorphism in homozygous and compound heterozygous subjects causes absent or reduced P2X₇ function and impairs ATP-induced mycobacterial killing by macrophages. *J Biol Chem* **281**: 2079–2086.
- Slater M, Danieletto S, Barden JA. (2005). Expression of the apoptotic calcium channel P2X₇ in the glandular epithelium. *J Mol Histol* **36**: 159–165.
- Slater M, Danieletto S, Gidley-Baird A, Teh LC, Barden JA. (2004a). Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolitic P2X₇ receptors. *Histopathology* **44**: 206–215.

- Slater M, Danieleto S, Pooley M, Cheng Teh L, Gidley-Baird A, Barden JA. (2004b). Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Res Treat* **83**: 1–10.
- Solini A, Cuccato S, Ferrari D, Santini E, Gulinelli S, Callegari MG *et al.* (2008). Increased P2X₇ receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? *Endocrinology* **149**: 389–396.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science* **272**: 735–738.
- Wang Q, Wang L, Feng YH, Li X, Zeng R, Gorodeski GI. (2004a). P2X₇ receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**: C1349–C1358.
- Wang X, Arcuino G, Takano T, Lin J, Peng WG, Wan P *et al.* (2004b). P2X₇ receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med* **10**: 821–827.
- Zhang XJ, Zheng GG, Ma XT, Yang YH, Li G, Rao Q *et al.* (2004). Expression of P2X₇ in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. *Leuk Res* **28**: 1313–1322.

Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1:

A, Effect of hP2X₇ antagonists on the MDA-MB-435s whole-cell currents evoked at a holding potential of -60 mV by 5 mM extracellular ATP. Left is showing representative traces for the effect of KN62 (1 μ M), and right for the effect of A740003 (300nM). **B**, RT-PCR experiments showing the expression of mRNA only for P2Y₁₁ receptors among all P2Y receptors in MDA-MB-435s cancer cells. **C**, Relative cell viability of MDA-MB-435s cancer cells cultivated for 24 hours with increasing ATP concentrations (from 30 μ M to 5 mM, black circle) in presence or not of KN-62 (1 μ M, white square) or A740003 (300 nM, white circle). These results are averaged data from 3 independent experiments. **D**, Histograms showing the effect of transfecting MDA-MB-435s cells with siRNA directed against *P2RX7* mRNA (siP2X₇), compared to scramble siRNA-A as a control (siCTL) on the P2X₇R protein expression assessed by western blot and relativised to the expression of the control protein HSC70 (n= 4 independent experiments).

Supplementary Figure 2:

A, Histograms showing the proportion of cells exhibiting multiple cellular extensions under control condition (no ATP) or under stimulation with ATP concentrations indicated in presence or not of 1 μ M KN62 (KN) or 300 nM A740003 (A74) in wild-type cell or in cells transfected with siRNA directed against *P2RX7* mRNA (siP2X₇) or scramble siRNA-A as a control (siCTL). Statistically different from control condition at *** P<0.001. **B**, Western blot analyses of P2X₇R and SK3 proteins in lysates of cells transfected with siRNA directed against *P2RX7* mRNA (siP2X₇) or scramble siRNA-A as a control (siCTL). HSC70 was used as a control protein.

Supplementary Figure 3:

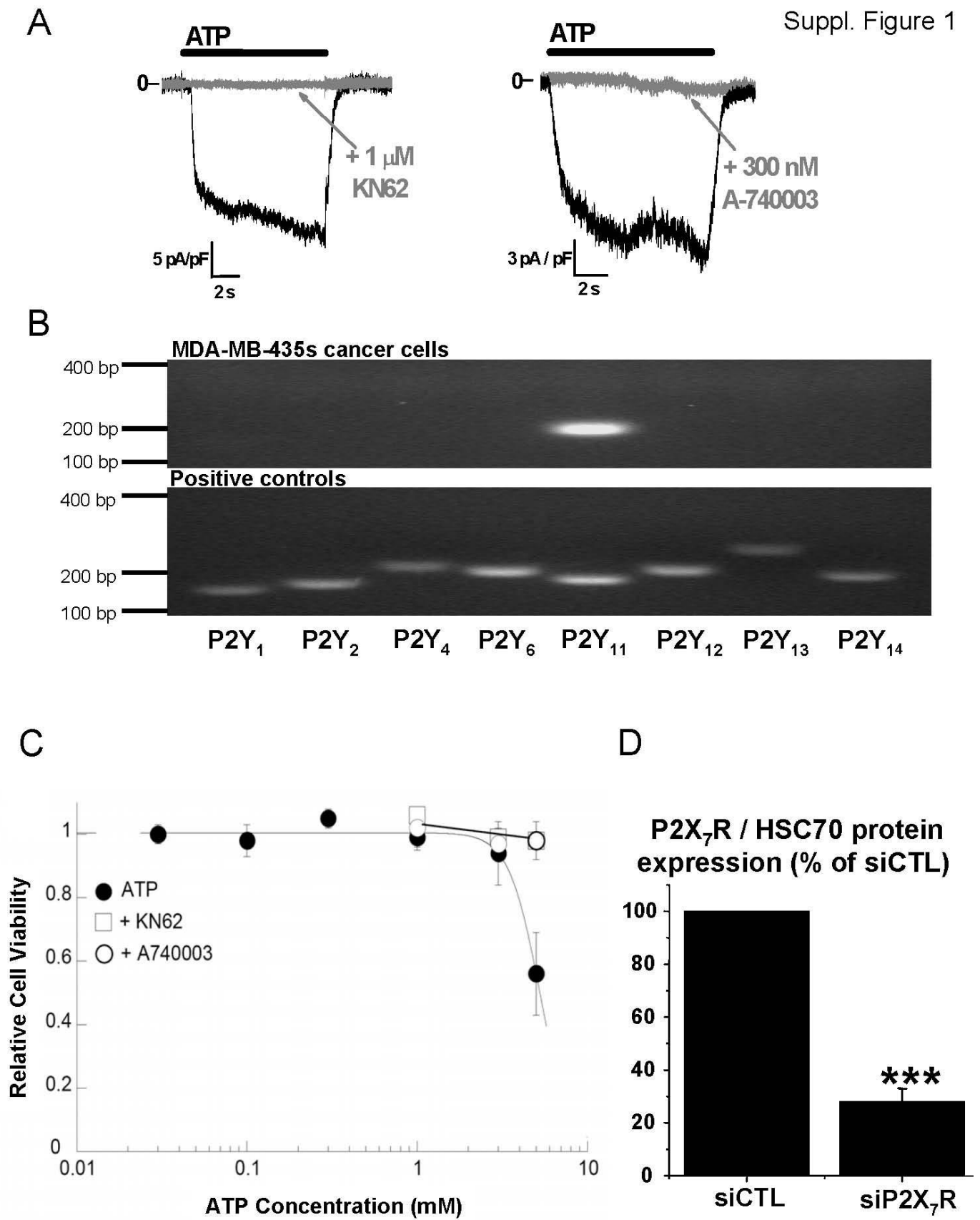
A, Representative whole-cell currents recorded in physiological saline external solution (PSS, containing in mM): 147 NaCl, 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2ethansulphonic acid (HEPES), 13 D-Glucose, 2 KCl, 2 CaCl₂ and 1 MgCl₂) or after 5 minutes stimulation with extracellular ATP (5 mM). The intrapipette solution had the following composition (in mM): 147 KCl, 10 HEPES, 1 EGTA and 0.1 CaCl₂. Currents were generated by stepwise 10-mV depolarizing pulses (500 ms-duration; 6 s intervals) from -70 to +90 mV, from a constant holding potential of -60 mV. **B**, ATP (5 mM) stimulation increases outward currents on a representative MDA-MB-435s cell, and partial inhibition by the SK_{Ca} channels blocker Apamin (1 nM). Each point represents the maximal current recorded by a voltage step from -60 to +60 mV. Voltage steps were performed with 6 s intervals.

Supplementary Figure 4:

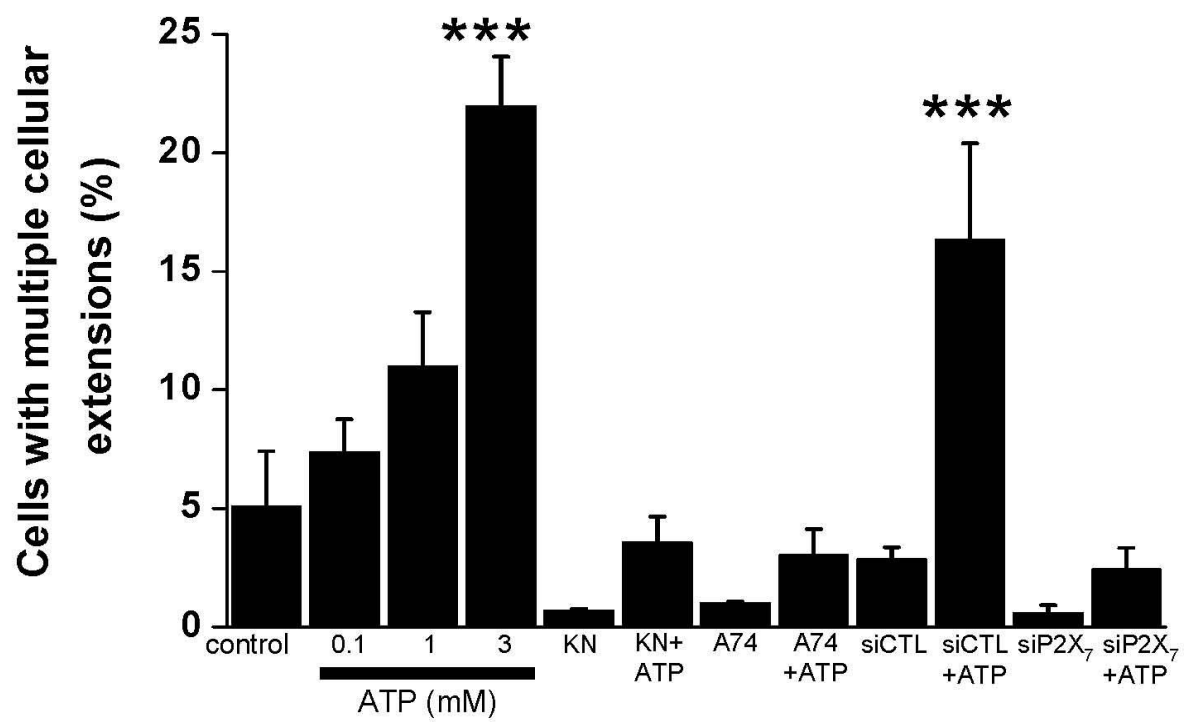
A, Western blot experiments showing the protein expression of P2X7R in A549 human lung cancer cells. 80 µg of proteins from total cell lysates were loaded and P2X7R was visualized using a rabbit polyclonal anti-P2X7 antibody (1/200, Alomone) then secondary goat anti-rabbit-HRP-conjugated antibodies (1/1,000, TebuBio). HSC70 was used for loading control experiments and was immunodetected using a mouse anti-HSC70 (1/30,000 TebuBio). Protein detection was done using the electrochemiluminescence (ECL)-plus kit (Amersham) and Kodak Bio-Mark MS films (Sigma-Aldrich). **B**, Relative invasion of A549 human lung cancer cells assessed in control condition or in presence of 3 mM ATP alone or in presence of 1 µM KN62. Cell invasiveness was analyzed, in 24-well plates receiving 8 µm pore size polyethylene terephthalate membrane cell culture inserts covered with a film of Matrigel® (Collaborative Research). The upper compartment was seeded with 4×10^4 viable cells in their basal culture medium (DMEM + 10% FCS). The lower compartment was filled with their culture medium supplemented with 20% FCS, instead of 10%. After 48 h at 37°C, cells that had invaded and were attached to the lower side were stained with haematoxylin and counted, using a light microscope. Cell invasiveness assays were performed in triplicates in 3 separate experiments. For easier comparison, results obtained for invasion were normalized to the control condition. Stimulation of cells with ATP enhanced lung cancer cells invasiveness. This effect was inhibited in presence of the P2X7R antagonist KN62 (1 µM). Statistically different from control condition at ** $P < 0.01$.

Supplementary Figure 5:

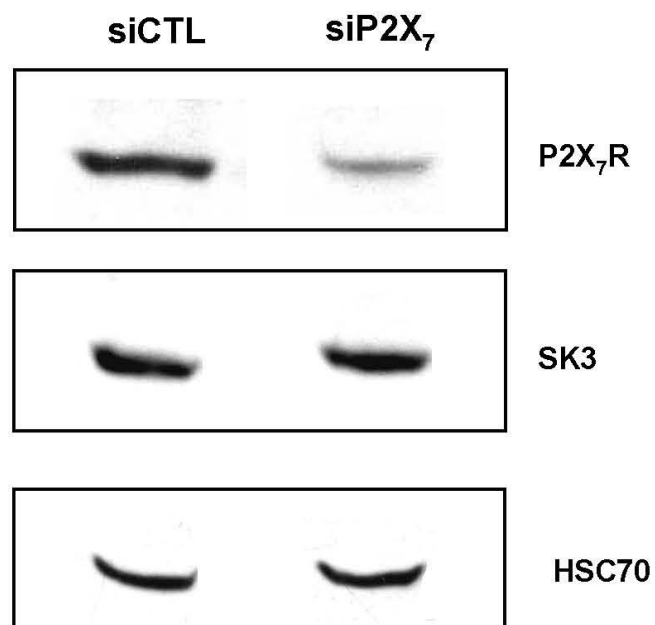
A, MDA-MB-435s cell migration in control condition or in presence of ATP (3 mM) and/or the cysteine cathepsin inhibitor E-64 (100 µM). The normalized cell migration was calculated as the ratio of the total number of migrating cells in each condition to the total number of migrating cells in the control condition. The figure represents results from 3 independent experiments. **B**, Western blot analyses for cathepsin B in cell lysate after 24 h treatment with ATP (3 mM) in presence or not of KN62 (1 µM) and Apamin (1 nM). Proforms of cathepsins are indicated by white arrows and active forms by black arrows. The exposition time was longer than in figure 5E in order to detect proforms of cathepsin B. **C**, Western blot analyses for cathepsin L, H, S and K in MDA-MB-435s cells lysates or concentrated cell-free supernatants after 24 h treatment with ATP (3 mM) in presence or not of KN62 (1 µM) and Apamin (1 nM). Proforms of cathepsins are indicated by white arrows and active forms by black arrows.



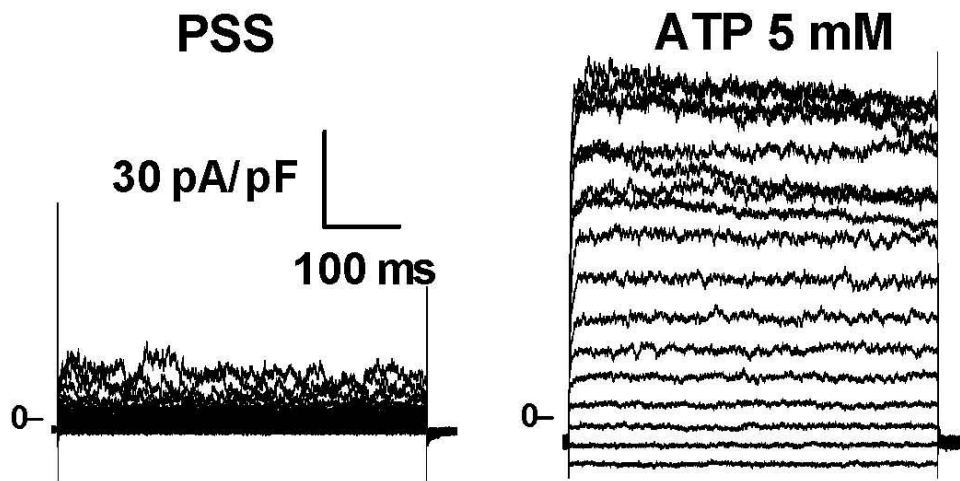
A



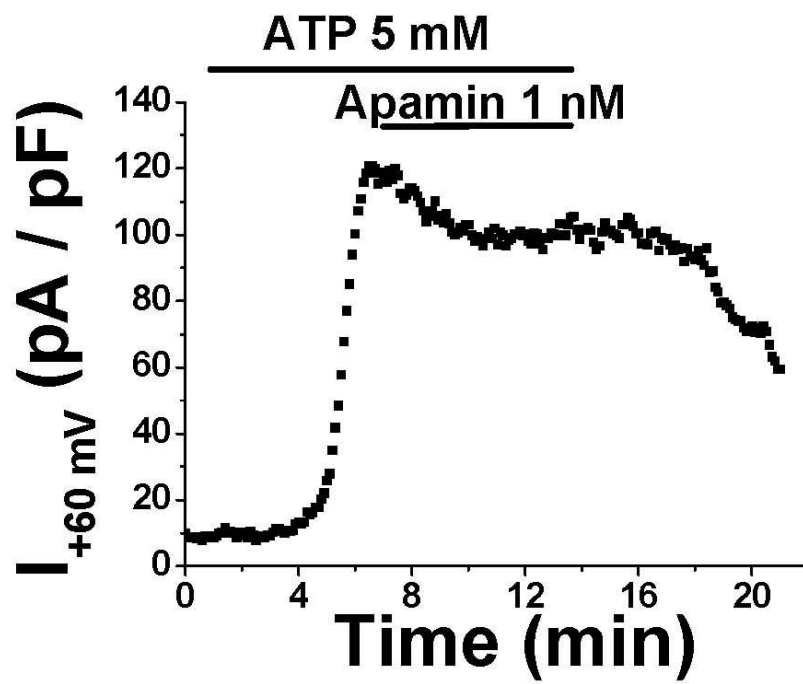
B



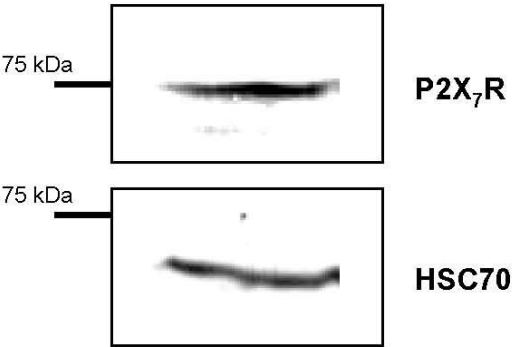
A



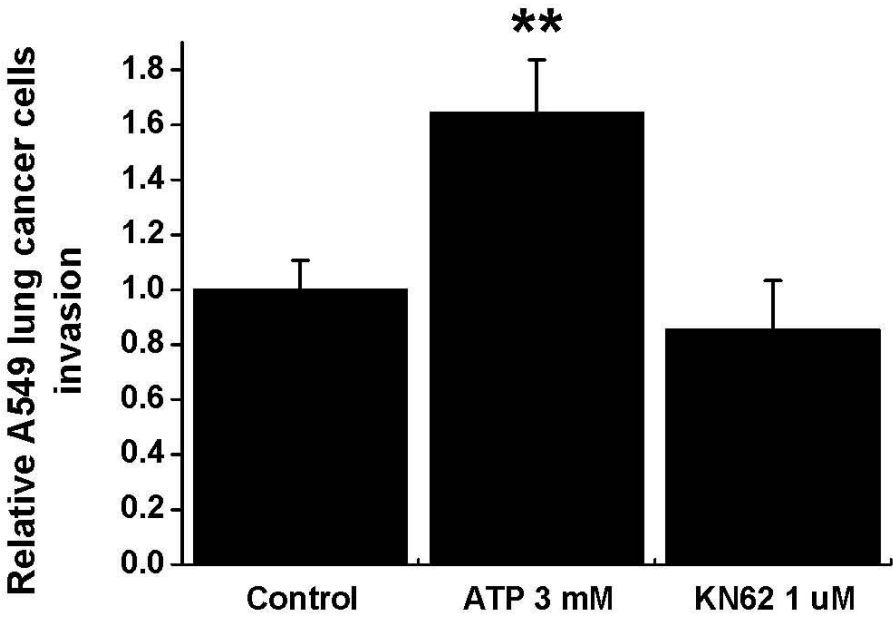
B

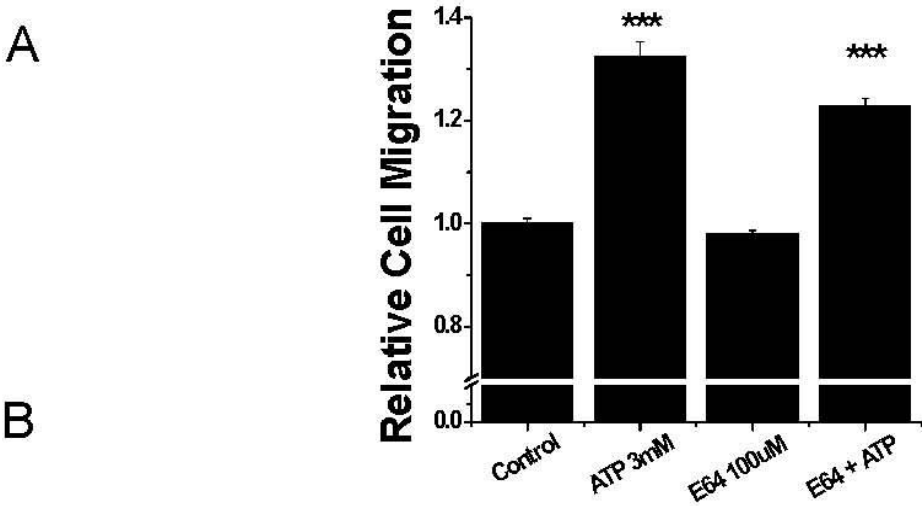


A

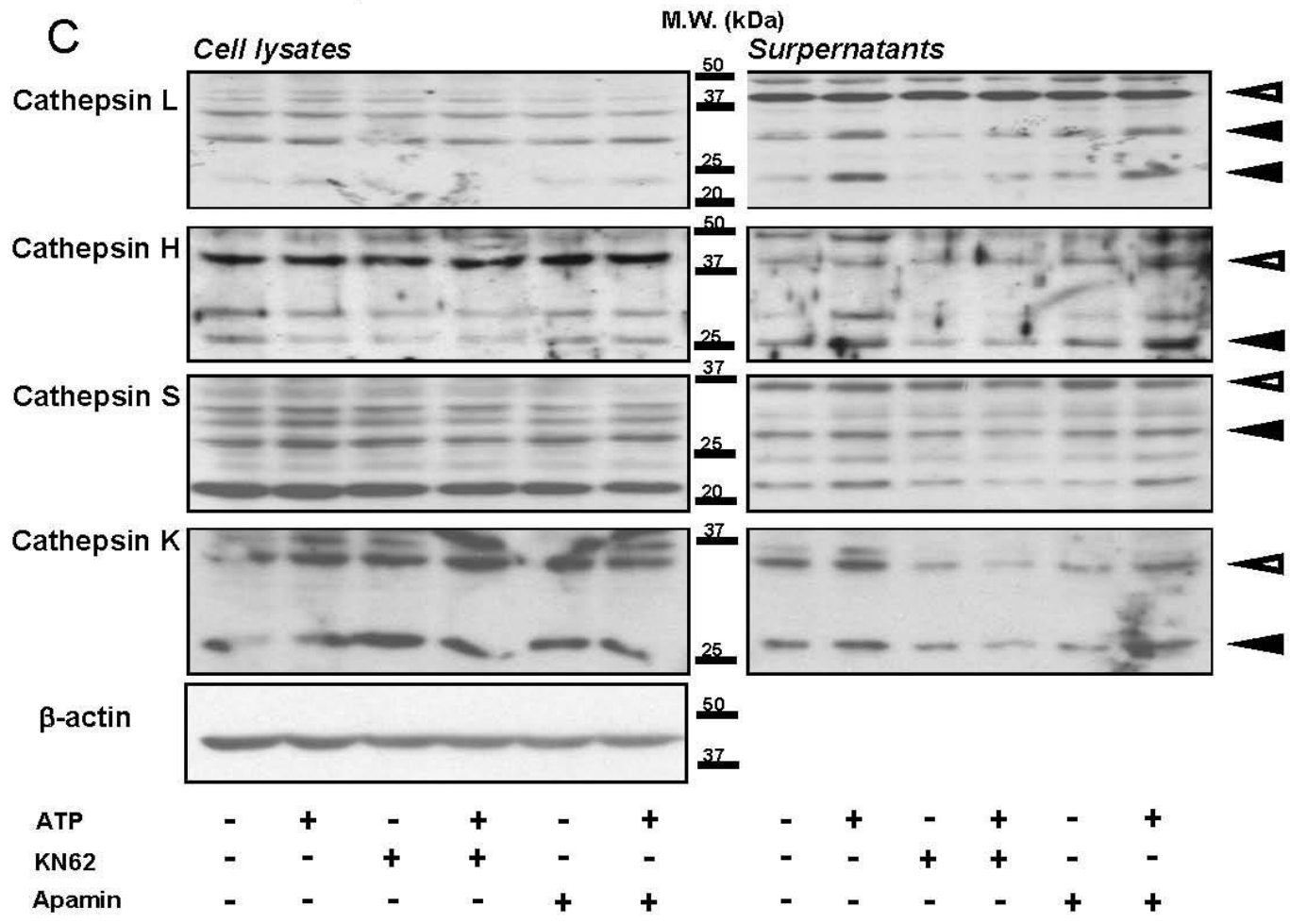
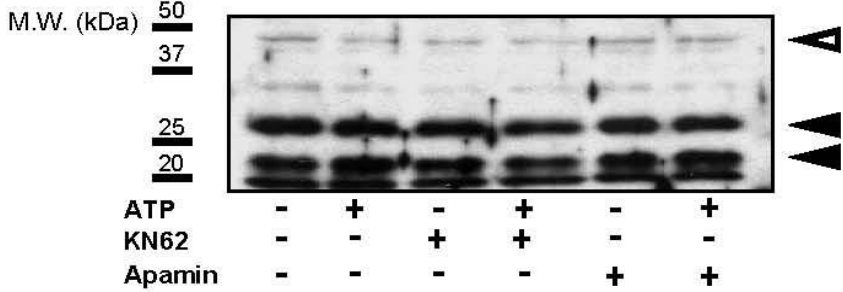


B





Cathepsin B in cell lysates



C. Résumé

Dans cette étude nous avons montré que, parmi tous les récepteurs purinergiques de la famille P2X, seuls les récepteurs P2X₇ sont fortement exprimés et fonctionnels dans les cellules hautement invasives de la lignée cancéreuse mammaire humaine MDA-MB-435s. Ces récepteurs ne sont pas exprimés dans des lignées épithéliales mammaires non cancéreuses (MCF-10A, 184A1, HMEC). L'activation des récepteurs P2X₇ par l'ATP extracellulaire est responsable de changements morphologiques, à savoir l'émission de prolongements cellulaires associés à l'acquisition d'un phénotype pro-migratoire. La stimulation purinergique des canaux ionotropiques P2X₇ induit une augmentation de la migration cellulaire de 35%. Les changements morphologiques ainsi que la migration cellulaire semblent être due à l'activation des canaux potassiques SK3 par l'augmentation du Ca²⁺ intracellulaire. Nous avons également étudié la régulation des propriétés invasives qui reposent sur la dégradation de la matrice extracellulaire. Nous avons montré que l'invasion cellulaire augmente massivement (+150%) suite à l'activation des récepteurs P2X₇. Cet effet semble majoritairement dû à la libération de formes matures de cathepsines à cystéines dans le milieu extracellulaire et ne semble pas associé à l'activité des canaux potassiques SK3. Tous ces effets sont inhibés en présence d'antagonistes spécifiques des récepteurs P2X₇ ainsi que par l'extinction moléculaire des récepteurs P2X₇ par la technique des siRNA. Par ailleurs les récepteurs P2X₇ sont impliqués dans l'invasivité des cellules cancéreuses *in vivo* dans un modèle de micrométastases chez l'embryon de poisson zèbre. À travers cette étude, nous proposons que l'activation du récepteur P2X₇ stimule l'invasion des cellules cancéreuses humaines, un paramètre clé dans la croissance tumorale et le développement des métastases.

II. L'anthraquinone émodine inhibe l'invasivité des cellules cancéreuses humaines par antagonisme du récepteur P2X₇

A. Introduction

Dans une étude récente (Jelassi et al., 2011) nous avons montré que les récepteurs P2X₇ sont fonctionnels dans une lignée mammaire hautement invasive, et que leur activation des récepteurs P2X₇ par l'ATP extracellulaire stimule l'invasion des cellules cancéreuses mammaires.

La rhubarbe (*Rheum officinale* Baill) est utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise pour ces diverses vertus, et en particulier dans le traitement de pathologies inflammatoires. L'émodyne (1,3,8-trihydroxy-6-méthylanthraquinone) est une anthraquinone issue de cette rhubarbe et plusieurs études ont montré que cette molécule présente des propriétés immunosuppressives, anti-inflammatoires (Liu et al., 2010) et antitumorales (Huang et al., 1991; Koyama et al., 1988). L'émodyne ainsi que d'autres dérivés structurellement liés à l'émodyne comme l'Aloe-émodyne et la Rhéine seraient efficaces dans l'inhibition de l'invasion des cellules de mélanome (Tabolacci et al., 2010), de cancer de la langue (Chen et al., 2010) et des cellules du cancer du colon (Ma et al., 2012). Par ailleurs, une étude réalisée par l'équipe du Dr. Lin-Hua Jiang à Leeds (UK) a montré que l'émodyne agissait comme un antagoniste du récepteur P2X₇ de rat (Liu et al., 2010). Nous avons voulu examiner l'effet de cette anthraquinone sur les propriétés d'invasion des cellules cancéreuses humaines hautement invasives MDA-MB-435s.

Les résultats associés à cette partie expérimentale ont été publiés dans le journal *Carcinogenesis*.

B. Article 2

B Jelassi, M Anchelin, J Chamouton, ML Cayuela, L Clarysse, J Li, J Goré, L-H Jiang and S Roger. (2013) "Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X₇ receptors". *Carcinogenesis* Jul;34(7):1487-96.

Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors

Bilel Jelassi¹, Monique Anchelin², Julie Chamouton¹,
María Luisa Cayuela², Lucie Clarysse¹, Junying Li³,
Jacques Goré¹, Lin-Hua Jiang^{1,4} and Sébastien Roger^{1,5,*}

¹Inserm U1069 Nutrition, Growth and Cancer, Université François-Rabelais de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France, ²Telomerase, Cancer and Aging Group, University Hospital “Virgen de la Arrixaca”-FFIS, Carretera Palmar, 30120 Murcia, Spain, ³Department of Biophysics, School of Physics and Key Laboratory of Bioactive Materials of Education Ministry, Nankai University, Tianjin 300071, China, ⁴School of Biomedical Sciences, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds LS2 9JT, United Kingdom and ⁵Département de Physiologie Animale, UFR Sciences et Techniques, Université François-Rabelais de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 2 47 36 61 30;
Fax: +33 2 47 36 62 26;
Email: sebastien.roger@univ-tours.fr
Correspondence may also be addressed to Lin-Hua Jiang.
Tel: +44 113 3434231;
Email: l.h.jiang@leeds.ac.uk

The adenosine 5'-triphosphate (ATP)-gated Ca²⁺-permeable channel P2X7 receptor (P2X7R) is strongly upregulated in many tumors and cancer cells, and has an important role in cancer cell invasion associated with metastases. Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone) is an anthraquinone derivative originally isolated from *Rheum officinale* Baill known for decades to possess anticancer properties. In this study, we examined the effects of emodin on P2X7R-dependent Ca²⁺ signaling, extracellular matrix degradation, and *in vitro* and *in vivo* cancer cell invasiveness using highly aggressive human cancer cells. Inclusion of emodin at doses ≤10 μM in cell culture had no or very mild effect on the cell viability. ATP elicited increases in intracellular Ca²⁺ concentration were reduced by 35 and 60% by 1 and 10 μM emodin, respectively. Emodin specifically inhibited P2X7R-mediated currents with an IC₅₀ of 3 μM and did not inhibit the currents mediated by the other human P2X receptors heterologously expressed in human embryonic kidney (HEK293T) cells. ATP-induced increase in gelatinolytic activity, in cancer cell invasiveness *in vitro* and in cell morphology changes were prevented by 1 μM emodin. Furthermore, such ATP-evoked effects and inhibition by emodin were almost completely ablated in cancer cells transfected with P2X7R-specific small interfering RNA (siRNA) but not with scrambled siRNA. Finally, the *in vivo* invasiveness of the P2X7R-positive MDA-MB-435s breast cancer cells, assessed using a zebrafish model of micrometastases, was suppressed by 40 and 50% by 1 and 10 μM emodin. Taken together, these results provide consistent evidence to indicate that emodin inhibits human cancer cell invasiveness by specifically antagonizing the P2X7R.

Introduction

Epithelial cancers, and principally breast and lung cancers, represent the major causes of death by cancer worldwide (1). The high mortality of the cancerous disease mainly results as a consequence of metastasis appearance and growth. Metastases occur after invading cancer

cells degrade and migrate through the extracellular matrix (ECM) and reach the lymph and blood circulation. Therefore, the metastatic progression is likely to depend on the acquisition by cancer cells of a more invasive potency (2). At the time being, there is no specific treatment targeting metastases or preventing metastasis development. Moreover, metastatic cells often exhibit resistance to conventional therapies such as chemotherapies, rendering even more difficult to treat the diseases. Although this clinical reality has been known for years now, the knowledge of molecular and cellular details underlying metastasis remains so far incomplete. In this scenario, increase in the knowledge regarding molecular and cellular mechanisms involved in the development of metastasis and disease progression and discovery of new therapeutic targets should offer a new opportunity to improve clinical practices or develop new strategies for cancer treatments.

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is a well-known intracellular source of energy for all forms of living cells. ATP is also released to the extracellular milieu in both physiological and pathological settings, and initiates signaling pathways through activation of membrane receptors. There are two distinct families of membrane receptors for extracellular nucleotides: the metabotropic G-protein coupled P2Y receptors and the ionotropic ligand-gated cation-permeable channel P2X receptors (3). At the cellular level, these receptors are important regulators of cell activation, proliferation, differentiation, migration and apoptosis, thereby contributing to modulation of several physiological processes. ATP has been found at relatively high concentrations in the tumor microenvironments (4) where it is released from living cancer cells (5) and also from necrotic cells in the perilesional regions of cancers (6), raising the possibility that the purinoreceptors expressed by tumor cells are activated and consequently modulate the tumor growth and metastasis appearance (7,8). Among all receptors, the P2X7 receptor (P2X7R) (9) has drawn increasing attention. It is an intriguing receptor with unique features such as a low ATP sensitivity, no desensitization (10) and remarkable facilitation in response to sustained or repeated exposure to agonist (11,12). The P2X7Rs were initially described as the cytolytic receptors because prolonged activation induced cell death (13,14). The P2X7Rs in immune cells have been extensively studied; their activation is crucial for initiation of the inflammatory signaling cascade through activation of the inflammasome that processes and releases important pro-inflammatory cytokines such as interleukin-1β (15,16) and fever-inducing prostaglandin E2 (17). As such, the P2X7Rs have emerged as an interesting target for developing therapeutics for treatment of inflammatory diseases (18). Studies have recently shown that expression of the P2X7R in several tumors, including chronic lymphocyte leukemia, melanoma, neuroblastoma, prostate, breast and thyroid cancers, is substantially upregulated or higher compared with normal tissues (5,19–25), leading to the proposal of P2X7Rs as an early biomarker for cancer (25,26). Contrarily to the initial assumptions, the P2X7R activity has been shown to be responsible for antiapoptotic effects (24), or for sustaining both cancer cell (5,27) and tumor growth *in vivo* (28). We have recently reported that the P2X7Rs are highly expressed and fully functional in the highly invasive human breast cancer cells MDA-MB-435s (29); activation of the P2X7Rs did not induce cancer cell death but was responsible for the acquisition of a pro-migratory phenotype by cancer cells and enhanced cancer cell invasiveness *in vitro* and *in vivo*, through degradation of the ECM (29). Therefore, the use of P2X7R antagonists may represent a new approach to reduce the development of cancer metastases and improve the efficacy of conventional treatments (8).

Although combinatorial chemistry has emerged as an important part of the medicinal chemistry for production of new drugs, active compounds have been and are still discovered from traditional remedies prepared from plants and other natural sources. Once identified,

such active compound could represent a good starting point for drug discovery. Emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone), isolated from the rhubarb *Rheum officinale* Baill that has been used in Chinese traditional herbal medicine for centuries, is an anthraquinone derivative and is known to possess anti-inflammatory, immunosuppressive and antitumor properties, despite that the underlying mechanisms are not fully understood (30,31). Recent studies have shown emodin and several other structurally closely related anthraquinone derivatives such as aloe-emodin and rhein to be efficacious in inhibiting melanoma (32) and tongue cancer cell invasiveness (33). Our recent study has demonstrated emodin as a potent rat P2X7R antagonist (34). Therefore, the aim of this study was to investigate whether emodin reduces epithelial (breast and lung) cancer cell invasiveness *in vitro* and *in vivo* through antagonism of the human P2X7R.

Materials and methods

Cells and culture

The human breast (MDA-MB-435s and MDA-MB-468) and non-small cell lung (A549) cancer cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 5 and 10% fetal calf serum (FCS), respectively. The immortalized normal mammary epithelial cells MCF-10A were cultured in DMEM/Ham's F-12, 1:1 mix containing 5% horse serum (Invitrogen, Saint Aubin, France), 10 µg/ml insulin, 20 ng/ml epidermal growth factor, 0.5 µg/ml hydrocortisone and 100 ng/ml cholera toxin. Both cell types were originally from the American Type Culture Collection (LGC Promochem, Molsheim, France). The human embryonic kidney (HEK293T) cells were maintained in DMEM: F-12 medium, supplemented with 10% heat-inactivated FCS and 2 mM L-glutamine. HEK293T cells were grown to 80–90% confluence in six-well plates and transiently transfected with 1 µg plasmid encoding the human P2X receptor desired (hP2X1, hP2X2, hP2X3, hP2X4, hP2X5 or hP2X7) and 0.1 µg plasmid encoding the green fluorescent protein, using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as described previously (12). These plasmids are generous gifts from Prof. Alan R. North (University of Manchester, UK). The cells were then plated into Petri dishes and used for electrophysiological studies 24–72 h after transfection. All cells were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

Reverse transcription–PCR analyses

Reverse transcription–PCR experiments were done using standard protocols in order to examine messenger RNA (mRNA) expression of P2Y and P2X receptors in cancer and non-cancer human cell lines. Total RNA extractions from cells were performed using NucleoSpin® RNA II (Macherey–Nagel, HOERDT, France), followed by reverse transcription using SUPERScript™ III (Invitrogen, UK) RNAse H-reverse transcriptase with oligo-deoxythymidine. Specific primers for human P2X and P2Y receptors, which were described in our recent study (29), were used in PCR. The temperature profile for PCR was 4 min at 94°C followed by amplification for 40 cycles, which consisted of 1 min at 94°C, 30 s at 60°C and 1 min at 72°C, and a final extension for 2 min at 72°C. PCR products were then analyzed by electrophoresis in 1.8% agarose gels containing ethidium bromide and visualized by ultraviolet trans-illumination.

Small interfering RNA transfection and efficacy assessment

MDA-MB-435s human breast cancer cells were transfected with 20 nM P2X7-small interfering RNA (siRNA) or scrambled siRNA, which were purchased from Tebu-Bio (Le Perray-en-Yvelines, France) as described previously (29), using Lipofectamine RNAi max (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions and used 24 h after transfection. The efficiency of reducing the P2X7R expression by siRNA transfection was verified by quantitative PCR using an iCycler® system (Bio-Rad, Hercules, CA) as described previously (35). In brief, total RNA was extracted using NucleoSpin® RNA II (Macherey–Nagel), followed by reverse transcription using Ready-To-Go You-Prime First-Strand Beads, GE Healthcare (Fisher Scientific, Illkirch, France) RNAse H-reverse transcriptase and oligo-deoxythymidine. The following primers specific to the human P2X7R were used (forward primer: 5'-AAAACAGAAGGCAAGAGCA-3', reverse primer: 5'-CACCAGGCAGAGACTTACCA-3'). The PCR protocol consisted of a denaturation step at 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of amplification at 95°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 10 s. The efficiency of primers was >95% and a single product was seen on the melt curve analysis. Experiments were performed in triplicate and instead of water, the first-strand complementary DNA was used as negative control. Results were analyzed using the ΔC_t

method, where the parameter C_t (threshold cycle) is defined as the cycle number at which the PCR reporter signal passes a fixed threshold. For each sample, the ΔC_t value was determined by subtracting the average C_t value of the investigated transcript in the cells transfected with scrambled siRNA from the average C_t value of the same transcript in the cells transfected with P2X7-siRNA. Transfections with siP2X7 reduced the P2X7R mRNA level by 65–90%.

Electrophysiological recordings

Patch clamp current recordings were made in the whole-cell configuration, using an Axopatch 200B patch clamp amplifier and a 1322A Digidata converter (Axon Instrument, CA), as described previously (11). The patch pipettes were prepared from borosilicate glass capillaries (WPI, Hertfordshire, UK) with a resistance of 4–6 MΩ. The cell capacitance and series resistances were electronically compensated. The membrane potential was held at –60 mV. Experiments were performed at room temperature (20–25°C) in a standard external physiological saline solution (PSS) and pipettes were filled with an intracellular solution (see Solutions). ATP was externally applied to the patched cells for 5 s when examining the P2X1, P2X2 and P2X3 receptors and for 10 s when examining P2X4, P2X5 and P2X7Rs, at the indicated concentrations, using a RSC-160 fast-flow delivery system (BioLogic Science Instruments, Claix, France). When studying the P2X7R, emodin was perfused onto the patched cells at the indicated concentrations for 4 min before ATP was applied again to induce the currents. The emodin concentration–response relationship was analyzed by least squares fitting of the mean data to the following modified Hill equation: $y = (A_1 - A_2)/(1 + (x/x_0)^p) + A_2$, where A_1 and A_2 represent the ATP-induced currents in the absence or the maximal concentrations of emodin, respectively, x_0 is the concentration reducing the emodin-sensitive currents by 50%, and p is the Hill coefficient. The concentration–response curve was plotted using Origin Microcal 6.0 software (Microcal Software, Northampton, MA). When studying the other P2X receptors, emodin was perfused onto the patch cells at the maximal 10 µM concentration. Because all P2X receptors, except P2X7R, show a current desensitization, we performed multiple applications of 10 µM ATP (from 2 to 5, depending on the receptor). ATP applications were performed every 4 min in presence or not of emodin (10 µM). The potential effect of emodin was analyzed on the desensitization curves built by measuring the maximal current (I) triggered for each ATP application divided by the maximal current (I_{max}) recorded at the first application. The desensitization curve was fitted by the following monoexponential decay equation: $y = A \exp(-x/t) + y_0$.

Solutions

The external PSS had the following composition (in millimolar): 147 NaCl, 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2 ethanesulfonic acid, 13 D-glucose, 2 KCl, 2 CaCl₂ and 1 MgCl₂. The intracellular solution for the patch clamp recording experiments had the following composition (in millimolar): 147 NaCl, 2 KCl, 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2 ethanesulfonic acid and 10 ethyleneglycol-bis-(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid. The osmolarity and pH values for both solutions were 295–315 mOsm and 7.3, respectively. Emodin was prepared as 10 mM stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO) as the vehicle solvent. The working solutions of ATP and emodin were prepared in PSS (for the patch clamp recordings and Ca²⁺ measurements) and in normal culture medium DMEM supplemented with 5% FCS (for the cell viability, DQ-gelatin and invasiveness experiments) at the indicated concentrations. All the solutions for the control experiments contained the matched volume of DMSO.

Western blotting

Western blotting of cell lysates was performed according to standard protocols to examine the P2X7R protein expression in MDA-MB-435s and MCF-10A cells. In brief, cell lysates were prepared by washing the cells twice in phosphate-buffered saline (PBS), and then lysing them in RIPA buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) with 1% Triton X-100 and supplemented with complete protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich) for 1 h at 4°C. The cell lysates were cleared by centrifugation at 16 000g for 10 min. Total protein concentrations were determined using the Pierce® BCA Protein Assay Kit Thermo scientific (Fisher Scientific). Protein sample buffer was added and the samples were boiled at 100°C for 3 min. Total protein samples (60 µg) were electrophoretically separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis in 10% gels, and then transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore, Molsheim, France). The P2X7R proteins were detected using primary polyclonal rabbit anti-P2X7 primary antibody at a dilution of 1:200 (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) and secondary horseradish peroxidase-conjugated goat antirabbit IgG secondary antibody at 1:2000 (Tebu-Bio). The HSC70 proteins used for sample loading control were detected using primary mouse anti-HSC70 at 1:30 000 (TebuBio) and secondary horseradish peroxidase-conjugated

antimouse-IgG antibodies at 1:2000 (Tebu-Bio). Proteins were visualized using a Electrochemiluminescence-Plus Kit (Pierce® ECL Western Blotting Substrate; Fisher Scientific) and captured on Kodak Bio-Mark MS films (Sigma-Aldrich, France).

Measurement of intracellular Ca^{2+} concentrations

Changes in internal free calcium concentration were monitored by the fluorescent ratioimetry using Fura-2/AM Ca^{2+} indicator. MDA-MB-435s cells were seeded 1×10^5 cells per well in six-well plates 48 h before use. After washing in PBS, the cells were incubated in the OptiMem media (GIBCO, Invitrogen, Saint Aubin, France) containing 2.5 μM Fura-2/AM (Invitrogen, France) at 37°C for 50 min. The cells were washed gently with PBS and then scraped in 10 ml OptiMem media. After 5 min centrifugation at 700g at room temperature, the supernatant was discarded and the cells were resuspended in 2 ml PSS (see Solutions). The cell suspension was loaded into the cuvette of the spectrofluorimeter (Hitachi F-2500, Courtaboeuf, France, Japan) and was kept under agitation at room temperature. Fluorescence was alternatively excited by 340 and 380 nm and measured at 510 nm, and the F340/F380 ratio was calculated. A438079 and emodin were added to the cell suspension 5 min before stimulation with 3 mM ATP. In the end of each experiment, 2.5 μM ionomycin (Sigma-Aldrich) was added in order to induce the maximal Ca^{2+} loading of the cell preparations. ATP-induced changes in the F340/F380 ratio were expressed as percentage of those induced by ionomycin in the same cell preparations.

Cell viability assay

To assess the cell survival, cancer or non-cancer cells were seeded at 1.5×10^4 cells per well in 24-well plates in their respective culture medium (see Measurement of intracellular Ca^{2+} concentrations) that contained different concentrations of emodin (from 1 nM to 10 μM) or the matched volume of DMSO used as a vehicle for emodin. The cells were grown for 4 days and the media were replaced daily. The living cell numbers were determined using the tetrazolium salt assay as described previously (35). The cell viability was expressed as formazan absorbance at 570 nm and expressed as a percentage of the control condition in the absence of emodin. Results were validated by manual cell counting. Three independent experiments were performed.

Cell invasiveness assays and cell morphology analyses

The cell invasiveness was analyzed in 24-well plates receiving 8 μm pore size polyethylene terephthalate membrane cell culture inserts covered with a film of Matrigel® (BD Biosciences, France). The upper compartment was seeded with 4×10^4 cells in the basal culture medium. The lower compartment was filled with the culture medium supplemented with 10% FCS, instead of 5%, as a chemoattractant. After 24 h of incubation at 37°C, the cells attached to the side of the inserts facing the lower compartment were stained with hematoxylin and counted under a light microscope. The cell invasiveness assays were performed in triplicates in 3–8 separate experiments. For meaningful comparison between separate experiments, the cell numbers were normalized to that under the control condition (vehicle) in the absence of drug or ATP.

The change in cell morphology was assessed from images of hematoxylin-stained MDA-MB-435s using the ImageJ® software 1.38I (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). A circularity index was calculated as being $4\pi \times (\text{area})/(\text{perimeter})^2$. As the value approaches 0, it indicates an increasingly elongated shape and, conversely, the value of 1.0 indicates a perfect circle.

Assessment of gelatinolytic activity of cancer cells

MDA-MB-435s cells were cultured in a 3D-Matrigel® matrix containing 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DQ-Gelatin® (Invitrogen, France) on glass coverslips for 24 h and then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 10 min as described previously (36). Epifluorescence microscopy was performed with a Nikon TI-S (Champigny sur Marne, France). The samples were excited at 495 nm and the emission at 515 nm was recorded. The fluorescence density was quantified using the ImageJ® software 1.38I.

Zebrafish maintenance and *in vivo* zebrafish metastatic assays

Zebrafish (ZF; *Danio rerio*), from the Zebrafish International Resource Centre, were maintained in re-circulating tanks according to standard procedures (*The zebrafish handbook: a laboratory use of zebrafish, Brachydanio rerio*). Adult fish were maintained at 26°C, with a light/dark cycle of 14/10 h and were fed twice daily, once with dry flake food (PRODAC) and once with live artemia (MC 450, IVE AQUACULTURE). ZF embryos were maintained in egg water at 28.5°C and were fed for 5 days with NOVO TOM and with live artemia at 11 days of life. The experiments were performed in compliance with the Guidelines of the European Union Council for animal experimentation (86/609/EU) and were approved by the bioethical committee of the University Hospital Virgen de la Arrixaca (Spain). The development of micrometastases in ZF embryos was described previously (29). Briefly, MDA-MB-435s or MDA-MB-468 breast cancer cells were trypsinized, washed and

stained with the vital cell tracker red fluorescent CM-Dil (Vibrant; Invitrogen). Labeled cells were pre-incubated for 30 min with 1 or 10 μM emodin or vehicle (DMSO), and 50 labeled cells were injected into the yolk sac of dechorionated ZF embryos using a manual injector (Narishige, London, UK). Fish with fluorescently labeled cells appearing outside the implantation area at 2 h were excluded from further analysis. All other fish were incubated at 35°C for 48 h and analyzed with a SteReo Lumar V12 stereomicroscope with an AxioCam MR5 camera (Carl Zeiss, Barcelona, Spain). The evaluation criteria for micrometastases were the presence of more than five cells outside of the yolk. Injection of emodin or vehicle into the yolk sac of ZF embryos did not affect the development of the fish and did not affect the viability of cancer cells. A ZF metastasis index was calculated as being the proportion of embryos showing micrometastases in each condition divided the proportion of embryos showing micrometastases in the control condition in absence of emodin.

Data analysis and statistics

The average results are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean from the number of cells or essays indicated in the figure legends. Statistical analyses were performed using SigmaStat 3.0.1a (Systat Software, Chicago, IL) using Student's *t*-test, or alternatively Mann-Whitney rank sum test when the variance homogeneity test failed. Statistical significance is indicated as follows: **P* < 0.05; ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001.

Chemicals, salts and drugs

General chemicals, ATP, emodin and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide were obtained from Sigma-Aldrich (France). Flura-2/AM was purchased from Invitrogen (France), and A438079 was obtained from Tocris (Lille, France).

Results

We first examined the mRNA expression of P2X receptors in several human cell lines: MCF-10A non-cancer mammary cells, MDA-MB-468 and MDA-MB-435s, which represent weakly and highly invasive breast cancer cells, respectively, and A549 non-small cell invasive lung cancer cells. Although MCF-10A and MDA-MB-468 cells did not express or weakly expressed P2X7R, A549 and MDA-MB-435s cells expressed a much higher level of mRNA for P2X7R (Figure 1A). There was detectable mRNA expression for P2X4, P2X5 and P2X6 (Figure 1A) but the expression level was correlated with cell invasiveness, in contrast with the expression of mRNA for P2X7R. The mRNA expression profile for P2Y receptors was also studied and showed that all cell types express multiple P2Y receptors with the exception of MDA-MB-435s cells only expressing mRNA for P2Y11 receptors (Figure 1B). Therefore, it is the expression of the P2X7R in cancer cells that could be associated with a high invasive capacity. Western blotting experiments further showed expression of P2X7 proteins in highly invasive human cancer cells, MDA-MB-435s (breast) and A549 (lung), and not in the non-cancer MCF-10A cells or the weakly invasive MDA-MB-468 cells (Figure 1C).

We then tested the effect of emodin (Figure 2A) on the cell viability of MDA-MB-435s and A549 human cancer cells. The cells were treated for 4 days with increasing doses of emodin from 1 nM to 10 μM . Emodin at a concentration of $\leq 1 \mu\text{M}$ had no discernible effect on, and at 10 μM caused a very mild but significant reduction in, the cell viability (Figure 2B). We repeated such experiments on MCF-10A non-cancerous mammary and MDA-MB-468 breast cancer cells, which unlike MDA-MB-435s and A549 cells do not express the P2X7Rs (Figure 1A and C). Virtually, the same results were observed (Figure 2B). These results, therefore, indicate that emodin for concentrations of 1 μM or less is neither toxic nor antiproliferative for the human mammary cells tested.

We have recently shown that the P2X7Rs are a key determinant in promoting the invasive phenotype of the highly aggressive MDA-MB-435s human cancer cells, through the release of active cathepsins in the extracellular microenvironment (29). In a separate study, we have shown emodin as a potent antagonist at the rat P2X7Rs endogenously expressed in peritoneal macrophages or heterologously expressed in HEK293T cells (34). To test the potential antagonism of emodin on the human P2X7R, we examined the effect of emodin on the human

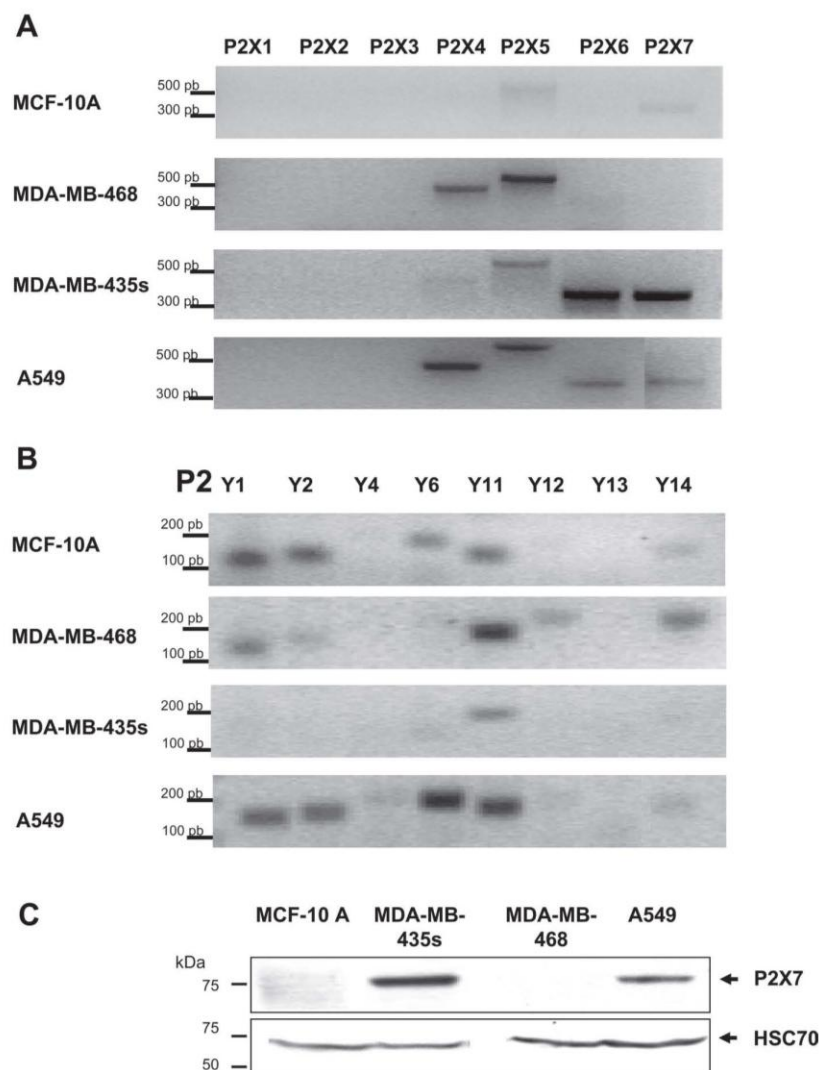


Fig. 1. Expression profile of P2 receptors in human non-cancer and cancer cell lines. (A and B) Representative reverse transcription-PCR experiments analyzing the expression of mRNA for the P2X (A) and P2Y receptors (B) in human non-cancerous mammary MCF-10A cells, weakly invasive MDA-MB-468 cells, highly invasive (MDA-MB-435s) human breast cancer cells and A549 human non-small cell lung cancer cells. (C) Representative western blotting experiments showing protein expression of the P2X7R in MDA-MB-435s breast and A549 lung cancer cells but not in MCF-10A non-cancerous mammary and MDA-MB-468 breast cancer cells. HSC70 was used as a control for sample loading.

P2X7R-dependent increase in the intracellular Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in MDA-MB-435s cancer cells and human P2X7R-mediated currents in HEK293T cells (Figures 2 and 3). As shown on Figure 2C and E, 3 mM ATP induced a sustained increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in MDA-MB-435s cells, which was completely abolished when the cells were pre-incubated with 10 μM A438079, a P2X7R-selective antagonist (37), suggesting that P2X7R is the predominant P2X receptor mediating ATP-induced increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in MDA-MB-435s cancer cells (29). Such ATP-induced increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was dose dependently inhibited by pre-incubation with emodin (1 and 10 μM ; Figure 2D and E). Emodin on its own had no effect on the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ when compared with its vehicle (data not shown). We also examined the effect of emodin on ATP-evoked currents, using whole-cell patch clamp recordings in HEK293T cells heterologously expressing the human P2X7R and compared this to the effect on other human P2X receptors (Figure 3). Treatment with 10 μM emodin for 4 min solely inhibited ATP-evoked currents recorded in the P2X7R-expressing cells, whereas it had no effect on P2X1, P2X3, P2X4

and P2X5 receptors and slightly but significantly increased the ATP-mediated current triggered in P2X2R-transfected cells (Figure 3A and B). Accumulative treatment of the patched cells with emodin for 4 min inhibited ATP-evoked P2X7-dependent currents in a concentration-dependent manner, with a maximal inhibition of approximately 70% (Figure 3C). The concentration-response curve was well fitted by the Hill equation. The ATP-induced currents were inhibited by 50% at about 3 μM . Because the P2X1-P2X5 receptors show current desensitization (10), we also checked for a specific effect of emodin on the desensitization of these receptors. We performed whole-cell patch clamp experiments in HEK293T expressing the human homomeric P2X1-P2X5 receptors, stimulating the cells with repetitive application of 10 μM ATP in presence or not (control) of 10 μM emodin allowing the fitting of desensitization curves (Supplementary Figure S1, available at *Carcinogenesis* Online). We found that emodin had no significant effect on these P2X receptors except that it slightly slowed down desensitization of the hP2X2 receptors. Taken together, these results indicate that emodin inhibits human P2X7R-mediated Ca^{2+}

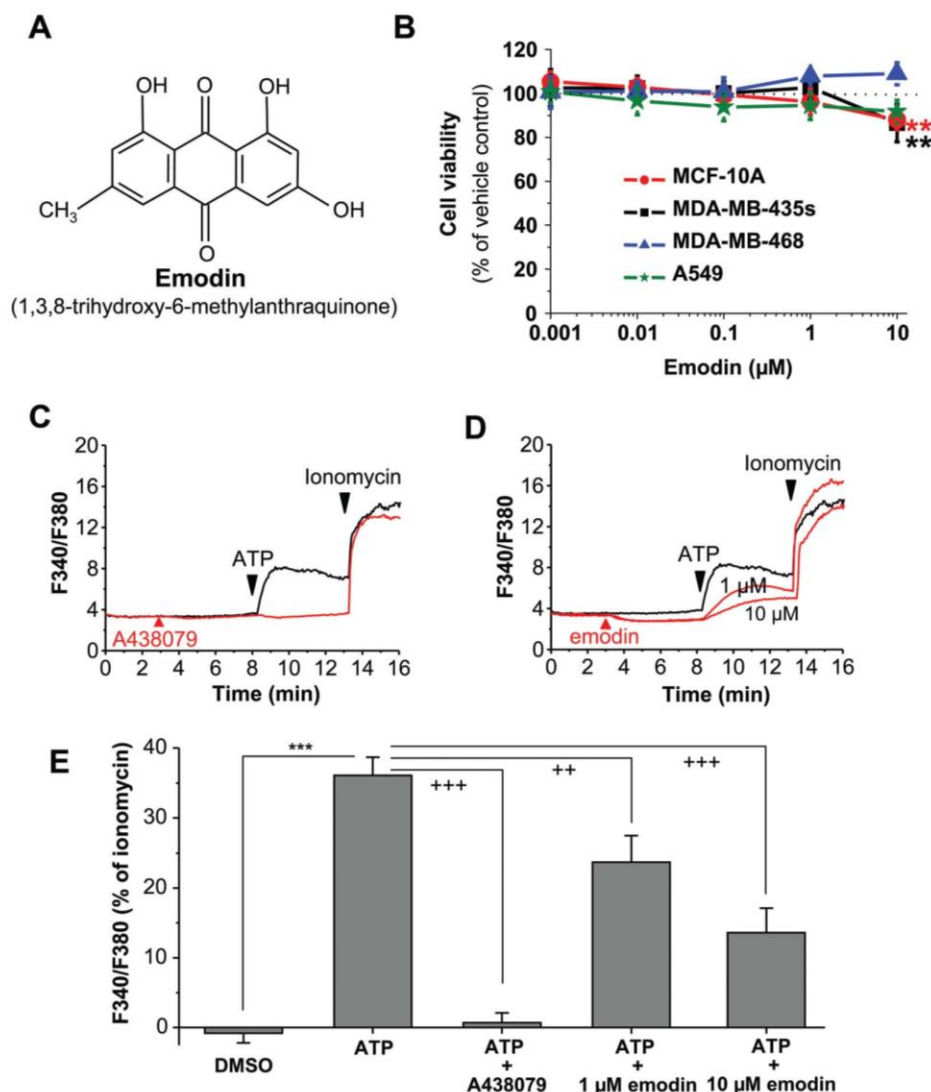


Fig. 2. Effects of emodin on cell viability and on the activity of human P2X7Rs in MDA-MB-435s human breast cancer cells. (A) Structure of emodin, an anthraquinone derivative isolated from *R. officinale* Baill. (B) Cell viability of MCF-10A human non-cancerous mammary (red circles), MDA-MB-468 (blue triangles), MDA-MB-435s human breast cancer (black squares) and A549 (green stars) human non-small cell lung cancer cells, after 4 days in cell culture with indicated concentrations of emodin, expressed as a percentage of the control condition (vehicle). These results are from three independent experiments. ** indicates a significant difference to the control condition at $P < 0.01$, using Mann-Whitney rank sum test. (C) Inhibition by emodin of ATP-induced P2X7R-mediated Ca^{2+} influx in MDA-MB-435s cancer cells. The panel shows representative changes in the intracellular Ca^{2+} concentrations $[\text{Ca}^{2+}]_i$ using Fura-2 to monitor changes in F340/F380 or the ratio of the emission fluorescence at 510 nm induced by excitation at wavelengths of 340 and 380 nm. The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were increased when the cells were stimulated with 3 mM ATP (ATP), which were prevented by pre-treatment with P2X7R antagonist (C) A438079 (10 μM) or (D) emodin (1 and 10 μM ; right). Ionomycin (2.5 μM) was applied in the end of the experiments to show the maximal increase in the $[\text{Ca}^{2+}]_i$. (E) Histograms summarizing mean data from three independent experiments. The Fura-2 fluorescence or F340/F380 under the indicated test conditions was expressed as % of that induced by ionomycin. *** significant difference from the DMSO vehicle condition at $P < 0.001$; ++ and +, significant difference from the ATP condition at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, using Student's *t*-test.

entry and currents, as shown previously for the P2X7R-mediated Ca^{2+} entry in rat macrophages and currents in HEK293 cells heterologously expressing the rat P2X7R (34).

An important feature for the development of metastases is the capacity of cancer cells to degrade the ECM, through the release or activation of numerous proteases such as matrix metalloproteinases (38) or cysteine cathepsins (39). Our recent study has shown that the P2X7R expression is strongly upregulated in MDA-MB-435s cancer cells and stimulation of the P2X7Rs with ATP remarkably promotes cell invasiveness through the release of active cysteine cathepsins

(29). Therefore, we tested whether emodin as a P2X7R antagonist inhibited ATP-induced ECM proteolysis. MDA-MB-435s cancer cells were grown for 24 h in a three-dimensional matrix of Matrigel®, mimicking the ECM and containing DQ-gelatin, which releases fluorescent products after proteolytic cleavage by gelatinases. As shown on Figure 4A, the gelatinolytic activity was low and mainly distributed at the pericellular zone of the untreated cells. Stimulation of the cells with 3 mM ATP remarkably increased gelatinolysis of the pericellular matrix. Such ATP-induced effect was totally abolished in the presence of 1 μM emodin (Figure 4B).

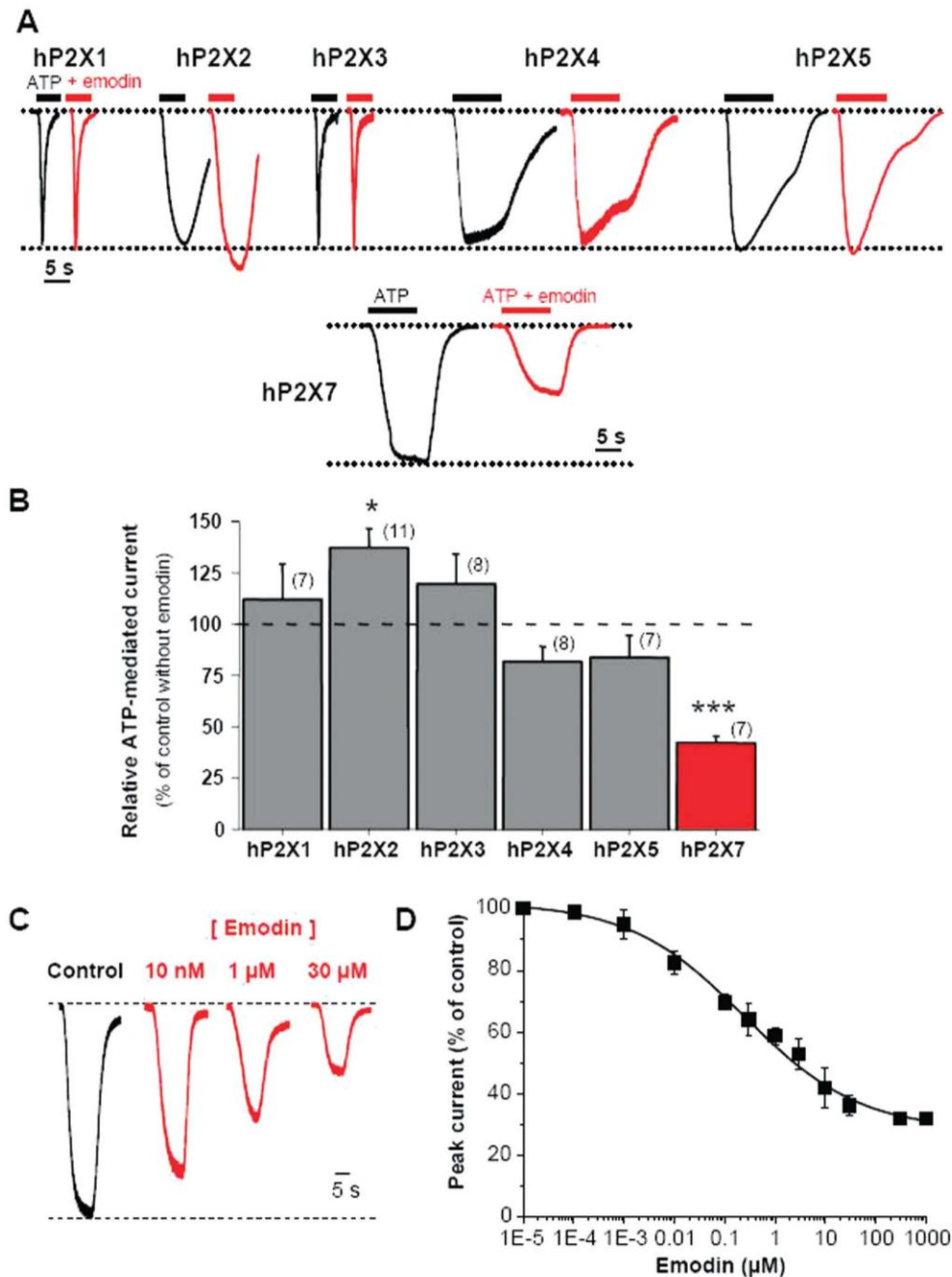


Fig. 3. Emodin inhibits ATP-induced P2X7R currents. (A) Representative traces showing whole-cell ATP-induced currents recorded from HEK293T cells transiently transfected with human P2X1, P2X2, P2X3, P2X4, P2X5 or P2X7Rs, at a holding potential of -60 mV in the absence (control, black traces) or after 4 min pre-treatment with $10 \mu\text{M}$ emodin (red traces). In the case of fast-desensitizing P2X1, P2X2 and P2X3 receptors, ATP was applied for 5 s at a concentration of $10 \mu\text{M}$. For studying P2X4 and P2X5 receptors, ATP was applied for 10 s at a concentration of $10 \mu\text{M}$. P2X7Rs were stimulated by 3 mM ATP for 10 s. (B) Relative summary of the mean effect of $10 \mu\text{M}$ emodin on the ATP-induced inward currents mediated by different human P2X receptors heterologously expressed in HEK293T cells. Numbers in brackets represent the number of studied cells for each receptor. * indicates a significant difference at $P < 0.05$, and *** at $P < 0.001$, compared with the control current without emodin. (C) Inhibition by emodin of ATP-induced currents in HEK293T cells transiently transfected with human P2X7R. At the left are representative whole-cell current recordings at a holding potential of -60 mV and in response to 10 s application of 3 mM ATP in the absence (control) and the presence of increasing concentrations of emodin are shown. At the right, the mean data are summarized ($n = 2-7$ for each data point). The emodin concentration-inhibition curve was derived by fitting the mean data to the Hill equation indicating an IC_{50} of approximately $3 \mu\text{M}$.

We went on to assess the ability of emodin to reduce P2X7R-positive MDA-MB-435s cancer cells invasiveness *in vitro* and *in vivo*. We studied the *in vitro* invasive properties of MDA-MB-435s cancer cells in

relationships with the P2X7R stimulation, using the invasion inserts with the filters coated with MatrigelTM, which mimics the ECM. As shown in Figure 5A, it is clear that ATP strongly increased the cell invasion,

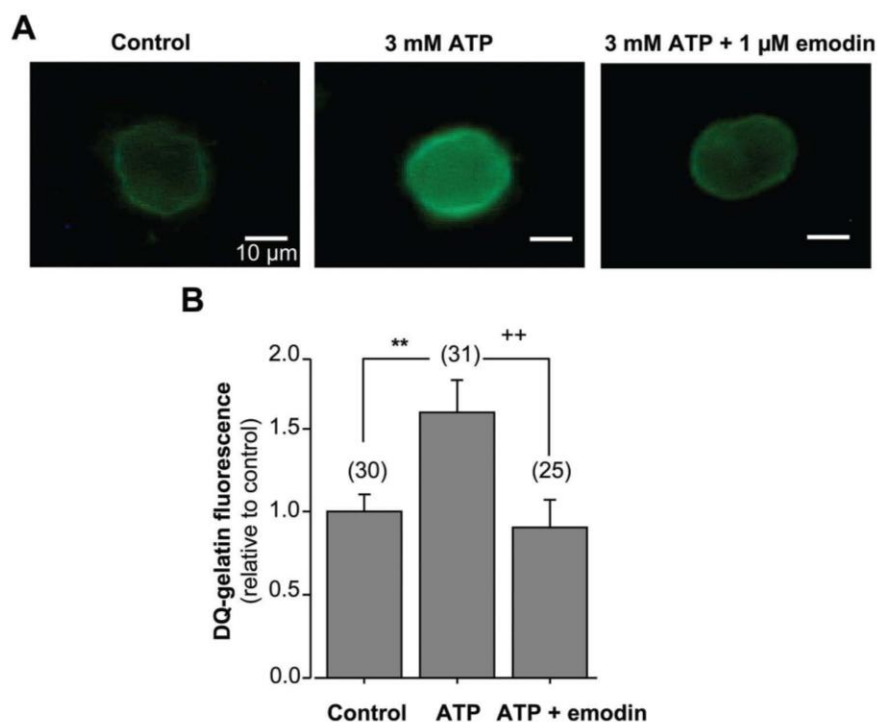


Fig. 4. Inhibition by emodin of ATP-induced gelatinolytic activity of MDA-MB-435s breast cancer cells. (A) Representative fluorescence images of MDA-MB-435s cancer cells grown for 24 h within a 3D-Matrigel® matrix containing DQ-Gelatin® (as a fluorogenic substrate for gelatinases) for the vehicle control, 3 mM ATP and 3 mM ATP in the presence of 1 μM emodin. (B) The diagram summarizes the fluorescence intensity relative to the control condition ($n = 25-31$). ** indicates a significant difference at $P < 0.01$ compared with the control condition, and ++ indicates a significant difference at $P < 0.01$ compared with the ATP condition.

and such ATP-induced effect was completely prevented in the presence of 1 μM emodin. These effects were not altered in the MDA-MB-435s cancer cells transfected with scrambled siRNA (siCTL); stimulation with 3 mM ATP massively increased the cell invasion by 2.2 ± 0.3 times, which was abolished by emodin. In the cells transfected with P2X7-siRNA, the basal cancer cell invasiveness in the absence of ATP stimulation was reduced by 56% (Figure 5B). Furthermore, silencing the P2X7R expression led to complete loss of both the increase in cell invasion induced by ATP and the inhibition by emodin (Figure 5B). The efficacy of cell transfection with siP2X7 as compared with siCTL was assessed by reverse transcription-quantitative PCR, as indicated in the Materials and methods, and reduced the P2X7R mRNA level by 65–90%. ATP also induced substantial changes in the cell morphology of the wild-type and scrambled siRNA-transfected MDA-MB-435s cancer cells, resulting in 'neurite-like' cell elongation (Figure 5A), which is the hallmark of increased invasive abilities. In order to quantify such changes in the cell morphology, we calculated the circularity index (see Materials and methods) from the cells transfected with scrambled siRNA or P2X7-siRNA. The value of approaching to 0 indicates that the cell has an increasingly elongated shape and, conversely, the value of 1.0 denotes a perfect circle. For the scrambled siRNA-transfected cells, the circularity index was 0.61 ± 0.02 ($n = 77$ cells) for the non-stimulated cells, and the circularity index significantly decreased to 0.49 ± 0.01 ($n = 305$ cells) for the cells stimulated with 3 mM ATP and 0.62 ± 0.02 ($n = 104$ cells) for the cells stimulated with 3 mM ATP in the presence of 1 μM emodin (Figure 6C). Such ATP-induced decrease in the circularity index and inhibition by emodin were not observed in the cells transfected with P2X7-siRNA (Figure 5C). Comparative experiments were performed for P2X7-negative MDA-MB-468 cancer cells showing that ATP (3 mM) alone, or in presence of emodin (10 μM) or A438079 (10 μM), had no effect on cell invasiveness (Figure 5D) or on cell morphology (Figure 5E). The invasion capacity of P2X7-positive

A549 non-small cell cancer cells was also analyzed (Supplementary Figure S2, available at *Carcinogenesis* Online). Stimulating these cells with 3 mM ATP induced a 4-fold increase in matrix invasion, which was prevented by the use of emodin (10 μM) or the P2X7 antagonist A438079 (10 μM). Taken together, these results strongly indicate that the P2X7Rs are critically involved in determining the cancer cell invasiveness *in vitro* and the inhibitory action of emodin results from antagonisms of the P2X7Rs.

We finally analyzed the effect of emodin on the MDA-MB-435s cancer cell invasion *in vivo* using the ZF model of micrometastasis (40), which has been used in our recent study to demonstrate the involvement of P2X7R in promoting *in vivo* invasiveness (29). Approximately, 35% of the ZF embryos injected with MDA-MB-435s cells presented more than five cells outside of the yolk sac 48 h after injection, but only 21 and 19% of the embryos presented micrometastases when the MDA-MB-435s cells were treated with 1 and 10 μM emodin, respectively (Figure 6B), resulting in a decrease of the ZF micrometastasis index of $41 \pm 10\%$ and $47 \pm 8\%$, respectively. This indicated that emodin can suppress the micrometastases or *in vivo* invasion of MDA-MB-435s cells. Comparative studies were performed with the injection of P2X7-negative MDA-MB-468 cancer cells and showed that emodin (10 μM) did not reduce the ZF micrometastasis index.

Discussion

The development of metastases importantly relies on, at the cellular level, the ability of cancer cells to degrade, and migrate through, the ECM. P2X7R is an intriguing receptor first characterized as a cytolytic receptor (P2Z) because its sustained activation generally leads to cell death (13,14). It is also responsible for important physiological responses such as triggering the inflammatory signaling cascade after

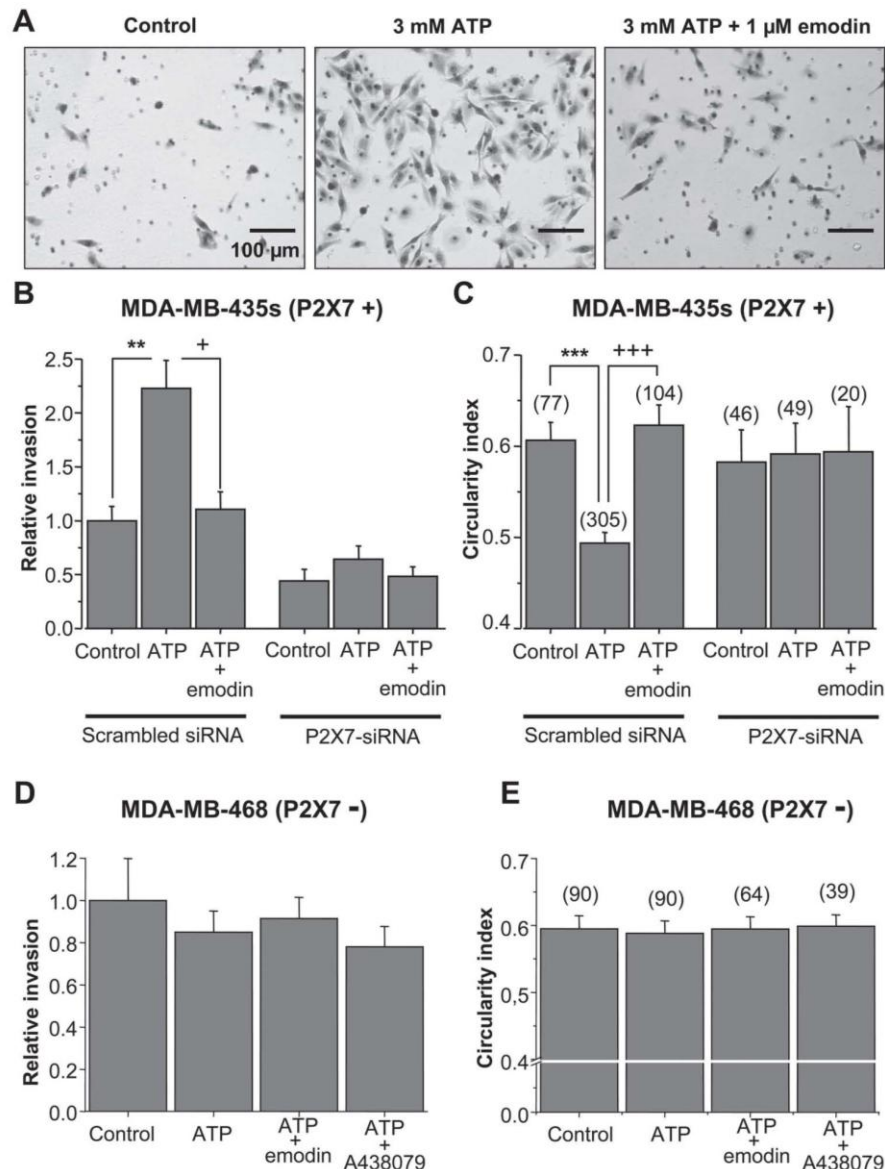


Fig. 5. Inhibition by emodin of P2X7R-induced *in vitro* pro-invasive phenotype of MDA-MB-435s breast cancer cells. (A) Shown are representative images of fixed and hematoxylin-stained MDA-MB-435s (P2X7+) cell invasion on the Matrigel®-coated inserts in the presence of vehicle (control), 3 mM ATP or 3 mM ATP and 1 μ M emodin. The MDA-MB-435s cells were transfected with scrambled siRNA. (B) The summary of the invasion results from eight independent experiments, as the one shown in A, for the MDA-MB-435s cells were transfected with scrambled siRNA or siRNA directed against the expression of the *P2RX7* gene (P2X7-siRNA). The results were expressed relative to the control cells transfected with scrambled siRNA. ** denotes a significant difference from the control at $P < 0.01$, and + a significant difference from the ATP condition at $P < 0.05$, using Mann-Whitney rank sum test. (C) The summary of the circularity index from eight independent experiments, as the one shown in A, for the MDA-MB-435s cells were transfected with scrambled siRNA or P2X7-siRNA. The numbers in bracket indicate the number of cells examined in each case. (D) The invasion of MDA-MB-468 breast cancer cells, not expressing P2X7Rs (P2X7-), was also studied in control condition (vehicle), or under stimulation with 3 mM ATP alone or in presence of emodin (10 μ M) or A438079 (10 μ M; three independent experiments). (E) The summary of the circularity index of MDA-MB-468 cells calculated from experiments and conditions indicated in D was studied. The numbers in bracket indicate the number of cells examined in each case. *** denotes a significant difference from the control at $P < 0.001$, and +++ denotes a significant difference from the ATP condition at $P < 0.001$, using Mann-Whitney rank sum test.

tissue damage or infection (15). Recent studies have shown the P2X7Rs to be expressed at much higher or increased levels in several tumors compared with normal tissues (5,19–25). The only exception, to our knowledge, is the cervical cancer cells in which the P2X7R expression is downregulated (41). Furthermore, some of these studies have reported the P2X7R to exhibit pro-cancerous properties, albeit in different ways depending on the cancer types: imposing antiapoptotic

effects (24) or sustaining cell growth (5,27,42). Our recent study has provided evidence to support that activation of the P2X7Rs promotes cancer cell invasiveness (29). These findings are in line with other studies of thyroid carcinoma (43) and lymphoid neoplasm (44) and taken together support an important role for the P2X7Rs in the development of metastases. This has led to the hypothesis that selective antagonism of the P2X7Rs may represent a new strategy for cancer therapeutics (8).

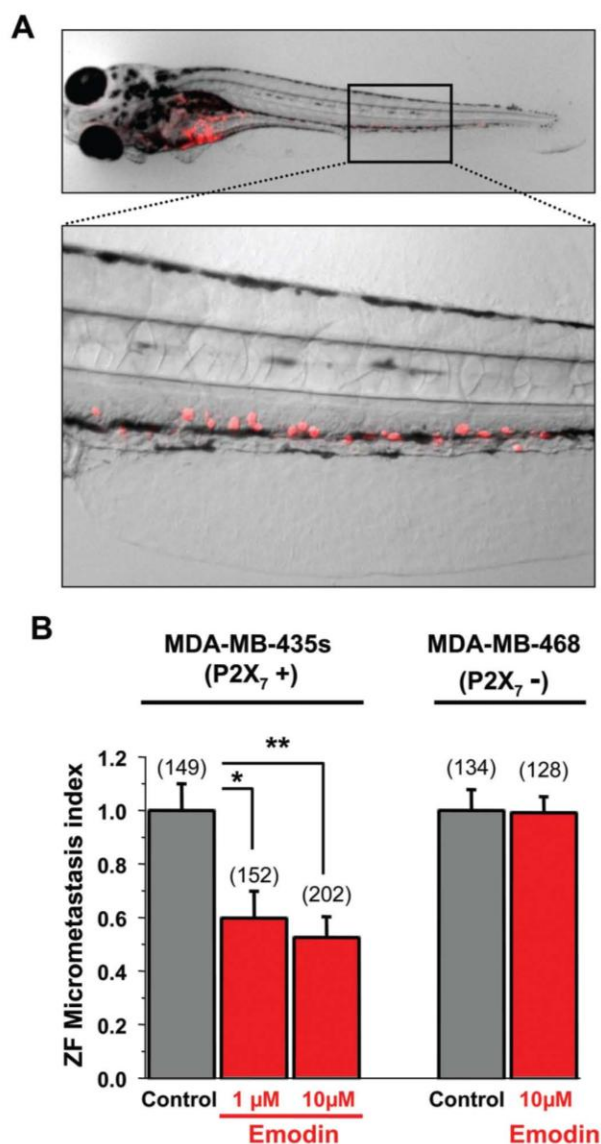


Fig. 6. Inhibition by emodin of the *in vivo* invasiveness of P2X₇-positive MDA-MB-435s and not of P2X₇-negative MDA-MB-468 breast cancer cells. (A) Representative image of a ZF embryo injected with MDA-MB-435s cells and showing micrometastases. A magnification of the highlighted region of the embryo with metastasis is shown below. (B) Mean ZF micrometastasis index of P2X₇-positive MDA-MB-435s cancer cells in the presence of the vehicle (control), or 1 or 10 μM emodin, and of P2X₇-negative MDA-MB-468 cancer cells in the presence of the vehicle (control), or 10 μM emodin. The numbers in bracket indicate the number of embryos examined for each condition from three different experiments. * and ** indicate significant differences from the control condition at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively, using Student's *t*-test.

Emodin is an anthraquinone-derived compound. This and structurally related compounds have been demonstrated to possess anti-tumor properties as well as immune-suppressive abilities (30,31). Our recent study has demonstrated that emodin acts as a potent P2X₇R antagonist, inhibiting rat P2X₇R-mediated Ca^{2+} influx in peritoneal macrophages and also reducing BzATP-induced currents in HEK293 cells heterologously expressing the rat P2X₇R (34). Consistently, we showed in this study that emodin strongly

inhibited the human P2X₇R and ATP-induced Ca^{2+} influx in MDA-MB-435s cells without strong effect on the cell viability (Figure 2B–E). Emodin at 1 μM strongly or completely inhibited ATP-induced ECM proteolysis in these human breast cancer cells (Figure 4). Moreover, emodin prevented ATP-induced increases in the P2X₇-positive breast (Figure 5B) and lung (Supplementary Figure S2, available at *Carcinogenesis* Online) cancer cell invasiveness *in vitro* and the associated changes in cell morphology (Figure 5C), whereas it had no effect on P2X₇-negative MDA-MB-468 cancer cells (Figure 5D and E). Such inhibitory actions by emodin as well as the ATP-induced effects were completely abolished by silencing the P2X₇R expression (Figure 5B–C). Finally, emodin strongly inhibited the P2X₇R-dependent cancer cell invasion *in vivo* (Figure 6). Therefore, this study has provided several lines of consistent evidence to show that emodin suppresses the human cancer cell invasiveness by antagonizing the P2X₇R.

Reactive blue 2 and Cibacron blue are anthraquinone-sulfonic acid derivatives and are known to be effective as non-selective and non-competitive P₂ receptor antagonist (45). Anthraquinone-sulfonic acids are also known to act on many of the enzymes concerned with purine metabolism (46). Alkyl- and aryl-amino-substituted anthraquinone derivatives have also been synthesized recently and one of them was shown to be a potential P2Y₁₂ platelet receptor antagonist (47). We cannot exclude the possibility that emodin could modulate the activity of some P2Y receptors, and especially P2Y₁₂ receptors that can be modulated by anthraquinone derivatives (47). However, the P2Y₁₂ receptors are not expressed in MDA-MB-435s cells (Figure 1B). In addition, in cells expressing P2Y₁₂ receptors but not P2X₇Rs, such as in MDA-MB-468 cells, ATP and emodin, used alone or in combination, had no effect on cell viability or cell migration. Thus, the inhibition by emodin on ATP-induced invasive effects described in this study is highly unlikely to be mediated by the P2Y₁₂ receptor. In this study, emodin has been found to specifically inhibit P2X₇Rs functioning and not the other human P2X receptors expressed as homomers in HEK293T. No inhibitory effect was found in the closely related human P2X₄ receptor, as reported for the rat P2X₄ receptor by our previous study (34). Only a mild effect was found on the hP2X₂ receptor at which emodin, at a maximal concentration of 10 μM, reduced the receptor desensitization.

The discovery of emodin as a potent P2X₇ antagonist with a potent inhibitory action on the human breast and lung cancer invasiveness substantiates the concept that the P2X₇Rs is a promising therapeutic target and suggests emodin as a starting compound for development of lead compounds and ultimately new therapeutic drugs to be used for prevention and treatment of metastatic breast, lung and other cancers.

In conclusion, we have shown that emodin, a compound with known antitumor property, suppresses human breast cancer cell invasiveness *in vitro* and *in vivo* by antagonizing the P2X₇Rs.

Supplementary material

Supplementary Figures 1 and 2 can be found at <http://carcin.oxford-journals.org/>

Funding

Ligue Nationale Contre le Cancer - Conseil Scientifique Inter Régional Grand Ouest; the Association CANCEC; the Ministère de la Recherche et des Technologies; the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM); the Région Centre. Ligue Nationale Contre le Cancer - Comité National (B.J.); University of Tours in 2010 (L.-H.J.).

Acknowledgements

We thank Isabelle Domingo and Catherine Le Roy for technical and administrative assistance, respectively. We thank Prof. Alan R. North (University of

Manchester, UK) for the generous gift of plasmids encoding the human P2X receptors.

Conflict of Interest Statement: None declared.

References

- Parkin, D.M. *et al.* (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA. Cancer J. Clin.*, **55**, 74–108.
- Gupta, G.P. *et al.* (2006) Cancer metastasis: building a framework. *Cell*, **127**, 679–695.
- Burnstock, G. (2006) Purinergic signalling. *Br. J. Pharmacol.*, **147** (suppl. 1), S172–S181.
- Pellegatti, P. *et al.* (2008) Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS ONE*, **3**, e2599.
- Raffaghello, L. *et al.* (2006) The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res.*, **66**, 907–914.
- Wang, X. *et al.* (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat. Med.*, **10**, 821–827.
- White, N. *et al.* (2006) P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.*, **27**, 211–217.
- Roger, S. *et al.* (2011) P2X7 receptor antagonism in the treatment of cancers. *Expert Opin. Investig. Drugs*, **20**, 875–880.
- Rassendren, F. *et al.* (1997) The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.*, **272**, 5482–5486.
- North, R.A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.*, **82**, 1013–1067.
- Roger, S. *et al.* (2008) Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J. Neurosci.*, **28**, 6393–6401.
- Roger, S. *et al.* (2010) C-terminal calmodulin-binding motif differentially controls human and rat P2X7 receptor current facilitation. *J. Biol. Chem.*, **285**, 17514–17524.
- Surprenant, A. *et al.* (1996) The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*, **272**, 735–738.
- Di Virgilio, F. *et al.* (1998) Cytolytic P2X purinoceptors. *Cell Death Differ.*, **5**, 191–199.
- Surprenant, A. *et al.* (2009) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu. Rev. Physiol.*, **71**, 333–359.
- Di Virgilio, F. (2007) Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.*, **28**, 465–472.
- Barberà-Cremades, M. *et al.* (2012) P2X7 receptor stimulation causes fever via PGE2 and IL-1 β release. *FASEB J.*, **26**, 2951–2962.
- Pelegrin, P. (2008) Targeting interleukin-1 signaling in chronic inflammation: focus on P2X(7) receptor and Pannexin-1. *Drug News Perspect.*, **21**, 424–433.
- Adinolfi, E. *et al.* (2002) P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood*, **99**, 706–708.
- Wang, Q. *et al.* (2004) P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **287**, C1349–C1358.
- Zhang, X.J. *et al.* (2004) Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. *Leuk. Res.*, **28**, 1313–1322.
- Slater, M. *et al.* (2004) Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Res. Treat.*, **83**, 1–10.
- Slater, M. *et al.* (2004) Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology*, **44**, 206–215.
- Deli, T. *et al.* (2007) Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int. J. Cancer*, **121**, 55–65.
- Solini, A. *et al.* (2008) Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? *Endocrinology*, **149**, 389–396.
- Slater, M. *et al.* (2005) Expression of the apoptotic calcium channel P2X7 in the glandular epithelium. *J. Mol. Histol.*, **36**, 159–165.
- Di Virgilio, F. *et al.* (2009) P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal.*, **5**, 251–256.
- Adinolfi, E. *et al.* (2012) Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res.*, **72**, 2957–2969.
- Jelassi, B. *et al.* (2011) P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cysteine cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene*, **30**, 2108–2122.
- Huang, H.C. *et al.* (1991) Vasorelaxants from Chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties. *Eur. J. Pharmacol.*, **198**, 211–213.
- Koyama, M. *et al.* (1988) Novel type of potential anticancer agents derived from chrysophanol and emodin. Some structure-activity relationship studies. *J. Med. Chem.*, **31**, 283–284.
- Tabolacci, C. *et al.* (2010) Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16-F10 melanoma cells. *Life Sci.*, **87**, 316–324.
- Chen, Y.Y. *et al.* (2010) Emodin, aloe-emodin and rhein inhibit migration and invasion in human tongue cancer SCC-4 cells through the inhibition of gene expression of matrix metalloproteinase-9. *Int. J. Oncol.*, **36**, 1113–1120.
- Liu, L. *et al.* (2010) Inhibition of ATP-induced macrophage death by emodin via antagonizing P2X7 receptor. *Eur. J. Pharmacol.*, **640**, 15–19.
- Gillet, L. *et al.* (2009) Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **284**, 8680–8691.
- Brisson, L. *et al.* (2011) Na(V)1.5 enhances breast cancer cell invasiveness by increasing NHE1-dependent H(+) efflux in caveolae. *Oncogene*, **30**, 2070–2076.
- Donnelly-Roberts, D.L. *et al.* (2007) Discovery of P2X7 receptor-selective antagonists offers new insights into P2X7 receptor function and indicates a role in chronic pain states. *Br. J. Pharmacol.*, **151**, 571–579.
- Egeblad, M. *et al.* (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 161–174.
- Mohamed, M.M. *et al.* (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **6**, 764–775.
- Marques, I.J. *et al.* (2009) Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. *BMC Cancer*, **9**, 128.
- Li, X. *et al.* (2006) The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **15**, 1906–1913.
- Adinolfi, E. *et al.* (2005) Basal activation of the P2X7 ATP receptor elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 3260–3272.
- Gu, L.Q. *et al.* (2010) Association of XIAP and P2X7 receptor expression with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine*, **38**, 276–282.
- Ren, S. *et al.* (2010) Targeting P2X₇ receptor inhibits the metastasis of murine P388D1 lymphoid neoplasm cells to lymph nodes. *Cell Biol. Int.*, **34**, 1205–1211.
- Ralevic, V. *et al.* (1998) Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 413–492.
- Böhme, H.J. *et al.* (1972) Affinity chromatography of phosphofructokinase using Cibacron blue F3G-A. *J. Chromatogr.*, **69**, 209–214.
- Baqi, Y. *et al.* (2010) Synthesis of alkyl- and aryl-amino-substituted anthraquinone derivatives by microwave-assisted copper(0)-catalyzed Ullmann coupling reactions. *Nat. Protoc.*, **5**, 945–953.

Received July 27, 2012; revised February 11, 2013; accepted March 8, 2013

Supplementary figure S1:

Effect of emodin on the desensitization of ATP-gated currents recorded from HEK293T cells transiently expressing human homomeric P2X1-5 receptors.

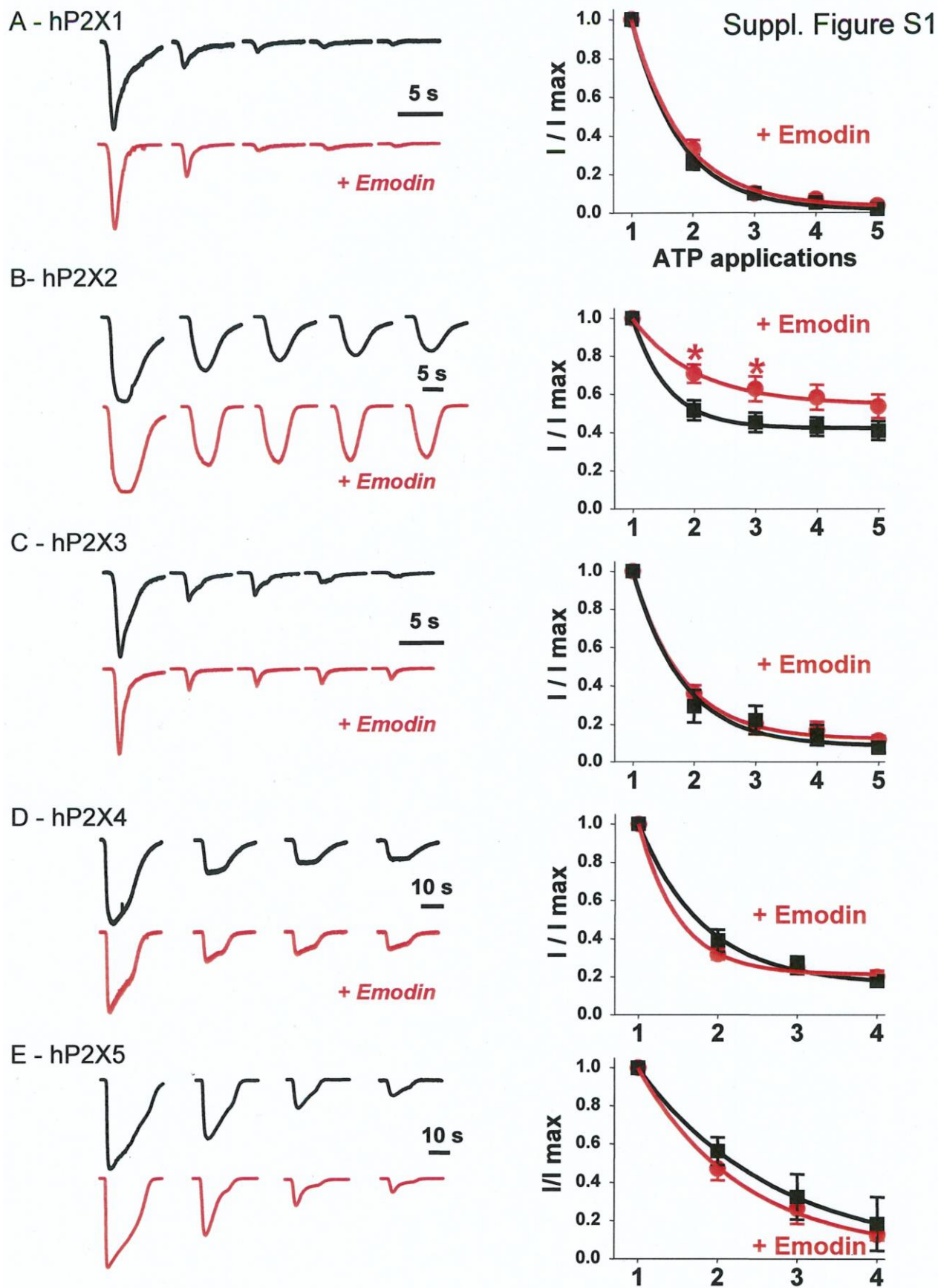
Representative whole-cell current recordings from HEK293T transiently expressing (A) hP2X1 (n= 8 cells in control condition and n= 8 with emodin), (B) hP2X2 (n= 11 cells in control condition and n= 11 with emodin), (C) hP2X3 (n= 8 cells in control condition and n= 8 with emodin), (D) hP2X4 (n= 9 cells in control condition and n= 8 with emodin) and (E) hP2X5 (n= 7 cells in control condition and n= 7 with emodin). All experiments were performed at a holding potential of -60 mV and in response to 5 second- (hP2X1, hP2X2, hP2X3), or 10 second-long (hP2X4 and hP2X5) applications with 10 μ M ATP, for the receptors showing rapid versus slow desensitization, respectively. Experiments were performed in the absence (control) and the presence (red traces) of a maximal concentration of 10 μ M emodin. For all types of receptors studied, multiple ATP applications (from 2 to 5) were performed, separated by 4 minutes intervals in order to study the desensitization rate. The potential effect of emodin was analysed on the desensitizations curves (right panels) built by measuring the maximal current (I) triggered for each ATP application (in presence or not of emodin) divided by the maximal current (I_{max}) recorded at the first application in absence of emodin. The desensitization curve was fitted by a monoexponential decay equation.

*, indicates a significant difference at $p < 0.05$ compared to the control condition without emodin

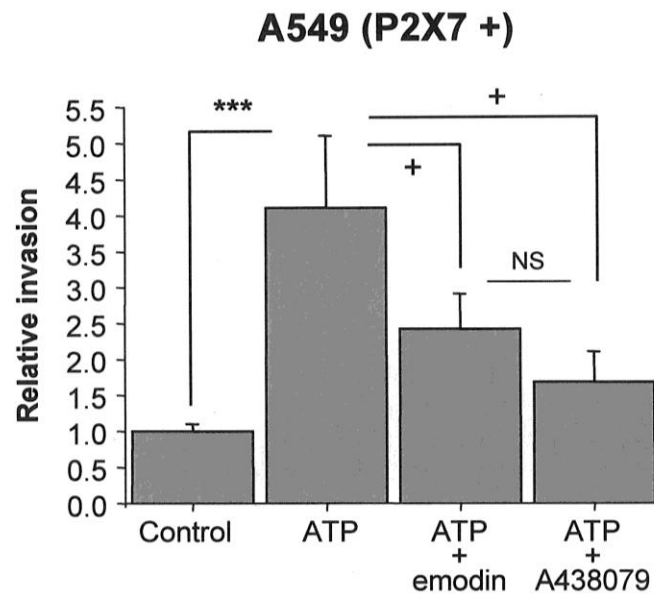
Supplementary figure S2:

Inhibition by emodin of P2X7R-induced *in vitro* pro-invasive phenotype of A549 non-small-cell lung cancer cells.

The invasion of A549 non-small-cell lung cancer cells, expressing P2X7 receptors, was studied in control condition (vehicle), or under stimulation with 3 mM ATP alone or in presence of emodin (10 μ M) or A438079 (10 μ M) (3 independent experiments). *** denotes a significant difference from the control at $p < 0.001$, and ⁺ a significant difference from the ATP condition at $p < 0.05$, using Mann-Whitney rank sum test. NS means not statistically different.



Supplementary Figure S2



C. Résumé

Nous avons montré dans une première étude que l'activation du récepteur P2X₇ potentialise l'invasivité des cellules cancéreuses humaines hautement invasives MDA-MB-435s (Jelassi et al., 2011). L'émodine (1,3,8-trihydroxy-6 méthylanthraquinone), une anthraquinone isolée à partir de la *Rheum officinale* Baill (rhubarbe de chine), présente des propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses. Dans cette étude nous avons testé l'effet de l'émodine sur les propriétés d'invasion des cellules cancéreuses MDA-MB-435s dépendantes du récepteur P2X₇. L'émodine, utilisée à des concentrations non-cytotoxiques, bloque le courant ionique, avec une CE₅₀=3 µM (Concentration efficace 50%), ainsi que l'augmentation de calcium intracellulaire induits par le récepteur P2X₇ mais pas ceux engendrés par les autres récepteurs P2X. Le traitement des cellules MDA-MB-435s avec l'ATP (3 mM) entraîne des modifications morphologiques, augmente l'activité gélatinolytique de 60% et potentialise leur invasivité d'environ 93%. Ces effets, qui ne sont pas observés dans les cellules transfectées avec le siRNA dirigé contre le récepteur P2X₇, sont totalement inhibés en présence de 1 µM émodine. Enfin l'invasivité *in vivo* des cellules MDA-MB-435s, évaluée grâce au modèle de micrométastase sur embryons de poisson zèbre, est diminué de 40% et de 50% en présence de 1 µM et 10 µM émodine respectivement. Cet effet de l'émodine n'est pas observé avec les cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-468 qui n'expriment pas le récepteur P2X₇. Nous avons pu démontrer ainsi, que l'émodine inhibe l'invasion des cellules cancéreuses via l'antagonisme du récepteur P2X₇.

Discussion et perspectives

En fonction des études, des tissus et certainement des modes d'activation des récepteurs P2X₇, ceux-ci se voyaient attribués des rôles pro-apoptotiques ou pro-prolifératifs. Cependant aucune étude ne s'était intéressée à évaluer d'autres paramètres cellulaires, qui pourtant sont importants dans l'évolution tumorale, tels que la migration ou l'invasivité des cellules cancéreuses à travers une matrice extracellulaire. Nous avons pu montrer, à travers la première étude, que les récepteurs P2X₇ sont fortement exprimées et fonctionnels dans les cellules cancéreuses mammaire à haut potentiel métastatique MDA-MB-435s et non dans des lignées épithéliales mammaires non cancéreuses (MCF-10A, 184A1 et HMEC). Par expérience de patch clamp nous avons enregistré, pour des stimulations en ATP extracellulaire (> 300 μ M ATP), sur les cellules MDA-MB-435s un courant cationique entrant présentant une forte facilitation correspondant à l'activation des récepteurs P2X₇. Ce courant cationique s'accompagne d'une forte augmentation de la concentration de calcium intracellulaire (évalué grâce à l'indicateur fluorescent Fluo-4) et d'une augmentation de la perméabilité membranaire pour des stimulations soutenues (ATP = 5 mM) (incorporation d'éthidium). La stimulation des cellules cancéreuses par de très fortes concentrations d'ATP extracellulaire (> 3 mM) induit une légère mort cellulaire, en revanche, des concentrations plus faibles ($\leq$ 3 mM) (encore activant les récepteurs P2X₇) sont responsables de changements morphologiques avec en particulier l'émission de prolongements cellulaires et de pseudopodes. La stimulation des récepteurs P2X₇ induit une augmentation de la migration cellulaire, dépendante du canal SK3, et la dégradation de la matrice extracellulaire par les cathepsines à cystéines aboutissant ainsi à une promotion de l'invasivité cellulaire *in vitro*. Ceci a été confirmé *in vivo* par l'utilisation d'un modèle permettant d'évaluer l'invasivité des cellules cancéreuses dans des embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*). Dans la deuxième étude nous avons montré que l'augmentation du calcium intracellulaire (évalué grâce à l'indicateur fluorescent Fura-2), l'activité gélatinolytique traduisant la protéolyse de la matrice extracellulaire (évalué grâce à la DQ-gélatine), l'invasion *in vitro* et *in vivo* (embryons de poisson zèbre) étaient abolies en présence de l'anthraquinone émodine.

1- Condition d'activation des récepteurs P2X₇

L'augmentation des prolongements cellulaires, la migration et l'invasion cellulaire étaient étudiés après une stimulation des cellules cancéreuses avec des concentrations d'ATP de l'ordre du millimolaire. Cependant, de manière intéressante, lors de l'utilisation des antagonistes du récepteur P2X₇ *in vitro* (KN62 ou A740003), ainsi que lors d'une extinction

de l'expression des récepteurs P2X₇ (siP2X₇) en condition basale (c'est à dire sans stimulation avec l'ATP), ces trois paramètres (extension, migration et invasion cellulaire) étaient diminués (articles 1 et 2). En outre, nous avons observé une diminution des micrométastases dans nos expériences *in vivo* réalisées sur les embryons de poisson zèbre après injection des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-435s en présence d'antagonistes du récepteur P2X₇ comme le composé Abbott A438079 (article 1) ou l'émodine (article 2) et sans aucun apport exogène d'ATP (donc en condition basale également). Ces résultats soulèvent la possibilité d'une activité constitutive du récepteur P2X₇ dans les cellules cancéreuses. Le récepteur P2X₇ semble réguler l'invasivité des cellules cancéreuses dans nos conditions basales de culture.

Nous avons émis deux hypothèses pour expliquer cette activité du récepteur P2X₇ en absence de stimulation externe avec de l'ATP: la première hypothèse consiste à une activité basale du récepteur P2X₇, due à la libération d'ATP par les cellules cancéreuses qui va agir de façon autocrine/paracrine. La deuxième hypothèse pourrait être due à une activité du récepteur P2X₇ indépendante de sa stimulation par l'agoniste et pourrait être aussi indépendante de son activité de canal ionique. La partie carboxyterminale intracellulaire de ce récepteur canal pourrait alors être impliquée via la présence de divers motifs d'interaction protéine-protéine (Costa-Junior et al., 2011; Kim et al., 2001).

L'équipe de Francesco Di Virgilio et d'Elena Adinolfi (à Ferrara), s'est déjà intéressée de très près à la première hypothèse. Cette équipe a montré que la transfection des récepteurs P2X₇ humain dans des cellules HEK, en absence de stimulation avec de l'ATP extracellulaire, augmente le potentiel de membrane mitochondriale de repos, la concentration basale du calcium mitochondrial, le niveau d'ATP intracellulaire et confère aux cellules la capacité de croître en absence de sérum. Cette équipe propose que ces propriétés requéraient la fonction pore des récepteurs P2X₇ et dépendraient d'une stimulation tonique autocrine/paracrine par de l'ATP sécrétée par les cellules. D'autre part, cette équipe a montré qu'une forte stimulation des récepteurs P2X₇ par 3 mM ATP entraîne une chute du potentiel de membrane mitochondriale de repos, une forte augmentation de la concentration basale du calcium mitochondrial, une fragmentation mitochondriale et la mort cellulaire (Adinolfi et al., 2005). Dans une autre étude, cette équipe suggère fortement que dans des conditions physiologiques de repos le récepteur P2X₇ possède une activité basale. Cette activité est due à une libération continue d'ATP dans le milieu extracellulaire et induit une augmentation modérée du calcium intracellulaire. Ce mécanisme stimule le métabolisme cellulaire et la croissance cellulaire. Au contraire une forte activation pharmacologique des récepteurs P2X₇, entraîne

une entrée calcique massive. Ce mécanisme a des effets délétères sur la cellule (Adinolfi et al., 2009).

Adinolfi et ses collaborateurs ont également souligné l'importance des récepteurs P2X₇ dans la croissance tumorale, dans une étude comportant différents modèles *in vivo* (Adinolfi et al., 2012). Dans le premier modèle, ils ont montré que les cellules HEK293 exprimant de façon stable le récepteur P2X₇ humain présentaient un phénotype plus tumorigène par rapport aux cellules HEK293 témoin (transfectées par un plasmide vide). La croissance des tumeurs issues de HEK293 exprimant le récepteur P2X₇ était caractérisée par une prolifération accrue et une réduction de l'apoptose. Ces tumeurs ont également montré avoir un réseau vasculaire plus développé que les tumeurs contrôlent et sécrètent des quantités élevées de VEGF. La vitesse de croissance et la taille des tumeurs étaient significativement réduites par injection intratumorale de l'inhibiteur du récepteur P2X₇ oATP. La croissance et la néo-angiogénèse des tumeurs exprimant le récepteur P2X₇ était inhibé par injection intratumorale de l'anticorps Avastin (bevacizumab) qui bloque le VEGF. Dans un autre modèle *in vivo* dans la même étude, Adinolfi et ses collaborateurs ont trouvé des résultats similaires avec la lignée de cellules de cancer du côlon de souris CT26 exprimant de façon stable les récepteurs P2X₇. La vitesse de croissance et la taille des tumeurs issues des cellules CT26 exprimant les récepteurs P2X₇ étaient significativement plus importantes que les tumeurs issues des cellules CT26 qui sont transfectées par un plasmide vide. La croissance et la néoangiogénèse étaient inhibées par l'oATP. Finalement dans un troisième modèle d'étude *in vivo*, ces auteurs ont utilisé les lignées cellulaires de mélanome B16 et de neuroblastome humain ACN qui expriment les récepteurs P2X₇ de façon native à des niveaux élevés. Ils ont montré que l'inhibition pharmacologique du récepteur P2X₇ (dans la lignée de cellule B16) ou l'extinction de son expression (dans la lignée de neuroblastome ACN) diminuaient la croissance des tumeurs ainsi que la sécrétion de VEGF (Adinolfi et al., 2012).

À la lumière de nos résultats et ceux obtenus par l'équipe italienne, un certain nombre de points nécessitent d'être clarifiés :

- Il serait intéressant de savoir si les récepteur P2X₇ peuvent être actifs en absence de stimulation externe par l'ATP, nous pouvons tester l'invasivité des cellules cancéreuses MDA-MB-435s en présence d'enzymes dégradant l'ATP extracellulaire telles que l'apyrase. Ceci pourrait nous donner des indications quant à l'activité basale du récepteur P2X₇.

Pour déterminer si l'activité basale des récepteurs P2X₇ implique l'extrémité carboxy-terminale et/ou la fonction canal ionique nous pouvons tester l'invasivité des cellules cancéreuses en utilisant des récepteurs P2X₇ mutés. Les cellules cancéreuses mammaires faiblement invasives (MCF-7, MDA-MB-468) n'expriment pas les récepteurs P2X₇. En premier lieu, nous proposons de transfecter ces cellules avec le récepteur P2X₇ humain (variant P2X₇A, de taille maximale, identique à celui des cellules MDA-MB-435s) dans le but de déterminer si ce récepteur est nécessaire et suffisant pour augmenter l'invasivité cellulaire. Ensuite pour déterminer l'importance de l'extrémité C-terminale nous pouvons transfecter les cellules cancéreuses (MCF-7, MDA-MB-468) par exemple avec le variant tronqué B du récepteur P2X₇ humain (P2X₇B) qui ne possède plus d'extrémité C-terminale et par conséquent n'as plus les sites intracellulaires d'interaction avec les molécules de signalisation, mais sa fonction canal ionique reste intacte. Pour déterminer l'importance de la fonction canal, nous proposons aussi de transfecter ces mêmes cellules avec des mutants du récepteur P2X₇ humain, correctement adressé à la membrane, avec gain de fonctions (comme par exemple les mutant H155Y et A348T) et perte de fonctions (comme par exemple les mutants G150R et I568N). Ces mutants ont une sensibilité à l'ATP identique au variant sauvage, une extrémité carboxy-terminale intacte, mais qui présentent des défauts de conductivité ionique (Roger et al., 2010b).

- Non seulement il a été montré que les cellules cancéreuses possèdent des taux d'ATP endogène plus élevés que les cellules saines (Burnstock and Di Virgilio, 2013), mais aussi que l'expression des récepteurs P2X₇ augmente l'ATP intracellulaire (Adinolfi et al., 2005). Nous pourrions voir l'effet de l'expression du récepteur P2X₇ sur la concentration endogène de l'ATP. Pour cela nous pouvons mesurer le taux d'ATP endogène dans notre modèle cellulaire exprimant de façon native le récepteur P2X₇ dans plusieurs conditions : en stimulant ou pas les récepteurs P2X₇ par le BzATP, après extinction de l'expression du récepteur P2X₇ ou l'inhibition de son activité en utilisant des antagonistes spécifiques comme le A438079. L'ATP extracellulaire peut être mesuré dans le surnageant, après une lyse des cellules, en utilisant un Kit de dosage de bioluminescence luciférine/luciférase. Ceci nous permettra de voir si le récepteur P2X₇ module l'ATP intracellulaire dans notre modèle cellulaire. Si c'est le cas, nous pouvons penser que les récepteurs P2X₇ jouent un rôle important dans le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses. Une récente étude a montré que les récepteurs P2X₇ transfectés dans des cellules HEK, participaient dans la modulation du métabolisme cellulaire et modulaient la glycolyse aérobie (Amoroso et al., 2012).

- Il sera intéressant également de savoir si les cellules MDA-MB-435s, comme d'autres cellules cancéreuses, libèrent de l'ATP. Une récente étude a montré l'existence d'un mécanisme de rétroaction positive médiée par le récepteur P2X₇ dans les cellules neuroblastomes de souris N2a sur la libération de l'ATP. Les auteurs de cette étude ont montré que l'activation des récepteurs P2X₇ entraînait la libération, par exocytose, de l'ATP. Ce dernier à son tour active les récepteurs P2X₇ de la même cellule ou des cellules voisines pour stimuler d'avantage sa libération et contrôler négativement la différenciation des cellules N2a (Gutiérrez-Martín et al., 2011). Dans une autre étude dans les cellules du cancer du poumon A549, il a été montré qu'une stimulation par la cytokine TGF-β1 entraînait une libération de l'ATP (Takai et al., 2012). Il a également été montré que l'ATP était accumulé dans des vésicules de sécrétion grâce au transporteur SLC17A9 et que sa libération induite par le TGF-β1 se produisait par exocytose vésiculaire (Takai et al., 2012).

Dans le cas d'une éventuelle libération de l'ATP par les cellules cancéreuses, il serait intéressant de déterminer le mode de sécrétion de cette molécule (par exocytose vésiculaire, à travers des canaux comme la pannexine ou la connexine?...). Il serait également intéressant de déterminer si les récepteurs P2X₇ sont impliqués dans cette libération d'ATP (en stimulant ou pas les récepteurs P2X₇ par le BzATP, après extinction de l'expression du récepteur P2X₇ ou l'inhibition de son activité en utilisant des antagonistes spécifiques comme le A438079). Pour déterminer si la libération de l'ATP se fait par exocytose vésiculaire nous pourrions utiliser le MANT-ATP (2'-/3'-O-(N'-methylantraniloyl)-ATP) un analogue fluorescent de l'ATP. Ce dernier pourrait nous indiquer s'il existe une fluorescence à l'intérieur des vésicules cytoplasmiques. Nous pouvons utiliser, en plus, la microscopie à fluorescence ou confocale, qui permettrait de voir s'il y'a une exocytose d'ATP par les cellules cancéreuses.

- Un point crucial à étudier est la mesure de la concentration d'ATP périmembranaire. En effet, de plus en plus d'études suggèrent que les cellules sont entourées par un halo d'ATP, avec la concentration la plus élevée dans la couche membranaire près de la surface cellulaire (Falzoni et al., 2013). Des preuves expérimentales indirectes suggèrent que dans l'halo péricellulaire la concentration en ATP est suffisante pour maintenir la plupart des récepteurs P2 dans un état d'activation tonique, le récepteur P2X₇ inclus, au point que certains de ces récepteurs pourrait même être partiellement désensibilisés (Falzoni et al., 2013). Les techniques classiques de mesure d'ATP extracellulaire telles que l'utilisation d'un kit de dosage de bioluminescence luciférine/luciférase ne donne qu'une estimation indirecte du niveau que l'ATP peut atteindre sur les sites de libération près de la membrane plasmique.

Nous pourrions transfecter les cellules cancéreuses avec un vecteur contenant le gène d'une sonde membranaire dérivée de la luciférase. Cette sonde appelée pmeLUC est exprimée au niveau de la membrane plasmique avec le site catalytique face au milieu extracellulaire. De cette façon la sonde pmeLUC permet de mesurer l'augmentation de l'ATP suite à une libération transitoire dans le proche voisinage de la membrane plasmique (Falzoni et al., 2013). Une telle sonde nous permettra ainsi de déterminer la concentration réelle de l'ATP au plus près de la membrane et de déterminer si les récepteurs P2X₇ sont en constante activation? S'ils sont activés de façon tonique ou phasique?

2- Rôle du récepteur P2X₇ dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et la morphologie cellulaire

Dans de nombreux types cellulaires, l'activation prolongée des récepteurs P2X₇ se traduit par des événements morphologiques tels que le bourgeonnement de la membrane plasmique (Mackenzie et al., 2005; Roger et al., 2008) ou le rétrécissement des cellules (*cell shrinkage*) avec une perte de prolongements cellulaires (Raffaghello et al., 2006). Nos expériences ont révélé que l'activation des récepteurs P2X₇ dans les cellules cancéreuses MDA-MB-435s induisait l'émission des prolongements cellulaires et de pseudopodes (article 1). Des résultats similaires ont été obtenus par une autre équipe, sur trois lignées de cellules cancéreuses prostatiques (1E8, 2B4 et DU-145). Les auteurs ont montré que l'ATP (100 µM) augmentait le nombre ainsi que la longueur des filopodes et des lamellipodes formés par la polymérisation d'actine. Ils ont également constaté que l'ATP entraînait une élévation significative de l'activité de Rac1 et Cdc24, des GTPases de la famille Rho, connue pour leurs implications dans les changements d'organisation du cytosquelette d'actine, dans les cellules 2B4 et 1E8 mais pas dans les DU-145. Les auteurs proposent que ce processus pourrait impliquer d'autres GTPases de la famille Rho comme Rif ou RhoD dans la lignée DU-145 (Zhang et al., 2010). Les auteurs ont étudié l'effet de l'ATP sur la morphologie cellulaire. Cependant ils n'ont pas identifié les récepteurs impliqués dans ces changements de morphologie. Dans une autre étude, Mackenzie et ses collaborateurs ont montrés que l'activation des récepteurs P2X₇ de rat transfectés dans des cellules HEK293, induisaient un réarrangement de cytosquelette d'actine et un "blebbing" membranaire (Mackenzie et al., 2005). Une autre étude a montré également que l'activation des récepteurs P2X₇ des macrophages murins RAW 264.7 stimule la réorganisation de cytosquelette d'actine et

simultanément le bourgeonnement membranaire via les protéines Rho et p38 MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) (Pfeiffer et al., 2004).

Dans notre étude nous n'avons pas identifié les voies de signalisation régissant les modifications morphologiques observées suite à l'activation des récepteurs P2X₇ dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-435s. Il a été montré que des protéines Rho (Rho A, Rho B, Rac1 et Cdc 42) étaient surexprimées dans des tumeurs de sein (Fritz et al., 2002) et il a été suggéré que ces GTPases interviennent dans la progression tumorale (Symons and Segall, 2009). Le rôle des protéines de la famille Rho dans l'agressivité des cellules cancéreuses implique la réorganisation du cytosquelette d'actine, qui contrôle plusieurs processus en rapport avec la migration cellulaire tel que l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Nous proposons alors d'étudier les voies de signalisation impliquées dans ces effets et en particulier de tester si des GTPases de la famille Rho sont impliquées dans la formation des fibres de stress et la réorganisation de cytosquelette d'actine lors de l'activation des récepteurs P2X₇. Il a été reporté que les récepteurs P2X₇ peuvent activer la protéine Rho A et, en aval, ses effecteurs ROCKs dans les cellules HEK293 exprimant de façon hétérologue le récepteur P2X₇ humains et dans les macrophages murins BAC1 (Verhoef et al., 2003).

3- Rôle du récepteur P2X₇ dans la migration des cellules cancéreuses

Nous avons montré que l'activation des récepteurs P2X₇ augmente la migration des cellules cancéreuses MDA-MB-435s (article 1). Une étude menée sur les cellules C6 de gliome de rat montre des résultats similaires. Cette étude montre que le récepteur P2X₇ est exprimé (ARNm) et bien fonctionnel (mesure du calcium intracellulaire et l'incorporation de l'éthidium bromide) dans les cellules C6 de gliome de rat. Ils ont également montré que l'exposition chronique (pendant 8h) du BzATP (300 µM) augmente l'expression protéique des récepteurs P2X₇, mais également l'expression transcriptionnelle de facteurs pro-inflammatoires tels que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), IL-8 et le VEGF (Wei et al., 2008). Les auteurs ont montré que la stimulation chronique des récepteurs P2X₇ par le BzATP (500 µM pendant 72h) n'induisait pas de dommage cellulaire. La stimulation des récepteurs P2X₇ par le BzATP (300 µM) entraînait une augmentation de la migration des cellules C6 (Wei et al., 2008). Une autre étude intéressante utilisant les cellules du cancer du poumon A549 comme modèle cellulaire, montre que le TGF-β1, induit la migration des cellules cancéreuses à travers le remodelage de cytosquelette d'actine et la formation des

fibres de stress. Ces phénomènes semblent impliquer les récepteurs P2X et spécialement le récepteur P2X₇, car l'inhibition de l'expression des récepteurs P2X₇ (siP2X₇) ou la présence d'antagonistes spécifiques de ces récepteurs (A438079), diminuaient la migration induite par le TGF-β1 (Takai et al., 2012). Les auteurs émettent l'hypothèse que la migration des cellules A549 médiée par le TGF-β1 pourrait impliquer l'activation de voies de signalisations comme JNK (*Jun N-terminal Kinase*) et les kinases Rho suite à l'activation du récepteur P2X₇.

Les propriétés migratoires et invasives des cellules cancéreuses épithéliales sont associées à une perte des caractéristiques épithéliales (perte de la cohésion intercellulaire) et l'acquisition de caractéristiques mésenchymateuses (augmentation des propriétés migratoires, remodelage de la matrice extracellulaire). Ce concept est connu sous le nom de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). L'un des événements initiateurs de la TEM est la perte de l'expression de l'E-cadhérine, une protéine clef des jonctions adhérentes. Parallèlement à cette diminution, il est souvent observé une augmentation de l'expression de la molécule d'adhérence cellule-cellule N-cadhérine (marqueur mésenchymateux). En effet, la perte de l'expression de l'E-cadhérine est suffisante pour induire la migration et l'invasion des cellules cancéreuses aboutissant à la progression tumorale *in vitro* et *in vivo* (Wendt et al., 2011). La perte de l'expression de cette protéine peut être la conséquence d'une mutation ou d'un processus de méthylation des séquences promotrices. L'extinction du gène de l'E-cadhérine peut également être la conséquence de l'induction ou de l'activation de différentes familles de facteurs de transcription, incluant les protéines Twist, E47, les protéines de la famille Snail (Snail1 et Snail2), ainsi que les protéines ZEB1 et ZEB2 (Yilmaz and Christofori, 2010). Il sera intéressant d'étudier l'expression de l'E-cadhérine et la N-cadhérine, en fonction de l'activation des récepteurs P2X₇ par l'ATP et/ou son inhibition par des antagonistes spécifiques. Dans le cas d'une éventuelle implication des récepteurs P2X₇ dans la régulation de l'expression de ces cadhérines, il sera également intéressant de déterminer les voies de signalisation impliquées. Par exemple, nous pourrions voir si les facteurs de transcriptions comme Twist, Snail sont impliqués...?

4- Rôle du récepteur P2X₇ dans l'invasivité des cellules cancéreuses

Nous avons montré que l'activation des récepteurs P2X₇ augmente massivement l'invasivité des cellules cancéreuses humaines mammaires à travers une matrice extracellulaire (*in vitro*) et que le récepteur P2X₇ stimule la formation de micrométastases *in vivo* (embryons de poisson zèbre) (articles 1 et 2). Nos résultats sont en accords avec ceux

obtenus dans une étude sur les cellules de lymphome macrophage-like murine P388D1 (Ren et al., 2010). Les auteurs ont montré que ce modèle cellulaire exprimait l'ARNm (RT-PCR) et la protéine (cytométrie en flux et immunofluorescence) des récepteurs P2X₇. Ils ont également montré que les récepteurs P2X₇ étaient bien fonctionnels (influx calciques). L'extinction de l'expression des récepteurs P2X₇ (shRNA) ou l'inhibition de l'activité des récepteurs P2X₇ par un anticorps bloquant dirigé contre P2X₇, réduisaient significativement la formation des métastases des cellules lymphoïdes néoplasiques dans les ganglions lymphatiques. De plus le groupe de souris injectées avec des cellules qui n'expriment plus le récepteur P2X₇ ou dont l'activité était bloquée par l'anticorps dirigé contre P2X₇, présente un temps de survie plus important que le groupe témoin. Les auteurs suggèrent que l'inhibition de l'expression et de la fonctionnalité des récepteurs P2X₇ atténue la capacité des cellules P388D1 à former des métastases, et que le récepteur P2X₇ pourrait représenter une cible potentielle pour des thérapies anti-métastatiques (Ren et al., 2010).

Tafani et ses collaborateurs ont démontré que, dans des conditions de stress hypoxique, le récepteur RAGE (*receptor for advanced glycation end products*) et le récepteur P2X₇ était surexprimé dans les cellules mammaires MDA-MB-231 et MCF-7 ainsi que dans les cellules HELA du cancer du col de l'utérus (Tafani et al., 2011a). La même équipe a déjà constaté une augmentation d'expression de RAGE ainsi que du récepteur P2X₇ dans plusieurs biopsies de tumeurs humaines telles que le sein, la prostate et le glioblastome (Tafani et al., 2011b). La surexpression des deux récepteurs semblait nécessaire pour maintenir l'invasion de ces cellules cancéreuses en présence de 100 µM de BzATP (pour le récepteur P2X₇) et de HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*, pour RAGE). Les auteurs ont également montré que cette augmentation impliquait la phosphorylation de Akt et Erk1/2 conduisant ainsi à la translocation de NF-κB dans le noyau. Une fois dans le noyau, le NF-κB maintiendrait l'augmentation de l'expression de RAGE et du récepteur P2X₇ ainsi que celle des métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9, contribuant ainsi à la survie et à l'invasion des cellules cancéreuses (Tafani et al., 2011a).

- **Implication des récepteurs P2X₇ dans la protéolyse de la matrice extracellulaire : rôle des cathepsines à cystéines**

Nous avons montré que la dégradation de la matrice extracellulaire dépendante de l'activation des récepteurs P2X₇, résultait de la libération de formes matures de cathepsines à cystéine dans l'environnement extracellulaire (cathepsines B, S, L, K et H) (article 1). De façon intéressante, il a été montré dans une étude que la stimulation des récepteurs P2X₇ des

macrophages était responsable d'une libération lysosomiales de cathepsines et d'un remodelage de la matrice extracellulaire (Lopez-Castejon et al., 2010). Une autre étude a montré également que l'activation des récepteurs P2X₇ induisait la migration des cellules gliales par la libération de la cathepsine B. Cette dernière dégrade l'inhibiteur tissulaire de la métalloprotéinase-1 (TIMP-1) induisant ainsi l'augmentation de l'activité de la MMP-9 (Murphy and Lynch, 2012).

Dans une cellule normale, les cathepsines à cystéine sont principalement localisées dans le lysosome alors que, dans la cellule cancéreuse, les cathepsines peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire. Nous n'avons pour le moment aucune idée sur l'origine compartimentale des cathepsines à cystéines libérées dans le milieu extracellulaire par les cellules hautement invasives MDA-MB-435s. S'agit-il d'une fusion des lysosomes ou d'autres types de vésicules avec la membrane cellulaire? Dans le but de déterminer la localisation intracellulaire ainsi que le relargage des cathepsines vers le milieu extracellulaire, une approche pourrait être réalisée par l'étude en microscopie à fluorescence ou confocale des cellules MDA-MB-435s marquées avec des anticorps fluorescents dirigés contre les cathepsines ou des substrats fluorogéniques des cathepsines, et en présence d'autres marqueurs (marqueurs des lysosomes et d'endosomes tardives comme LAMP1 (*Lysosomal-associated membrane protein 1*), l'acridine orange, qui s'accumule et émet une fluorescence rouge dans le compartiment acide des lysosomes intacts, alors qu'il donne une coloration verte dans d'autres compartiments moins acides, marqueur d'endosomes précoce EEA1). Ces expériences permettraient de déterminer l'origine compartimentale des cathepsines et aussi leur voie de libération. Il serait intéressant de savoir aussi si les formes actives des cathepsines à cystéines proviennent d'une maturation intracellulaire ou extracellulaire et si cela implique d'autres protéases?

Etant donné que l'activation des récepteurs P2X₇ entraîne un mouvement cationique non sélectif (Na⁺, Ca²⁺, K⁺), ceci soulève la question d'une éventuelle implication de ces ions dans la régulation de l'activité et le relargage des cathepsines ainsi que l'invasivité des cellules cancéreuses. Lopez-Castejon et collaborateurs, ont montré que la libération de la cathepsine B par les macrophages en réponse à l'activation du récepteur P2X₇ dépendait au moins du calcium intracellulaire (Lopez-Castejon et al., 2010). Le même mécanisme dépendant du calcium semble impliqué dans la libération des cathepsines par les cellules gliales (Murphy and Lynch, 2012). Il serait intéressant de pouvoir déterminer si les espèces ioniques transitant au travers du récepteur P2X₇ sont importantes dans la régulation de la libération des cathepsines à cystéines et dans l'invasivité des cellules cancéreuses, et

éventuellement quelle espèce ionique jouent un rôle dans ces processus (Est-ce l'entrée de calcium ou le sodium, est-ce la sortie du potassium?). Pour cela nous proposons d'étudier (par western blot et dosage d'activité protéolytique) les cathepsines relarguées par les cellules cancéreuses MDA-MB-435s cultivées dans un milieu de culture dont les concentrations en Ca^{2+} , Na^{+} et K^{+} sont modifiées. Par exemple pour voir si le calcium régule le relargage et/ou l'activité des cathepsines nous pouvons rajouter dans le milieu des chélateurs calciques tels que le BAPTA ou l'EGTA.

Les invadopodes sont des organelles spécifiques des cellules invasives correspondant à des structures protrusives dans la matrice extracellulaire dont l'activité dépend de la réorganisation du cytosquelette d'actine, de l'accumulation et du relargage de nombreuses protéases (Sakurai-Yageta et al., 2008). Ces structures, riches en F-actine, sont ainsi capables de dégrader la matrice extracellulaire. Les invadopodes sont retrouvés sur la face ventrale des cellules cancéreuses invasives cultivées *in vitro* sur une matrice en deux dimensions. Leur existence dans un environnement en trois dimensions et *in vivo* est en cours d'étude (Ridley, 2011). Des structures similaires nommées podosomes ont été décrites dans des cellules normales présentant une activité de remodelage de la matrice extracellulaire (cellules immunitaires, fibroblastes, ostéoclastes) (Ridley, 2011). Nous voulons savoir s'il existe une localisation membranaire préférentielle des récepteurs P2X_7 au niveau de ces structures bien spécifiques, ou si les récepteurs P2X_7 sont uniformément répartis sur la surface membranaire. Des expériences préliminaires de séparation des fractions riches en invadopodes, des fractions membranaires, indiquent que le récepteur P2X_7 serait présent dans les fractions riches en invadopodes (**Figure 15**).

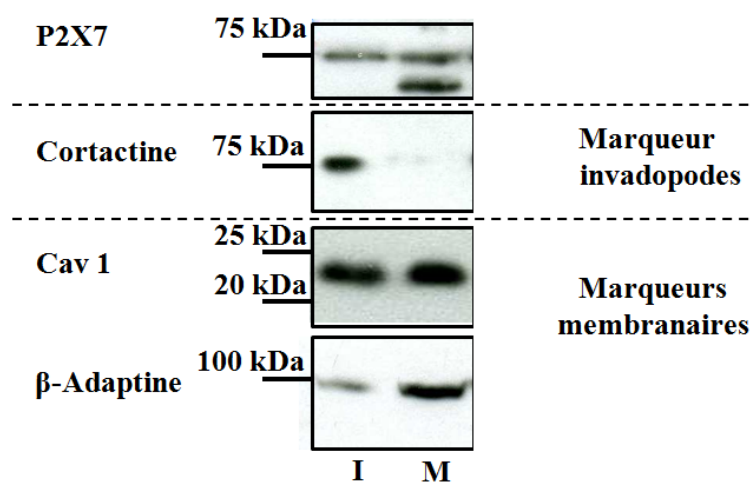


Figure 15 : Etude en western blot de l'expression des récepteurs P2X_7 dans les cellules MDA-MB-435s dans les fractions membranaires (M) et enrichies en invadopodes (I).

Les invadopodes (I) étaient piégés dans une matrice contenant 2% de gélatine et ont été fractionnés et séparés des fractions membranaires (toutes membranes). La qualité des fractions a été évaluée à l'aide d'un marqueur d'invadopodes (cortactine) et deux marqueurs membranaires (β -Adaptine et cavéoline 1).

Nous souhaiterions utiliser d'autres marqueurs connus et spécifiques de la fraction enrichie en invadopodes (comme FAK (*focal adhesion kinase*) et MT1-MMP) ainsi que des marqueurs cytosoliques (comme le Hsc70 et la β -actin) dans le but de s'assurer de la qualité de séparation. Nous souhaiterions appuyer nos résultats de fractionnement par des expériences de microscopie (épifluorescence, confocale et électronique) en montrant la présence des récepteurs P2X₇ au niveau de la membrane des invadopodes. Nous souhaiterions également vérifier si les récepteurs P2X₇ sont impliqués dans la formation des invadopodes et s'ils conditionnent leurs activités de dégradation de la matrice extracellulaire par le relargage des cathepsines à cystéines. Pour étudier ce point, nous proposons de cultiver les cellules cancéreuses MDA-MB-435s (en stimulant ou pas les récepteurs P2X₇ par l'ATP, ou après extinction de l'expression du récepteur P2X₇ ou l'inhibition de son activité en utilisant des antagonistes spécifiques comme le A438079) sur des chambres de culture tapissées d'une fine couche de matrigel[®] composées de DQ-gélatine[®]. Ce dernier sera utilisé comme substrat fluorogénique pour indiquer les points de dégradation. Nous pouvons également utiliser des marqueurs spécifiques des invadopodes.

5- Effets de l'hypoxie ou de l'ischémie sur le fonctionnement du récepteur P2X₇

Les conditions de culture *in vitro* sont différentes des conditions dans lesquelles se trouvent les cellules cancéreuses *in vivo*. *In vitro*, les lignées cellulaires baignent dans des milieux de culture qui sont certainement beaucoup plus riches en nutriments par rapport à ce que peut recevoir une cellule au sein d'une tumeur. En plus, le taux d'oxygène apporté et dissout (pO₂) dans le milieu est certainement plus élevé qu'au sein de la tumeur, dans laquelle la plupart des cellules se trouvent dans des conditions d'hypoxie (pO₂ < 10 mmHg). Il serait intéressant de se placer dans des conditions de stress cellulaire : priver les cellules cancéreuses MDA-MB-435s de sérum pendant 24h pour mimer des conditions d'ischémie ou cultiver les cellules dans des chambres d'hypoxie pour mimer les effets de l'hypoxie. Nous pourrions déterminer dans ces conditions, très proches des conditions tumorales, plusieurs paramètres tels que l'expression, ainsi que l'activité des récepteurs P2X₇ (mesure du courant, mesure calciques...), les concentrations d'ATP relargées par les cellules, la migration et l'invasion cellulaire...

Peu d'études se sont intéressées à étudier les récepteurs P2X₇ dans des conditions d'hypoxie. Une étude récente a montré qu'un environnement à pH faible, afin de mimer

l'acidose fréquemment observée dans les tumeurs solides en hypoxie, induit la libération d'ATP à partir de cellules de mélanome B16, qui agit via les récepteurs P2X₇ pour augmenter la prolifération cellulaire (Hattori et al., 2012). L'utilisation d'un antagoniste du récepteur P2X₇, oATP, diminue significativement la prolifération cellulaire *in vitro* et également inhibe significativement la croissance tumorale chez des souris inoculées avec des cellules B16 de mélanome (Hattori et al., 2012). Tafani et ses collaborateurs se sont également intéressés à l'effet du stress hypoxique sur les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MCF-7 ainsi que les cellules Hela du cancer du col de l'utérus. Ils ont montré que les récepteurs P2X₇ étaient surexprimés dans ces conditions et induisaient l'invasion des cellules cancéreuses. La surexpression des récepteurs P2X₇ dans les conditions hypoxiques semblait faire intervenir une voie de transcription dépendante du facteur HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor-1 α*) (Tafani et al., 2011a).

L'activation du facteur de transcription HIF-1 α représente la principale signalisation mise en place en réponse à l'hypoxie et sa stabilisation est communément rencontrée dans les cancers humains et est souvent associée à un pronostic défavorable (Tang and Yu, 2013). Les résultats de Tafani et ses collaborateurs montrent que les récepteurs P2X₇ pourraient être des cibles de HIF-1 α . Cependant il n'existe pas d'information sur une interaction possible entre HIF-1 α et les récepteurs P2X₇, à l'exception d'une étude récente qui montre que l'expression de HIF-1 α était élevée dans des cellules HEK qui surexpriment les récepteurs P2X₇ humain, par rapport à des cellules HEK qui sont transfectées par des plasmides vides (Amoroso et al., 2012). Par conséquent, Il sera intéressant d'étudier également ce point et de voir dans des conditions hypoxiques, la stabilisation de ce facteur de transcription et de chercher s'il module l'expression des récepteurs P2X₇. Si oui, par quels mécanismes ? Est-ce qu'il existe, par exemple, une potentielle séquence HRE (*Hypoxia responsive element*) dans le promoteur du gène P2X₇ (*P2RX7*)? Est-ce que HIF fait intervenir d'autres facteurs de transcriptions qui eux vont moduler l'expression des récepteurs P2X₇ ?

Nous avons commencé à chercher une potentielle séquence HRE dans le promoteur du gène humain de P2X₇ (*P2RX7*) (5,5 Kb), grâce au logiciel "MatInspector" (logiciel bioinformatique qui permet l'identification des sites de liaison de facteurs de transcriptions au niveau des séquences d'ADN). Les résultats indiquent qu'il existe 7 séquences consensus susceptible de fixer le HIF.

6- L'implication des récepteurs P2X₇ dans l'invasivité des cellules cancéreuses *in vivo*, la croissance cellulaire et la formation des métastases :

Le microenvironnement de la tumeur joue un rôle important à différents stades du développement tumoral et donc peut influencer le devenir de la tumeur. Toutefois la tumeur influence elle-aussi le microenvironnement tumoral (Grivennikov et al., 2010). Plusieurs types de cellules inflammatoires et immunitaires sont fréquemment présents au sein de la tumeur (macrophages, neutrophiles, mastocytes, cellules dendritiques, lymphocytes NK, lymphocytes T et B). Les cellules immunitaires les plus fréquemment trouvées dans le microenvironnement de la tumeur sont les macrophages et les lymphocytes T (Grivennikov et al., 2010). Les cellules immunitaires infiltrant la tumeur ont pour but initiale d'empêcher le développement tumoral. Cependant, ils peuvent également participer à l'évolution cancéreuse. La plupart des cellules immunitaires expriment les récepteurs P2X₇. Il est connu que ces récepteurs jouent un rôle important dans la réponse immunitaire. Ils sont impliqués dans l'assemblage de l'inflammasome et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Di Virgilio, 2007). Il a été également reporté que les récepteurs P2X₇ sont impliqués dans la présentation d'antigène (dans les cellules dendritiques chez la souris) ainsi que dans la différenciation et la prolifération des lymphocytes (Di Virgilio, 2012). À travers ces diverses fonctions, les récepteurs P2X₇ peuvent participer à activer la réponse immunitaire anticancéreuse. Toutefois, d'autres études ont attribué d'autres fonctions aux récepteurs P2X₇ exprimés à la surface des cellules immunitaires. Il a été montré que la stimulation des récepteurs P2X₇ est responsable d'une libération, par des macrophages, de cathepsines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Lopez-Castejon et al., 2010). Par ailleurs, l'ATP extracellulaire en activant les récepteurs P2X₇, induit la mort des lymphocytes T périphériques (Tsukimoto et al., 2006). Ces données pourraient suggérer un rôle pro-tumoral des récepteurs P2X₇ exprimé dans les cellules immunitaires. Nous pouvons imaginer que les cathepsines relarguées par les macrophages suite à l'activation des récepteurs P2X₇, peuvent dégrader d'avantage la matrice extracellulaire et faciliter ainsi la dissémination des cellules cancéreuses et la formation des métastases. Nous pouvons aussi penser que la mort des cellules T, causée par les récepteurs P2X₇, pourrait altérer le système immunitaire, ce qui pourrait affaiblir l'aptitude à inhiber les métastases. Nous pouvons, par conséquent envisager que les récepteurs P2X₇ exprimés par les cellules immunitaires infiltrants la tumeur pourraient jouer d'autres rôles au sein de la tumeur.

Un certain nombre de questions nécessitent d'être clarifiées :

- Quelle est le rôle joué par les récepteurs P2X₇ dans la croissance et la progression tumorale *in vivo*, qu'ils soient exprimés par les cellules cancéreuses ou par les cellules de l'hôte et en particulier par les cellules immunitaires?
- Pourrait-on cibler les récepteurs P2X₇ au sein de la tumeur par des antagonistes pharmacologiques? Quels sont les effets attendus de cette inhibition sur la tumeur (Effets pro-cancéreux ou anti-cancéreux), sachant que les récepteurs P2X₇ du système immunitaire seront également une cible de ces antagonistes.

Dans le but de répondre à ces questions, nous pourrions développer un modèle *in vivo* de greffe orthotopique (dans le bourgeon épithélial mammaire) et syngénique en utilisant des lignées cancéreuses mammaires murines (4T1 et EMT6 issues de la souris BALB/c) chez la souris BALB/c sauvage (WT) ou qui n'exprime pas les récepteurs P2X₇ (P2X₇ KO).

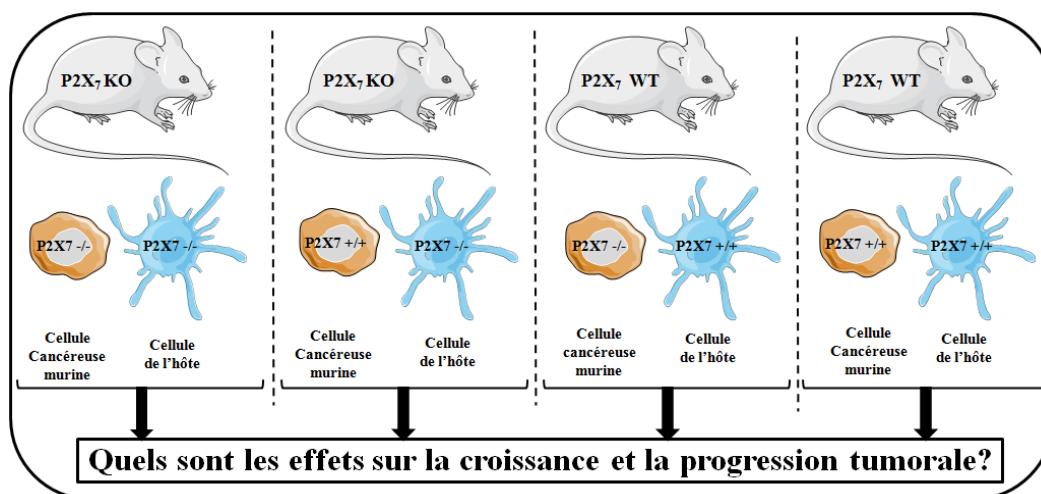


Figure 16 : Modèle *in vivo* de greffe orthotopique en utilisant des cellules cancéreuses mammaires murines chez la souris BALB/c

Les cellules cancéreuses mammaires murines 4T1 et EMT6 seront modifiées génétiquement (pour exprimer ou non les récepteurs P2X₇ et pour exprimer également le gène de la luciférase). Ces mêmes cellules seront injectées dans les souris syngéniques BALB/c WT (dont les cellules du système immunitaire expriment les récepteurs P2X₇ = P2X₇ +/+) et dans les souris P2X₇ KO (dont les cellules du système immunitaire n'expriment pas les récepteurs P2X₇ = P2X₇ -/-). Cette étude nous permettra d'étudier le rôle joué par les récepteurs P2X₇ dans la croissance et la progression tumorale *in vivo*.

Les lignées cancéreuses 4T1 et EMT6 sont classiquement utilisées pour l'étude de la croissance tumorale mammaire et du développement des métastases dans des modèles syngéniques murins. Cependant, aucune caractérisation complète des récepteurs purinergiques sur ces cellules n'a été réalisée à ce jour. Nous avons commencé à étudier le profil d'expression des récepteurs purinergiques (P2X et P2Y) dans les cellules cancéreuses mammaires murines EMT6 et 4T1. Les résultats des profils d'expression des récepteurs P2X

obtenus par RT-PCR non quantitative indiquent que ces deux lignées expriment des ARN messagers codant pour les récepteurs P2X₇, mais aussi les ARN messagers pour les récepteurs P2X₂, P2X₃, P2X₄ et à un niveau plus faible pour le récepteur P2X₅ (Les contrôles positifs des amorces des récepteurs P2X ont été réalisées à partir d'échantillons provenant de monocytes dérivés de la moelle osseuse de la souris) (**Figure 17-A**). Nous avons vérifié l'expression protéique (western blot) des récepteurs P2X₇ dans ces deux lignées cellulaires. Les cellules cancéreuses mammaires EMT6 et 4T1 expriment la protéine du récepteur P2X₇ (**Figure 17-B**).

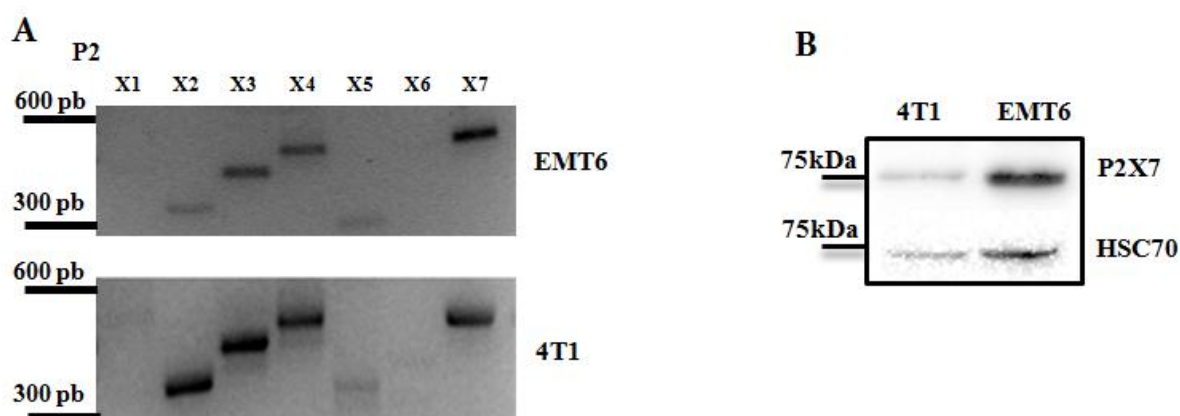


Figure 17 : Caractérisation du profil d'expression des récepteurs purinergiques sur les deux lignées cellulaires EMT6 et 4T1

A- Profil d'expression en ARN messagers des récepteurs P2X des deux lignées cellulaires cancéreuses murines EMT6 et 4T1, obtenus par RT-PCR non quantitative. **B-** Etude en western blot de l'expression protéique du récepteur P2X₇ dans les cellules EMT6 et les cellules 4T1. L'expression de la protéine Hsc70 a été utilisée comme contrôle de dépôt.

Nous avons étudié par la suite la fonctionnalité (par patch clamp) des récepteurs P2X₇ dans les deux lignées cancéreuses EMT6 et 4T1. Les expériences de patch clamp en configuration cellule entière sur les cellules cancéreuses mammaires murines EMT6 isolées montrent, pour un potentiel de maintien de -60 mV, que l'application pendant 10 secondes de 10 μ M d'ATP, une concentration censée activer les récepteurs P2X₂, P2X₃, P2X₄, P2X₅ mais pas les récepteurs P2X₇, ne donne pas de courant entrant (**Figure 18-A**). L'application de 5 mM d'ATP susceptible d'activer les récepteurs P2X₇, montre un courant entrant qui est inhibé en présence de l'antagoniste du récepteur P2X₇ A438079 (10 μ M) (**Figure 18-B**). Ceci confirme que le courant enregistré correspond à une activité de type P2X₇. Nous avons par ailleurs réalisé d'autres mesures supplémentaires (**Figure 18-C**) et déterminé l' EC_{50} de l'ATP sur le courant des cellules cancéreuses murines EMT6 qui était de l'ordre de $4,3 \pm 0,4$ mM (N=8) (**Figure 18-D**).

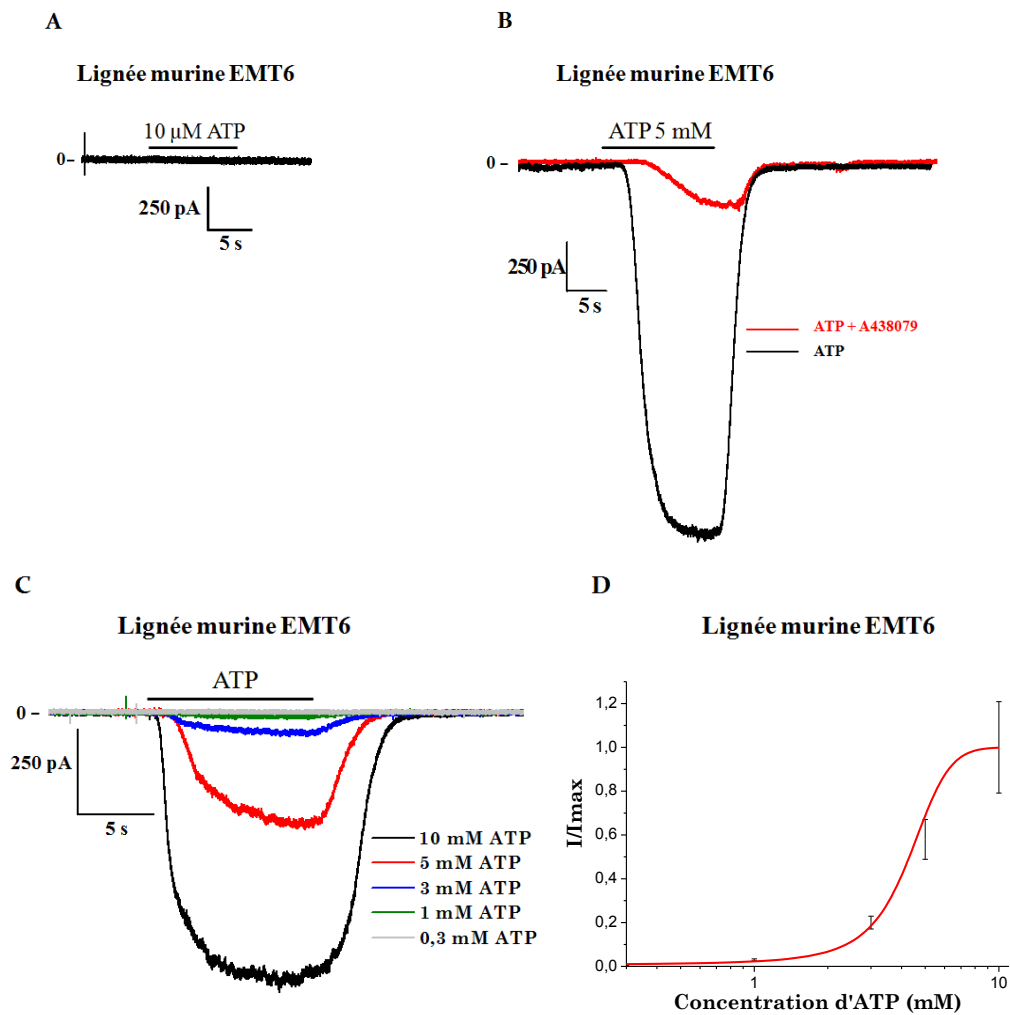


Figure 18 : Enregistrements de courants purinergiques en configurations cellule entière de la technique de patch clamp sur les cellules cancéreuses murines EMT6

Le potentiel de membrane imposé est de -60 mV. **A-** Courant macroscopique enregistré, sur la lignée cellulaire EMT6, lors de l'application de l'ATP à une concentration de 10 μ M pendant 10 secondes. **B-** Courants macroscopiques enregistrés lors de l'application de l'ATP à une concentration de 5 mM en présence ou non de l'antagoniste des récepteurs P2X₇ A438079 (10 μ M) pendant 10 secondes **C-** Enregistrements représentatifs de courants ioniques lors de l'application de l'ATP à différentes concentrations (0.3, 1, 3, 5 et 10 mM) pendant 10 secondes après une facilitation complète des récepteurs P2X₇. **D-** Courbe concentrations d'ATP-réponse pour des courants entrants enregistrés dans les cellules cancéreuses EMT6 après une facilitation complète des récepteurs P2X₇. Les courants obtenus sont relativisés par rapport au maximum obtenu à 10 mM ATP (n= 8 pour chaque concentration appliquée).

Des résultats similaires ont été observés avec les cellules cancéreuses mammaires murines de la lignée 4T1: l'application de 5 mM d'ATP montre un courant entrant qui est inhibé en présence de l'antagoniste du récepteur P2X₇ A438079 (10 μ M) (**Figure 19-A**). Nous avons par ailleurs réalisé d'autres mesures de courants ioniques lors de l'application de l'ATP à différentes concentrations (0.3, 1, 3, 5 et 10 mM) pendant 10 secondes (**Figure 19-B**), mais d'autres expériences supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer l' EC_{50} de l'ATP sur le courant des cellules cancéreuses 4T1.

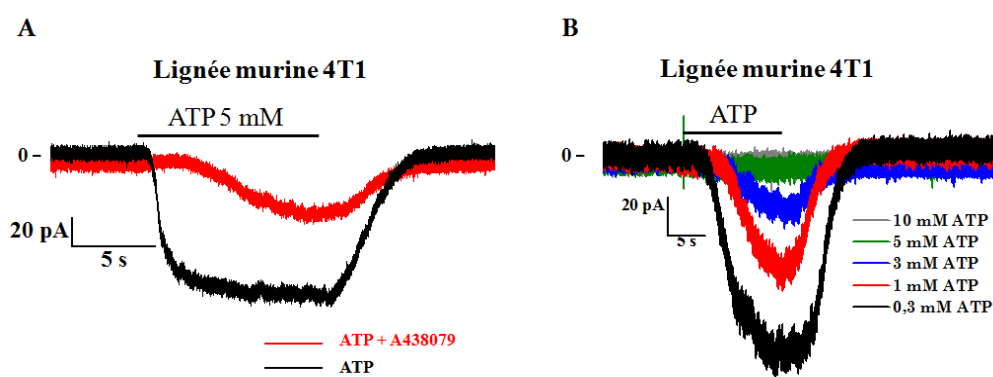


Figure 19 : Enregistrements de courants purinergiques en configurations cellule entière de la technique de patch clamp sur les cellules cancéreuse murines 4T1

Le potentiel de membrane imposé est de -60 mV. **A-** Courants macroscopiques enregistrés lors de l'application de l'ATP à une concentration de 5 mM en présence ou non de l'antagoniste des récepteurs P2X₇ A438079 (10 μM) pendant 10 secondes **B-** Enregistrements représentatifs de courants ioniques lors de l'application de l'ATP à différentes concentrations (0,3, 1, 3, 5 et 10 mM) pendant 10 secondes après une facilitation complète des récepteurs P2X₇.

Nous souhaiterions continuer la caractérisation de l'activité des récepteurs P2X₇ dans ces deux lignées cellulaires (patch clamp, mesure du calcium intracellulaire, incorporation de molécules fluorescentes) et réaliser des tests d'invasion cellulaire dans le but de déterminer l'implication des récepteurs P2X₇ dans l'invasivité des cellules cancéreuses EMT6 et 4T1. Ceci nous permettra de confirmer nos résultats trouvés dans d'autres modèles cellulaires exprimant les récepteurs P2X₇ de souris. Nous projetons de modifier génétiquement ces mêmes lignées pour éteindre l'expression des récepteurs P2X₇ (une lignée "shP2X₇" qui sera transduite par un shRNA dirigé contre les récepteurs P2X₇ et donc n'expriment plus le récepteur P2X₇ comparée à une lignée contrôle "shContrôle" qui sera transduite par un shRNA qui ne cible aucune séquence). Nous désirerions modifier ces lignées aussi pour qu'elles expriment le gène de la luciférase (Luc). L'évolution de la tumeur primaire ainsi que le développement des métastases seront suivi par bioluminescence (après injection de luciférine) en fonction de la présence ou non des récepteurs P2X₇ au niveau des cellules cancéreuses dans les deux groupes de souris BALB/c WT et P2X₇ ^{-/-}. Ces expériences nous permettront de déterminer la participation des récepteurs P2X₇, qu'ils soient exprimé par les cellules cancéreuses ou par les cellules de l'hôte dans la croissance et la progression tumorale.

Si notre hypothèse de départ sur l'implication des récepteurs P2X₇ dans l'invasivité des cellules cancéreuses est validée par ces modèles *in vivo*, ce récepteur pourrait devenir une nouvelle cible thérapeutique dans le cancer du sein.

7- Effets anticancéreux de l'émodyne via l'antagonisme du récepteur P2X₇ des cellules cancéreuses :

Les récepteurs P2X₇ semblent être les seuls récepteurs P2X fonctionnels à la surface des cellules cancéreuses MDA-MB-435s (article 1). Ces résultats font des cellules MDA-MB-435s un très bon modèle pour étudier les effets dépendants du récepteur P2X₇ dans la biologie de la cellule cancéreuse et de tester l'effet de molécules pharmacologiques ayant pour cible ces récepteurs. Nous avons examiné l'effet de l'anthraquinone émodine d'origine végétale (1,3,8-trihydroxy-6-méthylanthraquinone) sur les propriétés d'invasion dans les cellules MDA-MB-435s (article 2). Une étude récente a montré l'antagonisme du récepteur P2X₇ de rat par cette anthraquinone. Cette étude a montré que l'ATP induit une augmentation de la concentration calcique, la libération de l'IL-1 β , la production de ROS et l'atténuation de la phagocytose dans les macrophages péritonéaux de rat. Tous ses effets sont inhibés par l'émodyne via l'antagonisme des récepteurs P2X₇ (Zhu et al., 2013). Ce composé naturel pourrait représenter une bonne molécule de base pour des modifications chimiques afin d'élaborer de nouveaux antagonistes plus efficaces des récepteurs P2X₇. Ces molécules pourraient être utilisées dans le traitement de pathologies inflammatoires ou pour prévenir et traiter divers cancers.

Deux autres composés extraits de la même plante, présentent des propriétés antitumorales. Ces deux composés sont l'Aloe-émodyne et la Rhéine (Chen et al., 2010). Les structures chimiques de ces deux composés, avec celle de l'émodyne, sont présentées ci-dessous:

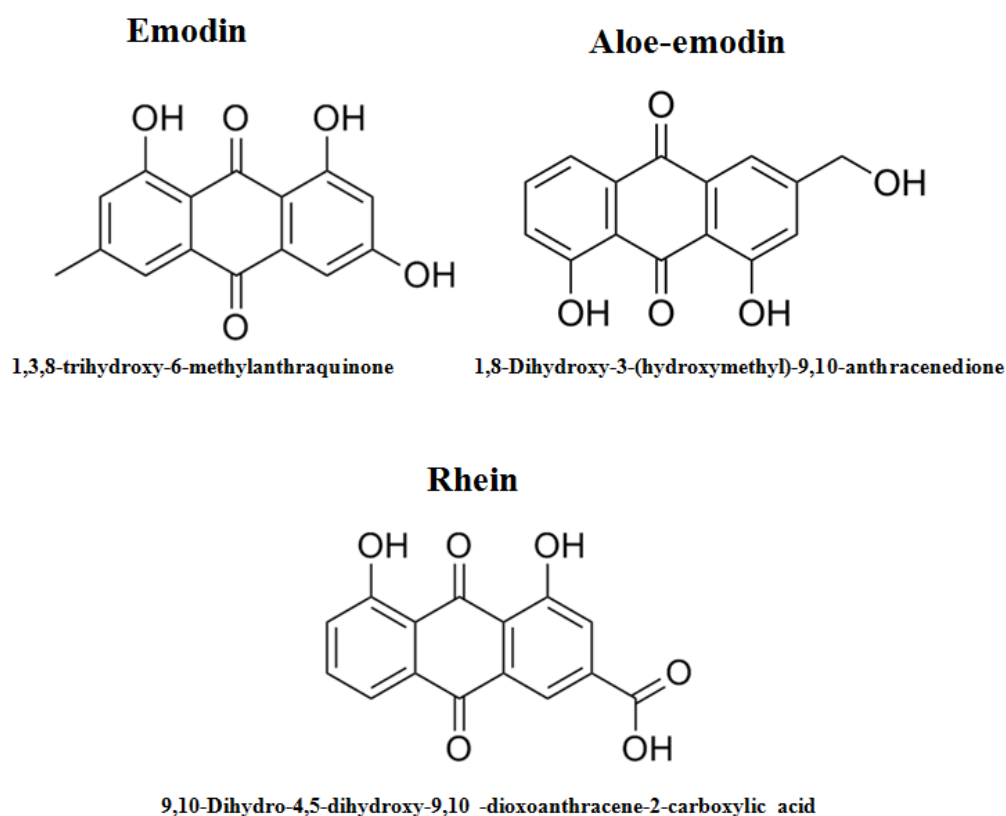


Figure 20 : Structures chimiques des trois composés extraits de la rhubarbe: émodine ; aloe-émordine et la rhéine.

Il n'existe aucune étude testant l'effet de ces deux composés (aloe-émordine et rhéine) sur l'activité des récepteurs P2X₇. Il sera par conséquent intéressant de tester ces composés et voir leurs effets sur l'activité des récepteurs P2X₇ humains (en mesurant l'entrée de courant, l'entrée du calcium et l'incorporation de l'éthidium) et de comparer à ceux obtenus avec l'émordine.

Conclusion

L'objectif de mon projet de thèse était de caractériser l'expression ainsi que la fonctionnalité des récepteurs P2X₇ dans les cellules cancéreuses mammaires hautement invasives MDA-MB-435s et de déterminer leurs rôles dans la biologie de la cellule cancéreuse.

Durant cette thèse, nous avons montré que l'activation de ces récepteurs permet d'augmenter l'invasivité des cellules cancéreuses via le relargage des formes matures de cathepsines à cystéines favorisant ainsi la dégradation de la matrice extracellulaire. Les récepteurs P2X₇ étaient et sont jusqu'à maintenant reconnus majoritairement comme étant des récepteurs cytolytiques. Les résultats que nous avons trouvés ont fait avancer nos connaissances sur les récepteurs P2X₇ et ont permis d'identifier un de leurs rôles dans le cancer. Cette étude a permis aussi de signaler l'importance de la signalisation purinergique dans le domaine du cancer.

L'ATP, dans le milieu extracellulaire, possède une demi-vie qui dépend de l'activité séquentielle de divers ectonucléotidases. Ces ectoenzymes vont dégrader l'ATP en ADP, AMP et finalement en Ado. Ces purines peuvent agir sur les différents sous-types des récepteurs P1 et P2 qui sont exprimés à des degrés divers par les cellules cancéreuses ce qui rend certainement la situation encore plus complexe. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication de l'ATP et de l'adénosine dans l'interaction hôte-tumeur, mais il n'y a aucune démonstration convaincante que d'autres nucléotides (UTP, UDP) y participent. L'ATP et son produit de dégradation l'adénosine, affectent directement la croissance des cellules tumorales. Il est connu que l'adénosine est un puissant immunosuppresseur. En agissant principalement sur les récepteurs A_{2A}, l'adénosine inhibe les cellules T cytotoxiques infiltrants la tumeur (Ohta et al., 2006). Il a été montré également que l'adénosine est un modulateur de la croissance cellulaire en agissant principalement sur le récepteur A₃. Il a été reporté que la stimulation des récepteurs A₃ peut avoir des effets pro-apoptotique ou anti-apoptotique et des effets stimulant ou inhibant la croissance cellulaire (Di Virgilio, 2012). Des données *in vivo*, montrent qu'une diminution de la concentration d'adénosine intratumorale réduit la progression tumorale et prévient la formation des métastases (Stagg et al., 2011). La participation de l'ATP dans le cancer semble être beaucoup plus compliquée que celle de l'adénosine. Outre son rôle dans l'invasivité des cellules cancéreuses (agissant sur les récepteurs P2X₇), il est connu que l'ATP possède un rôle pro-inflammatoire (agissant sur les récepteurs P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ et P2Y₁₂ et au niveau des récepteurs P2X₄ et P2X₇) (Di Virgilio, 2012). En agissant sur les récepteurs P2Y₁₁, l'ATP est immunosuppresseur : il induit un état de semi-maturation des cellules dendritiques caractérisée par une diminution de la

production des cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-6, IL-1 β et TNF α), tandis que la libération des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et IL-1Ra n'est pas affectée. Ces effets sur la sécrétion des différentes cytokines induisent une altération de l'immunité induite par les cellules Th1 et une potentialisation des réponses médiées par les cellules Th2 et, donc, une activation préférentielle des voies immunosuppressives plutôt que les voies immunostimulatrices (Di Virgilio, 2012). L'ATP peut promouvoir la croissance cellulaire (en agissant sur les récepteurs P2Y₁, P2Y₂, et les récepteurs P2X₇). Ces divers rôles attribués à l'ATP génèrent un ensemble de réponses qui affectent le système immunitaire, la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Compte tenu de la complexité de la signalisation purinergique prédire le résultat final d'un traitement thérapeutique avec l'ATP ciblant des acteurs de cette signalisation reste très difficile. Quelques études ont exploré l'activité thérapeutique de la perfusion d'ATP chez les patients atteints de cancer (Beijer et al., 2009). Le traitement est bien toléré et les effets sur l'état nutritionnel, la qualité de vie globale et la survie à long terme sont encourageants. Toutefois les mécanismes d'actions de l'ATP ne sont pas clairs.

Les avancées réalisées au cours de ses dernières années dans le domaine de la signalisation purinergiques soulèvent la question de la façon dont nous pouvons tirer profit de cette signalisation purinergique pour vaincre le cancer. Les découvertes qui peuvent être réalisées dans le futur feront avancer nos connaissances sur l'implication des purines dans le cancer et ouvriront certainement des perspectives prometteuses pour le développement de nouvelles prises en charge thérapeutiques.

Publication non intégrée à la thèse

The activation of P2Y₂ receptors increases MCF-7 breast cancer cells migration through the MEK-ERK_{1/2} signalling pathway

Stéphanie Chadet^{1,2}, Bilel Jelassi¹, Ramez Wannous¹, Denis Angoulvant², Stéphan Chevalier¹,
Pierre Besson¹ and Sébastien Roger^{1,3 #}

1, UMR Inserm 1069 Nutrition, Croissance et Cancer ; Université François-Rabelais de Tours, 10
Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France

2, EA 4245 Cellules Dendritiques, Immunodulation et Greffes ; Université François-Rabelais de
Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, France

3, Département de Physiologie Animale, UFR Sciences et Techniques ; Université François-Rabelais
de Tours, Avenue Monge, 37200 Tours, France

#, Address correspondence should be sent to:

Dr. Sébastien Roger,

UMR Inserm 1069, Université François-Rabelais de Tours, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours,
France ; Phone: (+33) 2 47 36 61 30 ; Fax: (+33) 2 47 36 62 26 ; Email: sebastien.roger@univ-tours.fr

Running title: P2Y₂R enhances MCF-7 breast cancer cell migration

Word count: 5,067

Abstract

Adenosine 5' tri-phosphate (ATP) is found in high concentrations in the extracellular microenvironment of tumours and is postulated to play critical roles in cancer progression. In the present study, we found that ATP (30 μ M) stimulation increased the migration of human MCF-7 breast cancer cells by $140 \pm 31\%$, while it had minor or no effect on their proliferation. This effect was prevented by the ectonucleotidase apyrase and was antagonized by the use of suramin and PPADS, consistently with the participation of P2 receptors. MCF-7 cells expressed mRNA for all known P2Y receptors and for P2X₂, P2X₄, P2X₅ and, at low level, for P2X₆ and P2X₇ receptors. Brief applications (20 s) of external ATP resulted in a 50 pA P2X-like inward current. ATP, but not ADP or UDP, increased the intracellular calcium concentration in absence of extracellular calcium, and this effect was prevented by the inhibition of the phospholipase C. UTP (10 μ M) and 2-thioUTP (10 μ M) increased intracellular calcium concentration and cell migration to the same extent as ATP. The UTP-dependent increase in cell migration was absent in cells knocked-down for P2Y₂. It was inhibited by MEK inhibitor PD98059. UTP induced a time-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) which was prevented by the incubation with PD98059. Taken together these results highlight the importance of the purinergic signalling in the cancer disease and indicate that the activation of P2Y₂ receptors enhances breast cancer cell migration through the activation of a MEK-ERK1/2-dependent signalling pathway.

Key words: ATP, P2Y receptors, cancer cell migration, intracellular calcium, ERK1/2

Introduction

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) is a well known intracellular source of energy for all types of cells, but it is also released extracellularly, in both physiological and pathological conditions, where it initiates signalling pathways through the activation of transmembrane receptors [1]. There are two families of membrane receptors for extracellular nucleotides: the metabotropic G protein-coupled P2Y receptors, for which the activating ligands are ATP and some other purine or pyrimidine di- or triphosphate nucleotides, and the ionotropic P2X receptors which are physiologically activated by extracellular ATP [2]. To date, eight P2Y subtypes have been cloned in human cells: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ and P2Y₁₄. Depending on the G-protein subtype they are associated to, they can modulate the adenylate cyclase-cAMP pathway or stimulate the phospholipase C (PLC) – Ca²⁺ signalling pathway [3]. There are seven members in the P2X receptor family, which all constitute non-selective cation channels proposed to be functional under a homo- or heterotrimeric association [4]. Their activation by ATP results in the influx of Na⁺ and Ca²⁺ into the cell and the concomitant efflux of K⁺, therefore leading to the membrane depolarization and to the activation of intracellular Ca²⁺-dependent signalling pathways [5]. At the cellular level, both P2Y and P2X receptors are important regulators of cell proliferation, differentiation, migration and apoptosis, thereby contributing to the modulation of several biological processes such as neurotransmission, immune response and inflammation, muscle contraction, bone synthesis and remodelling. All cells generally express numerous P2Y receptor isotypes while some others, such as excitable cells, also express P2X receptors. In such conditions extracellular ATP can activate numerous and successive signalling pathways, depending on its initial concentration and half-life. This is happening in physiological but also in pathological situations, such as in cancer biology [6].

Tumour sites are known to contain high concentrations of ATP, while it is normally undetectable in healthy tissues [7]. Indeed, ATP can be secreted by living cancer cells into their microenvironment at relatively high concentrations [8] and is released in sites of tissue damage such as necrotic regions of solid tumours [9]. Therefore, this raises the possibility that purinoreceptors expressed by cancer cells themselves, but also by endothelial cells, and immune cells infiltrating tumours could be activated, and consequently modulate tumour growth and evolution [10-12]. Indeed, the involvement of purinoreceptors in cancer cell biology is a promising research field that could increase the knowledge on processes leading to the cancerous transformation, and could also identify new pharmaceutical approaches to be

exploited in cancer therapy. Breast cancer is the major cause of women death by cancer worldwide [13], and the high mortality associated with this cancer is not caused by the growth of the primary tumour, but rather by the appearance and development of metastases. The aim of this study was to investigate whether extracellular ATP, as well as other nucleotides, can alter breast cancer cell migration, which represents one of the key and initial parameter of the metastasis development.

Material and Methods

Cells and culture

MCF-7 human breast cancer cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, LGC promochem, France) and were maintained in a Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Cambrex, France), supplemented with 5% foetal calf serum (Thermoscientific, France). Cells were grown at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator.

RNA extraction, Reverse Transcription and conventional Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reverse transcription and PCR experiments were done as previously detailed [14,15]. Briefly, total RNA extractions from MCF-7 were performed using Total RNA isolation Nucleospin® RNAII kit (Macherey-Nagel, France). RNA yield and purity were determined by spectrophotometry and only samples with A260/A280 ratio above 1.7 were kept for further experiments. Total RNA were reverse-transcribed using the RT kit Ready-To-Go® You-Prime First-Strand Beads (GE Healthcare, France). Random hexamers pd(N)6 5'-Phosphate (0.2 µg, GE Healthcare, France) were added and the reaction mixture was incubated at 37°C for 60 min. Specific primers for human P2X₁₋₇ and P2Y_{1, 2, 4, 6, 11, 12, 13, 14} receptors used in PCR are the same as in a previous study [14]. The efficacy of these primers was checked with corresponding hP2X/hP2Y receptor cDNA in pcDNA3.1 plasmids. The temperature profile for PCR was 1 min at 94°C followed by amplification for 40 cycles which consisted of 30 s DNA denaturation at 94°C, 60 s primers hybridization at 60°C, 30 s polymerization at 72°C and a final extension for 2 min at 72°C. PCR products were analyzed after electrophoretic separation in 1.5% agarose gels containing ethidium bromide, and visualized by UV-transillumination (BioRad, Gel doc).

Small interfering RNA transfection

MCF-7 breast cancer cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) directed against *P2RY2* (siP2Y₂), *P2RY4* (siP2Y₄) gene expression or scramble sequence not targeting any known gene as a control (siCTL). SiRNA were purchased from Tebu-Bio (France). Cells were transfected with siRNA by using Lipofectamine RNAi max (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions. All experiments were performed 48 hours after cell transfection with siRNA.

Western blotting

Western blotting experiments were performed on total MCF-7 cell lysates. Cells were grown to 80% confluence in a 6-well plate, then washed twice with PBS and lysed for 1h at 4°C in a lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4 , 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) containing 1% Triton X-100 and protease inhibitors (Sigma Aldrich, France). Cell lysates were then centrifuged at 16,000xg for 10 min to pellet debris. Total protein samples were removed and assayed for protein content using the bicinchoninic acid (BCA) method (Bio-Rad, France). Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer was added and samples were boiled for 3 minutes. Samples were loaded (40 µg total proteins) and electrophoretically separated on 10% polyacrylamide gels and then transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. Western blotting was performed following standard protocols. Phospho-ERK1/2 (p42/44MAPK, Phospho-Thr202/Tyr204) and total ERK proteins were visualized using polyclonal rabbit anti-human pERK1/2 (p42/44MAPK) primary antibodies (1/2,000 Cell Signaling) and polyclonal mouse anti-human ERK primary antibodies (1/2,000 Cell Signaling), respectively. The membrane was further incubated for 1h at room temperature (RT) with either a goat anti-rabbit or a goat anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (1/2,000 Santa Cruz Biotechnology, France). HSC-70 was used as a loading control and was immunodetected using mouse anti-HSC-70 (1/30,000 Santa Cruz Biotechnology, France) and goat anti-mouse HRP-conjugated secondary antibodies (1/10,000 Southern Biotech, France). Protein detection was done using the electrochemiluminescence (ECL)-plus kit (Pierce® ECL Western Blotting substrate, Fisher Scientific, France) and Kodak Bio-Mark MS films (Sigma-Aldrich).

Cell viability and cell proliferation assays

To assess the cell viability, 4×10^4 cells were seeded per well in 24 well-plates in DMEM + 5 % FCS. After 24 hours, cell media were changed and cells received culture media supplemented with different concentrations of ATP (or UTP) or a control culture medium containing the same volume of vehicle (PBS). Cells were then grown for 24 hours before assessing the relative number of viable cells. In order, to assess cell proliferation, 2×10^4 cells were seeded per well in 24 well-plates in DMEM + 5 % FCS. After 24 hours, cell media were changed and cells received culture media supplemented with different concentrations of ATP (or UTP) or a control culture medium containing the same volume of vehicle (PBS). Cells were then grown for 5 days and media were changed everyday. In both cases, total viable cell numbers were assayed by the tetrazolium salt assay as previously described [16]. Cell

proliferation was measured as formazan absorbance at 570 nm and expressed as a ratio by comparison to the control condition, in the absence of ATP (on the same day of the experiment). Results were validated by manual cell counting. Three independent experiments were performed for each assay.

Cell migration assays

Cell migration was analyzed with 24-well plates receiving 8 μm -pore size polyethylene terephthalate membrane cell culture inserts (BD biosciences, France). The upper compartment was seeded with 6×10^4 viable cells in their basal culture medium supplemented or not (vehicle) with nucleotides, agonists and antagonists indicated in the text and figure legends. The lower compartment was filled with the same culture medium supplemented with 10% FCS, instead of 5%, as a chemoattractant. After 24 h at 37°C, cells that had migrated and were attached to the lower side were washed with PBS, then fixed with methanol and nuclei were labelled with DAPI. Nuclei were counted using an epifluorescence-equipped Nikon TI-S microscope (Nikon, France). Cell migration assays were performed in triplicate in 3-8 separate experiments. For easier comparison, results obtained were normalized to the control condition performed in the absence of ATP or other nucleotides or drug.

Measurements of intracellular calcium

Changes in free internal calcium concentration were monitored using the fluorescent Fluo-4 Ca^{2+} -indicator by spectrofluorimetry. MCF-7 cells were seeded at 7×10^5 cells per well of a 6-well plate 48 hr before use. After being washed twice in PBS, the cells were incubated in Optimem medium (GIBCO, France) containing 5 μM Fluo-4AM (Invitrogen, France) at 37°C for 45 min in the dark. After loading, cells were washed twice in normal PSS then resuspended in the same solution or in 0-Ca PSS (see Solutions), diluted to a density of 5×10^5 cells/mL. The cell suspension was loaded into the cuvette of the spectrofluorimeter (Hitachi F-2500, Japan) and was kept under agitation at RT. Fluorescence was excited by 485 nm and measured at 510 nm.

Electrophysiological recordings

Electrophysiological recordings were performed in the whole cell configuration of the patch clamp technique as already reported [17]. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass (World Precision Instruments, UK) to a resistance of 4-6 $\text{M}\Omega$. Currents were recorded under voltage-clamp mode using an Axopatch 200B amplifier (Axon Instrument, USA) and

analogical signals were filtered at 10 kHz and digitized using a 1322A Digidata converter. Cell capacitance and series resistances were electronically compensated. Membrane potential was held at -60 mV. Experiments were performed at RT in a standard external saline solution (Etotal) and patch pipettes were filled with the intrapipette solution (see Solutions). Adenosine 5'-triphosphate (ATP) was externally applied using a RSC160 fast-flow delivery system (BioLogic Science Instruments, France) for 20 s, at the concentration indicated in figure legends.

F-actin cytoskeleton labelling and cell morphology analyses

MCF-7 cells were cultured on glass coverslips for 24h in presence of ATP (30 μ M), or vehicle (control condition). Cells were washed in PBS at RT, fixed with ice-cold 3.7% paraformaldehyde/PBS, and washed in ice-cold PBS containing 100 mM glycine. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 and saturated with 3% BSA and 3% Normal Goat Serum. F-actin was stained with phalloidin-Alexa594 (1/200, Invitrogen). Coverslips were then washed with PBS and mounted with ProLong® Gold antifade reagent (Invitrogen). Epifluorescence microscopy was performed with a Nikon TI-S microscope (France) and analysed using NIS-BR software (Nikon, France). The change in cell morphology was assessed as recently reported [18] from images of F-actin cytoskeleton labelling using the ImageJ© software 1.38I (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). A circularity index was calculated as being $4\pi \times [\text{area}]/[\text{perimeter}]^2$. As the value approaches 0, it indicates an increasingly elongated shape and, conversely, the value of 1 indicates a perfect circle.

Solutions

Stock solutions of ATP and other nucleotides were prepared in PBS and their pH was adjusted to 7.4. The external physiological saline solution (Etotal) for patch clamping experiments had the following composition (in mM): 147 NaCl, 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2 ethanesulfonic acid (HEPES), 13 D-Glucose, 2 KCl, 2 CaCl₂ and 1 MgCl₂. The pH was adjusted to 7.4. Agonist solutions for patch clamping were prepared in Etotal at the concentrations indicated in the figure legends. The intrapipette solution had the following composition (in mM): 147 NaCl, 2 KCl, 10 HEPES and 10 ethylene glycol-bis-(2-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA). Osmolarity and pH values were 295-315 mOsm and 7.3 respectively. The Physiological saline solution (PSS) had the following composition (in mM): 140 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, 11.1 D-glucose, and 10 HEPES, adjusted to pH 7.4 with NaOH (1 M). The 0-Ca PSS used in

intracellular Ca^{2+} measurements had the following composition (in mM): 140 NaCl, 4 KCl, 3 MgCl_2 , 10 HEPES, 11.1 D-Glucose and 5 EGTA.

Data Analysis and statistics

Average results are expressed as the mean $\pm$ s.e.m. from the number of cells or essays indicated in the figure legends. Statistical analyses were performed with SigmaStat 3.0.1a (Systat software Inc., USA). Data comparisons were made using Student's t-tests or Mann-Whitney rank sum tests when the variance homogeneity test failed. Statistical significance is indicated when $p < 0.05$.

Chemicals and drugs

ATP, ADP, UTP, UDP, apyrase, salts and chemicals for the solutions, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were obtained from Sigma-Aldrich (France). P2 agonists and antagonists, and the MEK inhibitor PD98059 were all coming from Tocris Bioscience (R&D Systems Europe, France).

Results

We first examined the effect of stimulating MCF-7 breast cancer cells with increasing concentrations of ATP, from 1 μ M to 3 mM, on their viability (after 24h) and proliferation (after 5 days growing) and compared this to a control condition without ATP (vehicle). MCF-7 cell viability was not significantly modified by ATP treatments from 3 to 300 μ M (Figure 1A). This indicated that extracellular ATP, at submillimolar concentrations was not responsible for MCF-7 cell death. To study the potential involvement of ATP in the regulation of MCF-7 cancer cell growth, the cell proliferation was assessed after 5 days of culture with media being changed every day. As can be seen on Figure 1B, MCF-7 cell proliferation was not dramatically modified by ATP stimulation. The total cell number was slightly increased by $22 \pm 9\%$ with 30 μ M and decreased by $22 \pm 3\%$ with 300 μ M ATP. Millimolar concentrations of ATP induced no significant effect on cell growth over five days. An important feature to be assessed in cancer biology is the migration of cancer cells which can be considered as being determinant in the process of invasion and the development of metastases [19]. Therefore, we examined the migration of MCF-7 cells under stimulation with ATP, in a range of concentrations from 3 to 30 μ M. These concentrations are supposed to activate most P2Y and P2X purinoreceptors [20] with the exception of P2Y₁₄R which is UDP-hexose activated and of P2X₇R which is the less ATP-sensitive P2X receptor [4]. Interestingly, stimulating MCF-7 cancer cells with 10 and 30 μ M ATP significantly increased cell migration by $103 \pm 11\%$ and $140 \pm 31\%$, respectively (Figure 2A). In a new set of experiments, we reassessed the effect of 30 μ M ATP on MCF-7 cell migration in presence or not of non-selective P2 receptor antagonists, suramin and pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (PPADS). Here again, 30 μ M ATP was able to increase cancer cell migration, and this effect was completely prevented by incubating the cells with suramin (100 μ M) or PPADS (100 μ M) (Figure 2B). Furthermore, both suramin and PPADS used alone, with no external application of ATP, induced a significant reduction of basal MCF-7 migration. The ATP-induced increase in cell migration was also prevented by the co-application of apyrase (a nucleotide triphosphate and diphosphate hydrolase) (Figure 2C). Apyrase used alone also induced a significant reduction in the basal migration of cancer cells in absence of external application of ATP. Taken together these first results showed that extracellular nucleotides could increase MCF-7 cell migration through the activation of P2 receptors. They also indicated that these receptors were activated in basal conditions by nucleotides being secreted or released by cancer cells themselves. ATP stimulation also induced a change in MCF-7 cell morphology with a reduction of their circularity, from $0.78 \pm$

0.01 (n= 51 cells) to 0.67 ± 0.02 (n= 43 cells), indicating the acquisition of an elongated shape (Figures 2D and 2E) consistent with a pro-migratory phenotype. While in basal conditions (control) MCF-7 cells formed small clusters of 5-10 cells, their stimulation with ATP tended to increase the proportion of isolated cells (Figure 2E).

We analyzed the expression of P2 receptors mRNA in MCF7 breast cancer cells and found mRNA transcripts for all P2Y receptors (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ and P2Y₁₄), and for P2X₂, P2X₄ and P2X₅ receptors. Low levels of mRNA for P2X₆ and for P2X₇ receptors were detected. No mRNA could be detected for P2X₁ and P2X₃ (Figure 3A). We then performed electrophysiological recordings to assess the presence of functional P2X at the plasma membrane of MCF-7 cells, and found that 30 μ M ATP induced a small ~50 pA non-desensitizing P2X-like inward current (Figure 3B). The application of higher ATP concentrations, up to 5 mM, did not produce currents of bigger amplitudes (data not shown). While P2X receptors can solely be activated by ATP (or its pharmacological analogs) [3], P2Y receptors can be activated by different nucleotides and are therefore classified into ADP-preferring P2Y receptors (P2Y₁, P2Y₁₂, and P2Y₁₃), ATP-preferring P2Y receptor (P2Y₁₁), UTP-recognizing P2Y receptors (P2Y₂ and P2Y₄), UDP-preferring P2Y receptor (P2Y₆) and lastly, P2Y₁₄ as the only example of UDP-sugar-recognizing P2Y receptor [21]. This reasonably allowed us to exclude P2Y₁₄ as a potential receptor for mediating the ATP-induced migration observed. Any one of the other receptors could be considered because of the potential existence of ectonucleotidases and ectonucleoside diphosphokinases in the extracellular medium or at the extracellular surface of cancer cells membrane. Monitoring of the intracellular Ca²⁺ concentration, with Fluo-4, showed that ATP (30 μ M) was responsible for a Ca²⁺ increase both in the presence and absence of extracellular Ca²⁺ (Figures 3C and 3D, respectively). The increase in intracellular Ca²⁺ concentration measured in absence of extracellular Ca²⁺ (Figure 3D) was inhibited in cells incubated with the phospholipase C (PLC) inhibitor U73122 (10 μ M, Figure 3E). This result indicated the functionality of protein Gq₁₁-coupled P2Y receptors. To further identify the functional P2Y receptors, similar experiments were performed in cells stimulated with UTP, ADP and UDP in absence of external Ca²⁺. UTP 10 μ M was responsible for an increase in the intracellular Ca²⁺ concentration (Figure 3F) while ADP and UDP, both used at a concentration of 10 μ M, did not induce any change (Figures 3G and H). Figure 3I represents a quantification diagram summarizing all these experiments. All these results (Figure 3) indicate that the ATP-induced increase in the intracellular calcium concentration could be, at least partially, due to the functionality of UTP-preferring P2Y receptors coupled to a Gq₁₁ – PLC - IP₃ -signalling

pathway. UTP, from 0.1 μ M to 0.3 mM as compared to a control condition without UTP, had no effect on the MCF-7 cancer cell viability (Supplementary Figure 1A).

We then tested the effect of stimulating cancer cells with UTP, ADP and UDP and compared it to the ATP-induced increase in cell migration. While ADP and UDP had no effect, UTP (10 μ M) induced a $45 \pm 7\%$ increase in cell migration which was not statistically different from the effect observed with ATP (30 μ M). This increase in cell migration was also produced by the use of 2-thio UTP (10 μ M), thus favouring the hypothesis of the involvement a UTP-activated P2Y receptor (Figure 4A). We also used the recently developed agonist MRS4062 being more selective for the human P2Y₄ than for P2Y₂ and P2Y₆ receptors [22]. When used at a concentration of 1 μ M, which is supposed to mainly activate P2Y₄ receptors, no effect was observed on cell migration. When used at 10 μ M, thus possibly also activating P2Y₂ and P2Y₆ receptors, MCF-7 cell migration was increased by $104 \pm 15\%$ (Figure 4B). P2Y₆ receptor is known to be preferentially activated by UDP but can also be activated by UTP and ATP. We therefore studied the ATP-induced increase in cell migration in presence or not of the P2Y₆ antagonist MRS2578. MRS2578 did not reduce basal or inhibit the ATP-induced cell migration (Figure 4C). The P2Y₁₁ antagonist NF340 (10 μ M) had no effect on basal or on the ATP-induced cell migration (Figure 4D). Since we found a weak expression of mRNA for P2X₇ and also a small non-desensitizing P2X-like ATP-evoked inward current, and since P2X₇ receptors have been associated to the migration of highly invasive cancer cells [14], we also tested the possible involvement of P2X₇ in regulating MCF-7 cancer cell migration. A 3 mM concentration of ATP was applied in presence or not of a specific antagonist for P2X₇ receptor (A438079), but none of the two conditions had any significant effect (Supplementary Figure 1B). Therefore, the more likely ATP-activated receptor to be involved in cell migration is P2Y₂. To confirm this hypothesis, we tested the UTP- or MRS4062-induced migration in cancer cells transfected with siRNA directed against P2Y₂R messengers (siP2Y₂) and compared the results to those obtained with cells transfected with scrambled siRNA not recognizing any known sequence (siCTL). As assessed by RT-qPCR, siP2Y₂ reduced the level of *P2RY2* transcripts by 65 to 85% (data not shown). In cells transfected with siCTL, both UTP and MRS4062 increased migration while these effects were absent in cells transfected with siP2Y₂. Furthermore, the sole transfection with siP2Y₂, with no external agonist application, reduced the basal migration of MCF-7 cancer cells (Figure 5A). By comparison, targeting the expression of P2Y₄ receptors had no effect on the MRS4062-induced increase in cancer cell migration (Supplementary Figure 1C).

We next investigated the downstream intracellular pathway involved in this ATP/UTP-induced increase in cancer cell migration and assessed the potential participation of the MAPK/ERK (Mitogen-activated protein kinases, originally called ERK, Extracellular signal-regulated kinases) signalling pathway. In order to avoid possible cross-talk reactions we used UTP (10 μ M) or MRS4062 (10 μ M) as agonists, instead of ATP. Interestingly, the UTP- or MRS4062-induced increase in cell migration was prevented by the MEK inhibitor PD98059 (Figure 5 B).

In accordance with these results, UTP (10 μ M) was responsible for a marked increase of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2, also known as p42/44 MAPK) phosphorylation (Thr202/Tyr204) by 22.6 ± 6.9 -fold, 10 minutes after the stimulation of cancer cells, as compared to the unstimulated condition. This activation was transient and, 30 min after stimulation, was only 4.3 ± 1.1 -fold higher than the unstimulated condition. The total amount of ERK1/2 (relative to the housekeeping protein HSC-70) was unchanged compared to the control condition without agonist. Pre-incubating the cells with the MEK inhibitor PD98059 (10 μ M) partially reduced the UTP-dependent ERK phosphorylation at both 10 and 30 min (Figures 5C and 5D). Similar experiments were performed with MRS4062 (10 μ M) used as an agonist. Again, a 24.8 ± 12.7 -fold increase in the level of ERK1/2 phosphorylation was observed 10 minutes after cell stimulation. However with this stable agonist the level of ERK1/2 phosphorylation was maintained 30 minutes after cells stimulation (46.8 ± 23.1 -fold increased compared to the control condition without agonist). At both timescales, pre-incubating the cells with PD98059 (10 μ M) prevented this ERK1/2 phosphorylation (Figures 5E and 5F).

Discussion

The purinergic signalling is known to regulate numerous non-cancer and cancer cells functions [2]. Studies performed from 1980's using *in vivo* models proposed an antitumour activity of adenine nucleotides when injected daily in the animal peritoneum, leading to a prolonged survival [23-26]. However, the mechanisms underlying these effects were not elucidated and one of the proposed possibilities was the activation of adenosine receptors (formerly named P1) after the breaking down of ATP by ectonucleotidases [12]. Moreover, the cellular type involved in such effects and the interactions between cancer, immune and stromal cells were not documented. When studies focused on cancer cells, they mainly investigated the modulation of cell proliferation and apoptosis by extracellular nucleotides [10]. Some studies reported that ATP induced the proliferation of several human cell types such as colon adenocarcinoma cells Caco-2 [27] of ovarian cancer cells OVCAR-3 [28], and both ATP and UTP promote the growth of human lung cancer cells A549 [29]. On the contrary, other studies reported that extracellular ATP suppressed the proliferation of Caco-2 [30], reduced the growth of glioblastoma cell colonies in soft agar [31], and inhibited prostate cancer cell growth [32]. Recently, the activation of the ADP-preferring P2Y₁ receptor was proposed to induce apoptosis and to inhibit proliferation of human prostate carcinoma cells PC-3 [33].

As such, it is difficult to draw a general scheme, and the reported opposing effects might result from the use of different cancer types/cell lines or the different timescales of stimulation with nucleotides. As such, the effect of extracellular nucleotides on cancer cell proliferation or apoptosis would depend on their concentration and their half-life in the extracellular medium, and the isotype of receptors activated. In breast cancer as in other cancer types, P2X₇ receptors have drawn a lot of attention. P2X₇ receptor expression was found to be substantially up-regulated in several tumours compared to normal tissues [8,34-40] and was even proposed to constitute an early biomarker for cancer [40,41]. Contrarily to the initial hypothesis assuming that P2X₇ activity could be deleterious for cancer cells, it was found that it is responsible for anti-apoptotic effects [39], or for sustaining both cancer cell [8,42] and tumour growth *in vivo* [43]. In the highly invasive human cancer cells MDA-MB-435s, P2X₇ stimulation enhanced extracellular matrix proteolysis, and small molecules with P2X₇-inhibiting activity reduce cancer cell invasiveness both *in vitro* and *in vivo* [14,15]. A "Run or Die hypothesis" was formulated, suggesting that cancer cells could develop an increased P2X₇-dependent invasiveness to escape tumour areas containing high level of ATP

from which they could die, thus leading to the dispersion of cancer cells [11]. The use of P2X₇ receptors antagonists in cancer therapy was debated in a recent review [11].

In the present study, we showed that the human breast cancer cells MCF-7 contain several transcripts of P2 receptors genes, and that some of them are functional at the plasma membrane. Indeed, MCF-7 cells express mRNA for all P2Y receptor isotypes and intracellular calcium measurements clearly indicated that UTP-recognizing P2Y_{2/4} receptors, known to be often coupled to G_q/G₁₁ proteins, were functional. This is in accordance with previous studies [44-46]. From our experiments, showing no increase of the internal Ca²⁺ concentration under ADP or UDP stimulation, it is very unlikely that the ADP-preferring P2Y₁ or the UDP-preferring P2Y₆ receptors, known to be mainly coupled to G_q/G₁₁ proteins [3], are functional in MCF-7 cells. However, we can not exclude the functionality of ADP-preferring P2Y₁₂ and P2Y₁₃, and ATP-preferring P2Y₁₁, which are known to mainly regulate intracellular cAMP levels through the activation of G_{i/o} or G_s proteins [3]. The activity of the UDP-sugar-dependent P2Y₁₄ receptors was not assessed as we were analysing ATP-stimulated pathways. MCF-7 cells also expressed a high level of mRNA for P2X₄ receptors, but weakly expressed P2X₂, P2X₅, P2X₆ and P2X₇ receptors. Electrophysiological recordings showed the presence of a small, non desensitizing P2X-like current under 20-s-long applications of 30 μ M extracellular ATP that could be due to the functionality of either one or multiple receptors among P2X₂, P2X₄, P2X₅. We can exclude the functionality of P2X₇ receptors in MCF-7 because, although *P2RX7* transcripts were detected, the current did not facilitate and was not increased by millimolar concentrations of ATP, as can be observed in P2X₇ receptors-expressing cells [4,47].

In this study, we found that both extracellular ATP (up to 3 mM) and UTP (up to 300 μ M) had very weak or no deleterious effect on MCF-7 cells viability and proliferation (Fig. 1 and Suppl. Fig 1A). ATP was originally shown to increase intracellular levels of Ca²⁺ and to reduce MCF-7 cells proliferation [48], and it was proposed that this could be due to P2X₇ stimulation [10]. However, P2X₇ receptors are very weakly expressed in MCF-7 cells and seem to be non functional. The stimulation of P2Y₂ and P2Y₄ receptors was proposed to stimulate MCF-7 proliferation [44,49,50]. A recent study, on the contrary, reports that UTP reduces the estrogen-dependent breast cancer cell proliferation through the activation of P2Y₂ receptors [46]. This contradiction might come from differences in the culture conditions, and most probably to different levels of estrogens into the sera of culture medium. P2 receptors could also regulate other aspects of cancer cells behaviour such as cell migration. Indeed, while cancer cell proliferation is an important aspect that could modulate tumour growth, cell

migration is a key parameter regulating the invasive capacities of cancer cells and eventually the development of metastases. This is highly relevant as the mortality associated to breast cancer is mainly related to the appearance of metastases. This study shows that both extracellular ATP, which is known to be elevated in the microenvironment of tumours [7], and extracellular UTP, strongly increased cancer cell migration. This ATP/UTP-induced cancer cell migration is due to the stimulation of P2Y₂ receptors and the downstream activation of the ERK1/2 pathway (Figure 6). Interestingly, unidentified P2Y receptors were shown to promote prostate cancer cells invasion [51], and P2Y₂ receptors were found to be responsible for the UTP-induced NG108-15 cells migration [52].

Inflammatory cells, such as neutrophils, are recruited and can migrate towards the injury site, attracted by the concentration gradient of extracellular nucleotides [20]. Indeed ATP was demonstrated to induce neutrophils chemotaxis and migration through the activation of P2Y₂ receptors [53]. The stimulation of the P2Y₂ receptor with ATP in epithelial cells was also demonstrated to increase cell migration, through the participation of Src and ERK-dependent signalling pathway [54]. This response to ATP could be involved in normal tissue repair after injury. Indeed, the activation of P2Y₂ receptors by extracellular ATP or UTP might constitute a physiological signalling pathway in response to tissue injury, promoting both immune cell migration for host defence, and wound healing. This ability could be diverted by cancer cell which would benefit of this pathway to initiate the primary migratory phase associated with the development of metastases. Very recently, another publication supported the importance of P2Y₂ receptors in cancer biology and more precisely in metastases. In this study, authors showed that the ATP released by circulating cancer cell-associated platelets stimulates P2Y₂ receptors on endothelial cells to facilitate the extravasation of cancer cells at metastatic sites [55].

In conclusion, this study confirmed the importance of the purinergic signalling in carcinogenesis. It identified the P2Y₂ receptor as an important regulator of cancer cell migration, critical for cancer cell spreading in tissues and therefore to the development of metastases. P2Y₂ receptors could represent new potential targets for anti-cancer or anti-metastatic therapy.

Acknowledgements

We thank Isabelle Domingo and Catherine Le Roy for technical and administrative assistance, respectively. This work was supported by a grant from the “Ligue Nationale Contre le Cancer - Région Centre”, the “Association CANCEC”, the “Ministère de la Recherche et des Technologies”, the "Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale" (INSERM). B.J. is recipient of PhD grant from the national comity of the “Ligue Nationale Contre le Cancer”.

References

1. Burnstock, G., Fredholm, B.B., North, R.A. and Verkhratsky, A. (2010) The birth and postnatal development of purinergic signalling. *Acta Physiol (Oxf)*, **199**, 93-147.
2. Burnstock, G. (2006) Purinergic signalling. *Br J Pharmacol*, **147 Suppl 1**, S172-81.
3. Burnstock, G. (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci*, **64**, 1471-83.
4. North, R.A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev*, **82**, 1013-67.
5. Surprenant, A. and North, R.A. (2009) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol*, **71**, 333-59.
6. Burnstock, G. and Di Virgilio, F. (2013) Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal*.
7. Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V. and Di Virgilio, F. (2008) Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One*, **3**, e2599.
8. Raffaghello, L., Chiozzi, P., Falzoni, S., Di Virgilio, F. and Pistoia, V. (2006) The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res*, **66**, 907-14.
9. Wang, X., Arcuino, G., Takano, T., Lin, J., Peng, W.G., Wan, P., Li, P., Xu, Q., Liu, Q.S., Goldman, S.A. and Nedergaard, M. (2004) P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med*, **10**, 821-7.
10. White, N. and Burnstock, G. (2006) P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci*, **27**, 211-7.
11. Roger, S. and Pelegrin, P. (2011) P2X7 receptor antagonism in the treatment of cancers. *Expert Opin Investig Drugs*, **20**, 875-80.
12. Stagg, J. and Smyth, M.J. (2010) Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, **29**, 5346-58.
13. Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**, 74-108.
14. Jelassi, B., Chantome, A., Alcaraz-Perez, F., Baroja-Mazo, A., Cayuela, M.L., Pelegrin, P., Surprenant, A. and Roger, S. (2011) P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene*, **30**, 2108-22.

15. Jelassi, B., Anchelin, M., Chamouton, J., Cayuela, M.L., Clarysse, L., Li, J., Gore, J., Jiang, L.H. and Roger, S. (2013) Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. *Carcinogenesis*, **34**, 1487-96.
16. Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G. and Le Guennec, J.Y. (2009) Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem*, **284**, 8680-91.
17. Roger, S., Pelegrin, P. and Surprenant, A. (2008) Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J Neurosci*, **28**, 6393-401.
18. Brisson, L., Driffort, V., Benoist, L., Poet, M., Counillon, L., Antelmi, E., Rubino, R., Besson, P., Labbal, F., Chevalier, S., Reshkin, S.J., Gore, J. and Roger, S. (2013) NaV1.5 sodium channels allosterically regulate the NHE-1 exchanger and promote breast cancer cell invadopodial activity. *J Cell Sci*.
19. Friedl, P. and Alexander, S. (2011) Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. *Cell*, **147**, 992-1009.
20. Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N. and Dagnelie, P.C. (2006) Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*, **112**, 358-404.
21. Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.M., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A. and Weisman, G.A. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev*, **58**, 281-341.
22. Maruoka, H., Jayasekara, M.P., Barrett, M.O., Franklin, D.A., de Castro, S., Kim, N., Costanzi, S., Harden, T.K. and Jacobson, K.A. (2011) Pyrimidine nucleotides with 4-alkyloxyimino and terminal tetraphosphate delta-ester modifications as selective agonists of the P2Y(4) receptor. *J Med Chem*, **54**, 4018-33.
23. Rapaport, E. (1988) Experimental cancer therapy in mice by adenine nucleotides. *Eur J Cancer Clin Oncol*, **24**, 1491-7.
24. Rapaport, E. (1983) Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol*, **114**, 279-83.

25. Rapaport, E. and Fontaine, J. (1989) Generation of extracellular ATP in blood and its mediated inhibition of host weight loss in tumor-bearing mice. *Biochem Pharmacol*, **38**, 4261-6.
26. Rapaport, E. (1990) Mechanisms of anticancer activities of adenine nucleotides in tumor-bearing hosts. *Ann N Y Acad Sci*, **603**, 142-9; discussion 149-50.
27. Buzzi, N., Boland, R. and Russo de Boland, A. (2010) Signal transduction pathways associated with ATP-induced proliferation of colon adenocarcinoma cells. *Biochim Biophys Acta*, **1800**, 946-55.
28. Popper, L.D. and Batra, S. (1993) Calcium mobilization and cell proliferation activated by extracellular ATP in human ovarian tumour cells. *Cell Calcium*, **14**, 209-18.
29. Schafer, R., Sedehizade, F., Welte, T. and Reiser, G. (2003) ATP- and UTP-activated P2Y receptors differently regulate proliferation of human lung epithelial tumor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **285**, L376-85.
30. Yaguchi, T., Saito, M., Yasuda, Y., Kanno, T., Nakano, T. and Nishizaki, T. (2010) Higher concentrations of extracellular ATP suppress proliferation of Caco-2 human colonic cancer cells via an unknown receptor involving PKC inhibition. *Cell Physiol Biochem*, **26**, 125-34.
31. Ledur, P.F., Villodre, E.S., Paulus, R., Cruz, L.A., Flores, D.G. and Lenz, G. (2012) Extracellular ATP reduces tumor sphere growth and cancer stem cell population in glioblastoma cells. *Purinergic Signal*, **8**, 39-48.
32. Shabbir, M., Ryten, M., Thompson, C., Mikhailidis, D. and Burnstock, G. (2008) Characterization of calcium-independent purinergic receptor-mediated apoptosis in hormone-refractory prostate cancer. *BJU Int*, **101**, 352-9.
33. Wei, Q., Costanzi, S., Liu, Q.Z., Gao, Z.G. and Jacobson, K.A. (2012) Activation of the P2Y1 receptor induces apoptosis and inhibits proliferation of prostate cancer cells. *Biochem Pharmacol*, **82**, 418-25.
34. Adinolfi, E., Melchiorri, L., Falzoni, S., Chiozzi, P., Morelli, A., Tieghi, A., Cuneo, A., Castoldi, G., Di Virgilio, F. and Baricordi, O.R. (2002) P2X7 receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood*, **99**, 706-8.
35. Wang, Q., Wang, L., Feng, Y.H., Li, X., Zeng, R. and Gorodeski, G.I. (2004) P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**, C1349-58.

36. Zhang, X.J., Zheng, G.G., Ma, X.T., Yang, Y.H., Li, G., Rao, Q., Nie, K. and Wu, K.F. (2004) Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. *Leuk Res*, **28**, 1313-22.
37. Slater, M., Danieletto, S., Pooley, M., Cheng Teh, L., Gidley-Baird, A. and Barden, J.A. (2004) Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Res Treat*, **83**, 1-10.
38. Slater, M., Danieletto, S., Gidley-Baird, A., Teh, L.C. and Barden, J.A. (2004) Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology*, **44**, 206-15.
39. Deli, T., Varga, N., Adam, A., Kenessey, I., Raso, E., Puskas, L.G., Tovari, J., Fodor, J., Feher, M., Szigeti, G.P., Csernoch, L. and Timar, J. (2007) Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int J Cancer*, **121**, 55-65.
40. Solini, A., Cuccato, S., Ferrari, D., Santini, E., Gulinelli, S., Callegari, M.G., Dardano, A., Faviana, P., Madec, S., Di Virgilio, F. and Monzani, F. (2008) Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? *Endocrinology*, **149**, 389-96.
41. Slater, M., Danieletto, S. and Barden, J.A. (2005) Expression of the apoptotic calcium channel P2X7 in the glandular epithelium. *J Mol Histol*, **36**, 159-65.
42. Di Virgilio, F., Ferrari, D. and Adinolfi, E. (2009) P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal*, **5**, 251-6.
43. Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A.L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V. and Di Virgilio, F. (2012) Expression of P2X7 Receptor Increases In Vivo Tumor Growth. *Cancer Res*, **72**, 2957-69.
44. Bilbao, P.S., Santillan, G. and Boland, R. (2010) ATP stimulates the proliferation of MCF-7 cells through the PI3K/Akt signaling pathway. *Arch Biochem Biophys*, **499**, 40-8.
45. Scodelaro Bilbao, P., Boland, R. and Santillan, G. (2010) ATP modulates transcription factors through P2Y2 and P2Y4 receptors via PKC/MAPKs and PKC/Src pathways in MCF-7 cells. *Arch Biochem Biophys*, **494**, 7-14.
46. Li, H.J., Wang, L.Y., Qu, H.N., Yu, L.H., Burnstock, G., Ni, X., Xu, M. and Ma, B. (2011) P2Y2 receptor-mediated modulation of estrogen-induced proliferation of breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, **338**, 28-37.

47. Roger, S., Gillet, L., Baroja-Mazo, A., Surprenant, A. and Pelegrin, P. (2010) C-terminal calmodulin-binding motif differentially controls human and rat P2X7 receptor current facilitation. *J Biol Chem*, **285**, 17514-24.
48. Vandewalle, B., Hornez, L., Revillion, F. and Lefebvre, J. (1994) Effect of extracellular ATP on breast tumor cell growth, implication of intracellular calcium. *Cancer Lett*, **85**, 47-54.
49. Dixon, C.J., Bowler, W.B., Fleetwood, P., Ginty, A.F., Gallagher, J.A. and Carron, J.A. (1997) Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells via P2-purinoceptors. *Br J Cancer*, **75**, 34-9.
50. Wagstaff, S.C., Bowler, W.B., Gallagher, J.A. and Hipskind, R.A. (2000) Extracellular ATP activates multiple signalling pathways and potentiates growth factor-induced c-fos gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis*, **21**, 2175-81.
51. Chen, L., He, H.Y., Li, H.M., Zheng, J., Heng, W.J., You, J.F. and Fang, W.G. (2004) ERK1/2 and p38 pathways are required for P2Y receptor-mediated prostate cancer invasion. *Cancer Lett*, **215**, 239-47.
52. Ando, K., Obara, Y., Sugama, J., Kotani, A., Koike, N., Ohkubo, S. and Nakahata, N. (2010) P2Y2 receptor-Gq/11 signaling at lipid rafts is required for UTP-induced cell migration in NG 108-15 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **334**, 809-19.
53. Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A. and Junger, W.G. (2006) ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science*, **314**, 1792-5.
54. Boucher, I., Rich, C., Lee, A., Marcincin, M. and Trinkaus-Randall, V. (2010) The P2Y2 receptor mediates the epithelial injury response and cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol*, **299**, C411-21.
55. Schumacher, D., Strilic, B., Sivaraj, K.K., Wettschureck, N. and Offermanns, S. (2013) Platelet-Derived Nucleotides Promote Tumor-Cell Transendothelial Migration and Metastasis via P2Y2 Receptor. *Cancer Cell*, **24**, 130-7.

Figure legends

Figure 1: Effect of extracellular ATP on MCF-7 cancer cells viability and growth.

A, Effect of increasing concentrations of extracellular ATP, from 3 to 300 μ M, on MCF-7 cells viability (assessed 24h after incubation) (N=3 independent experiments). **B**, Effect of increasing concentrations of extracellular ATP, from 1 μ M to 3 mM, on MCF-7 cells growth. Culture media were changed every day and cell growth was assessed after 5 days of culture (N=3 independent experiments). *, Statistically different from control condition (vehicle) at $P < 0.05$.

Figure 2: Purinergic stimulation potentiates MCF-7 cancer cell migration.

A, Effect of increasing concentrations of extracellular ATP, from 3 to 30 μ M compared to a control condition (CTL, vehicle), on MCF-7 cells migration (N=4 independent experiments). *** indicates a statistical difference from control condition at $P < 0.001$. **B**, The ATP (30 μ M)-induced increase in MCF-7 cells migration was measured in presence or not of the P2 receptor antagonists suramin (100 μ M) or PPADS (100 μ M) (N=3 independent experiments). * and *** indicate statistical differences from control condition (vehicle, no ATP, no antagonist) at $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively. ++ and +++ indicate statistical differences from the ATP condition at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively. **C**, Basal and ATP-stimulated cell migration were measured in presence or not of the ectonucleotidase apyrase (4 U) (N=3 independent experiments). * and *** indicate statistical differences from control condition (vehicle, no ATP no antagonist) at $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively. +++ indicates a statistical differences from the ATP condition at $P < 0.001$. **D**, Analyses of MCF-7 cells circularity after 24h incubation with 30 μ M ATP (ATP, N= 43 cells) or with vehicle (CTL, N= 51 cells). ** indicates a statistical difference from control condition at $P < 0.01$. **E**, Representative pictures showing F-actin labelling (Phalloidin-AlexaFluor594, red staining) and nucleus staining (DAPI, Blue staining) in MCF-7 cells after 24h incubation with ATP (30 μ M) or with vehicle (control).

Figure 3: Expression and functionality of P2 receptors in MCF-7 breast cancer cells.

A, RT-PCR (40 cycles)-amplified fragments for P2Y receptors and P2X receptors are shown after agarose gel electrophoresis. **B**, P2X receptors functionality was assessed by performing whole-cell patch clamp in MCF-7 cancer cells. Membrane potential was held to -60 mV and whole-cell currents were recorded in response to two 20-s long ATP (30 μ M) stimulations separated by a 2 min interval. **C**, Variations of intracellular calcium levels as measured in MCF-7 cells by using Fluo-4 fluorescence. Cells were placed in a physiological saline extracellular solution (PSS) containing Ca^{2+} (2 mM). ATP (30 μ M) and ionomycin (10 μ M)

were added at times indicated by arrows. **D-H**, intracellular Ca^{2+} was assessed by Fluo-4 fluorescence in MCF-7 cells placed in a Ca^{2+} -free (0-Ca^{2+}) extracellular solution in response to: **(D)** 30 μM ATP alone, or **(E)** after a 2-min long pre-incubation with PLC inhibitor U73122 (10 μM), **(F)** 10 μM UTP, **(G)** 10 μM ADP, **(H)** 10 μM UDP. **I**, Histograms indicating the variation of Fluo-4 fluorescence (ΔF , expressed in arbitrary units A.U.) in MCF-7 cells stimulated with different nucleotides: ATP (30 μM), UTP (10 μM), ADP (10 μM), UDP (10 μM) and 2-ThioUDP (10 μM), in presence (2-Ca^{2+}) or absence (0-Ca^{2+}) of Ca^{2+} in the extracellular saline solution.

Figure 4: Characterization of purinergic receptors involved in the ATP-induced MCF-7 cell migration.

A, Migration of MCF-7 cells, relative to the control condition (CTL, vehicle), upon extracellular stimulation with ATP (30 μM), UTP (10 μM), 2-ThioUTP (10 μM), ADP (10 μM) or UDP (10 μM). ** and *** indicate statistical differences from the control condition (CTL, no agonist) at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively. There is no statistical difference (NS) between ATP, UTP and 2-ThioUTP conditions. **B**, Migration of MCF-7 cells, relative to the control condition (no agonist, vehicle), upon extracellular stimulation with the MRS4062 agonist (selectivity $\text{P2Y}_4 \gg \text{P2Y}_{2/6}$) at 1 and 10 μM . *** indicates a statistical difference from the control condition (no treatment) at $P < 0.001$. **C**, Migration of MCF-7 cells, relative to the control condition (CTL), upon extracellular stimulation with 30 μM ATP, in presence or not of the P2Y_6 antagonist MRS2578 (10 μM). *** and ** indicates a statistical differences from the control condition (CTL) at $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively. There is no statistical difference (NS) between ATP and ATP + MRS2578 conditions. + indicates a statistical difference between MRS2578 and MRS2578 + ATP conditions at $P < 0.05$. **D**, Migration of MCF-7 cells, relative to the control condition (CTL), upon extracellular stimulation with 30 μM ATP, in presence or not of the P2Y_{11} antagonist NF340 (10 μM). ** indicates a statistical difference from the control condition (CTL) at $P < 0.01$. There is no statistical difference (NS) between ATP and ATP + NF340 conditions. ++ indicates a statistical difference between NF340 and NF340 + ATP conditions at $P < 0.01$.

Figure 5: Involvement of P2Y_2 receptors and the ERK signalling pathway in the ATP-induced MCF-7 cell migration

A, Relative migration of MCF-7 cells transfected with small interfering RNA (siRNA) directed against *P2RY2* (siP2Y₂) gene expression or scramble siRNA-A not targeting any known gene as a control (siCTL) upon extracellular stimulation with 10 μM UTP or 10 μM MRS4062. **B**, Migration of MCF-7 cells, relative to the control condition (CTL), upon

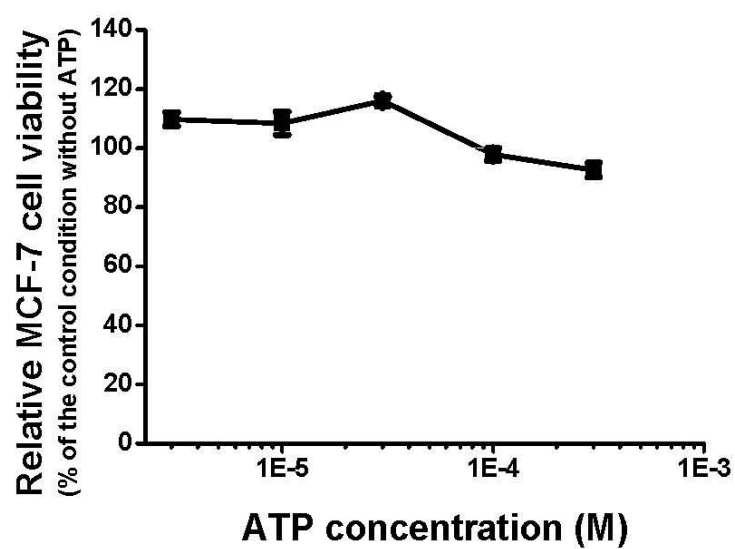
extracellular stimulation with 10 μ M UTP or 10 μ M MRS4062, in presence or not of the MEK inhibitor PD98059 (10 μ M). ** and *** indicate statistical differences from the control condition (no agonist) at $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively. ++ indicates a statistical difference between UTP and UTP + PD98059 conditions at $P<0.01$. ## indicates a statistical difference between MRS4062 and MRS4062 + PD98059 conditions at $P<0.01$. **C**, Western blot experiments showing the activation (phosphorylation on Thr202/Tyr204) of ERK1/2 upon UTP stimulation (10 μ M) in presence or not of the MEK inhibitor PD98059 (10 μ M) as a function of time (0, 10 and 30 min). HSC-70 was used as a loading control. **D**, Histograms showing the relative level of activation of ERK1/2 (pERK / ERK) in same conditions as in C (N= 3 independent experiments). ** indicates a statistical difference from the control condition (no UTP) at $P<0.01$. + indicates a statistical difference between UTP (10 min) and UTP + PD98059 (10 min) conditions at $P<0.05$. **E**, Western blot experiments showing the activation (phosphorylation on Thr202/Tyr204) of ERK1/2 upon MRS4062 stimulation (10 μ M) in presence or not of the MEK inhibitor PD98059 (10 μ M) as a function of time (0, 10 and 30 min). HSC-70 was used as a loading control. **F**, Histograms showing the relative level of activation of ERK1/2 (pERK / ERK) in same conditions as in E (N= 3 independent experiments). ** indicates a statistical difference from the control condition (no MRS4062) at $P<0.01$. + indicates a statistical difference between MRS4062 (10 min) and MRS4062 + PD98059 (10 min) conditions at $P<0.05$. ## indicates a statistical difference between MRS4062 (30 min) and MRS4062 + PD98059 (30 min) conditions at $P<0.01$.

Figure 6: Proposed scheme illustrating the involvement of P2Y₂ receptors and the MEK/ERK1/2 signalling pathway in the ATP/UTP-induced MCF-7 cell migration.

Extracellular ATP or UTP coming from the tumour microenvironment or from the cancer cell could stimulate plasma membrane P2Y₂ receptors that are coupled to G_{q/11}-protein thus activating phospholipase C (PLC). PLC in turn hydrolyzes Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) into diacyl glycerol (DAG) and inositol-1,4,5-triphosphate (Ins(1,4,5)P₃). Ins(1,4,5)P₃ acts as a second messenger that activates the release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum (ER) stores. This signalling pathway would activate the MEK / ERK1/2 pathway to increase MCF-7 cancer cell migration.

Figure 1

A



B

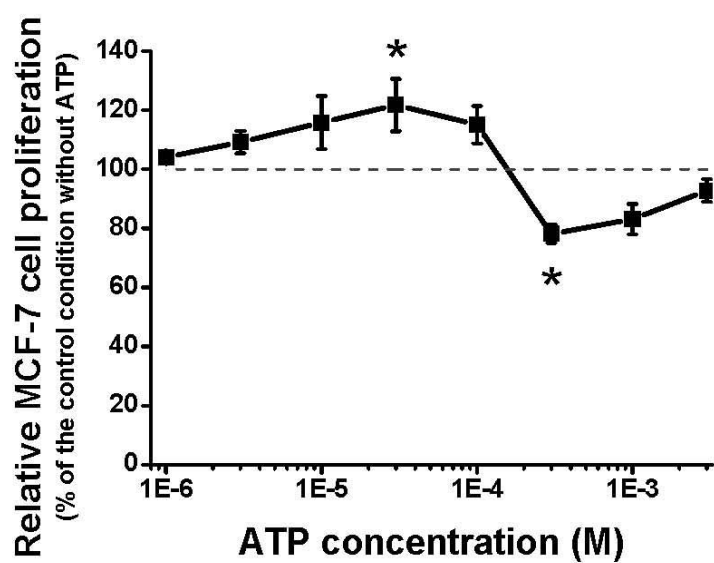


Figure 2

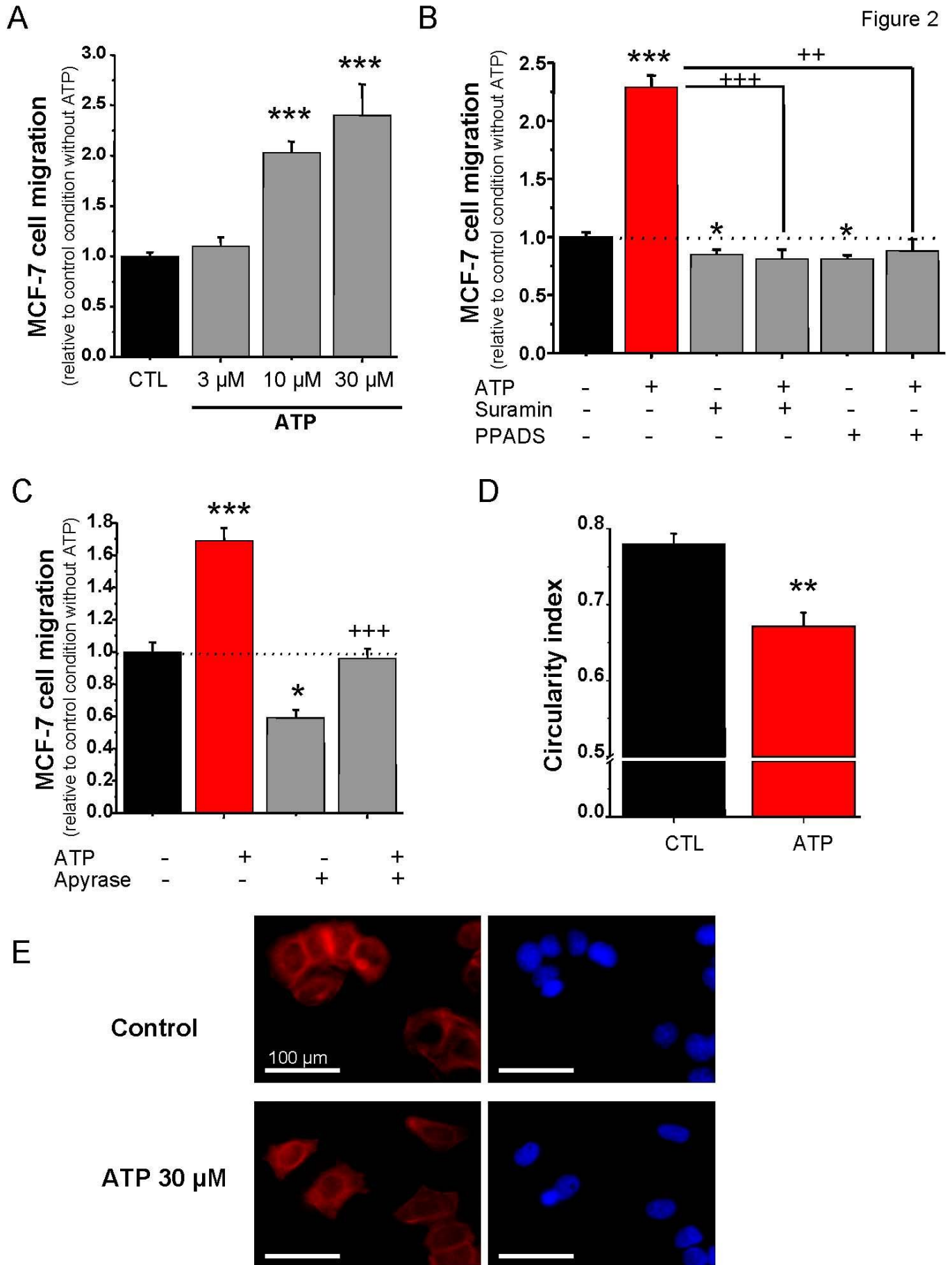


Figure 3

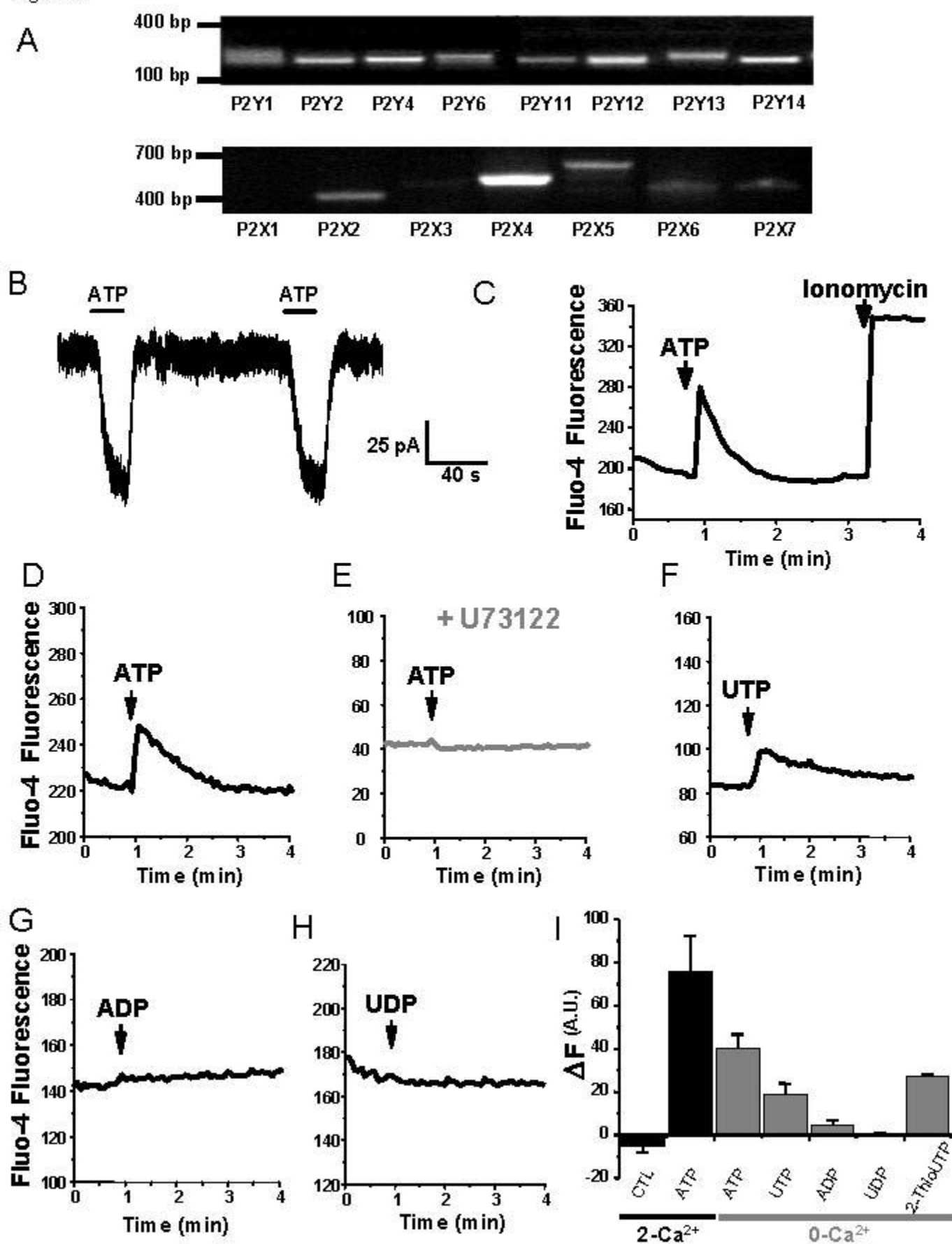
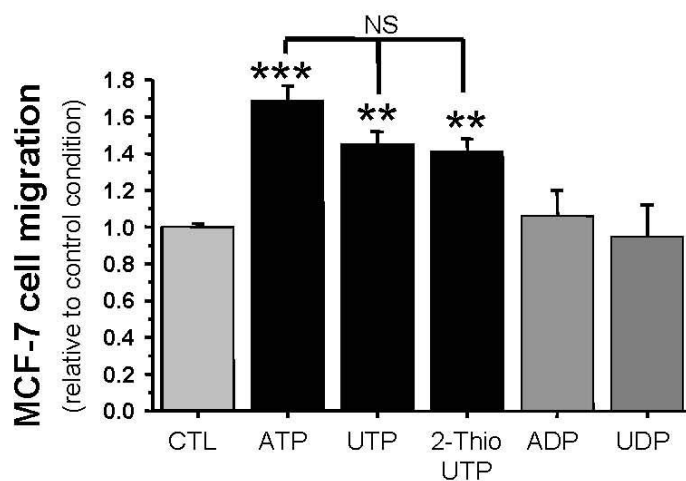
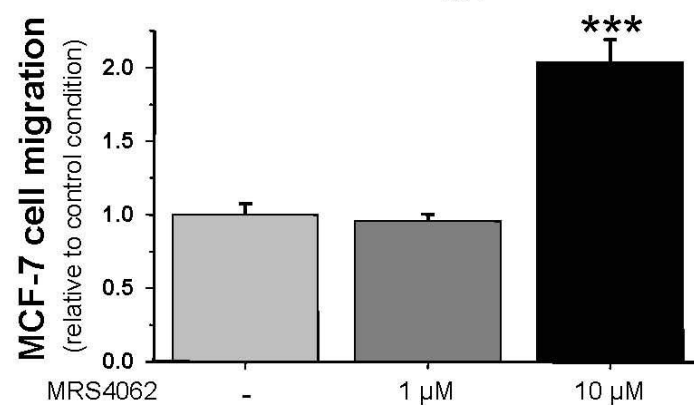


Figure 4

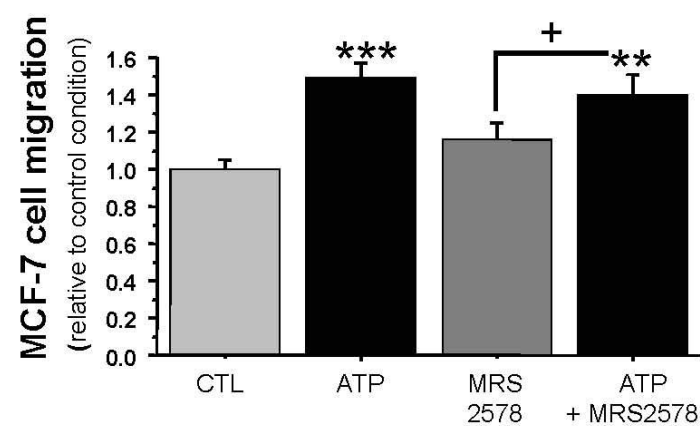
A



B



C



D

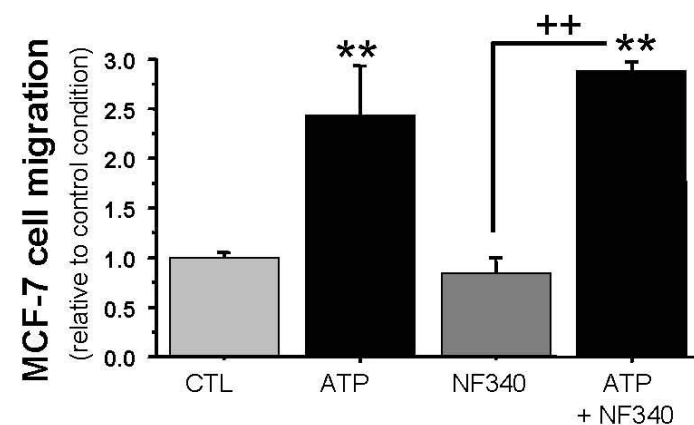


Figure 5

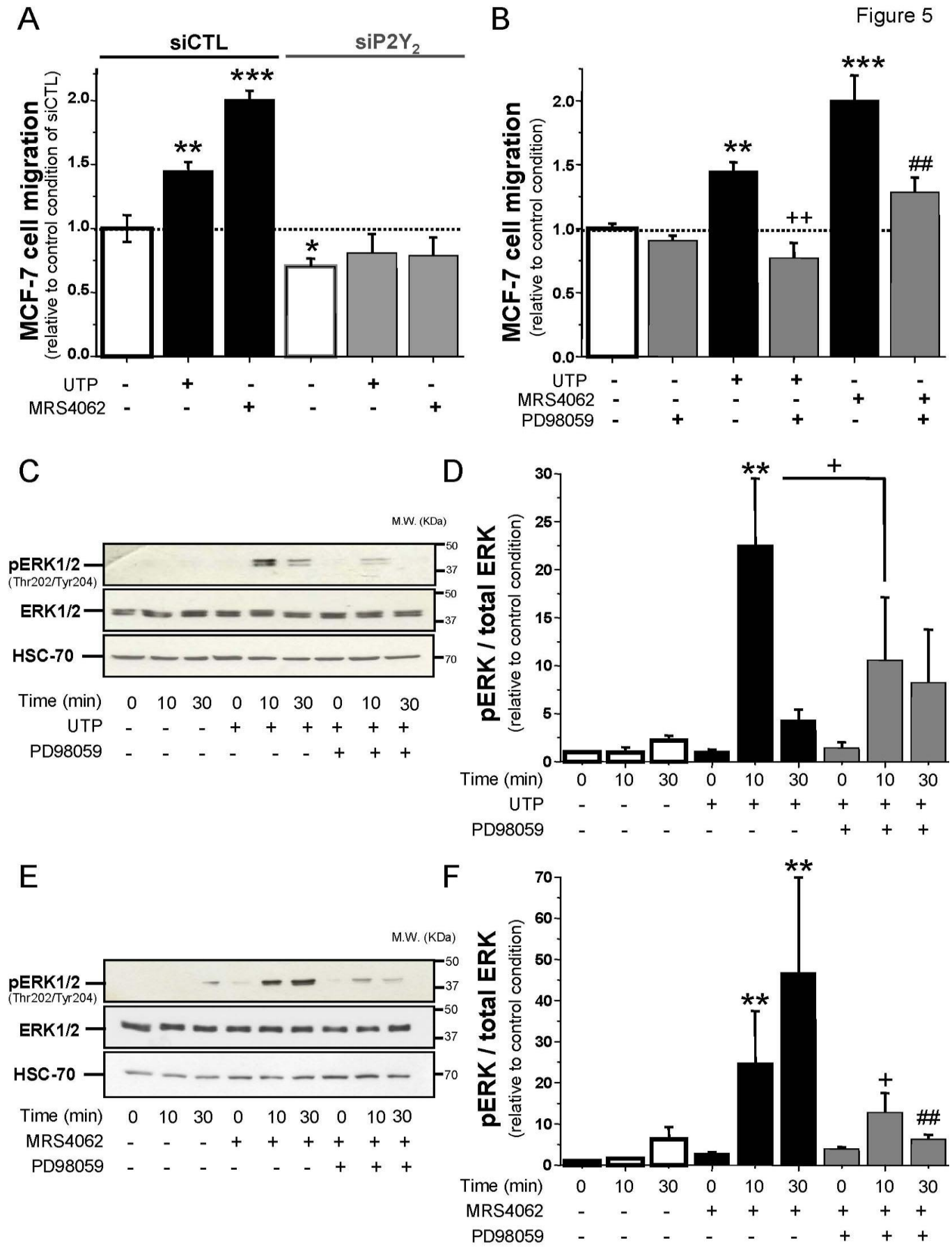
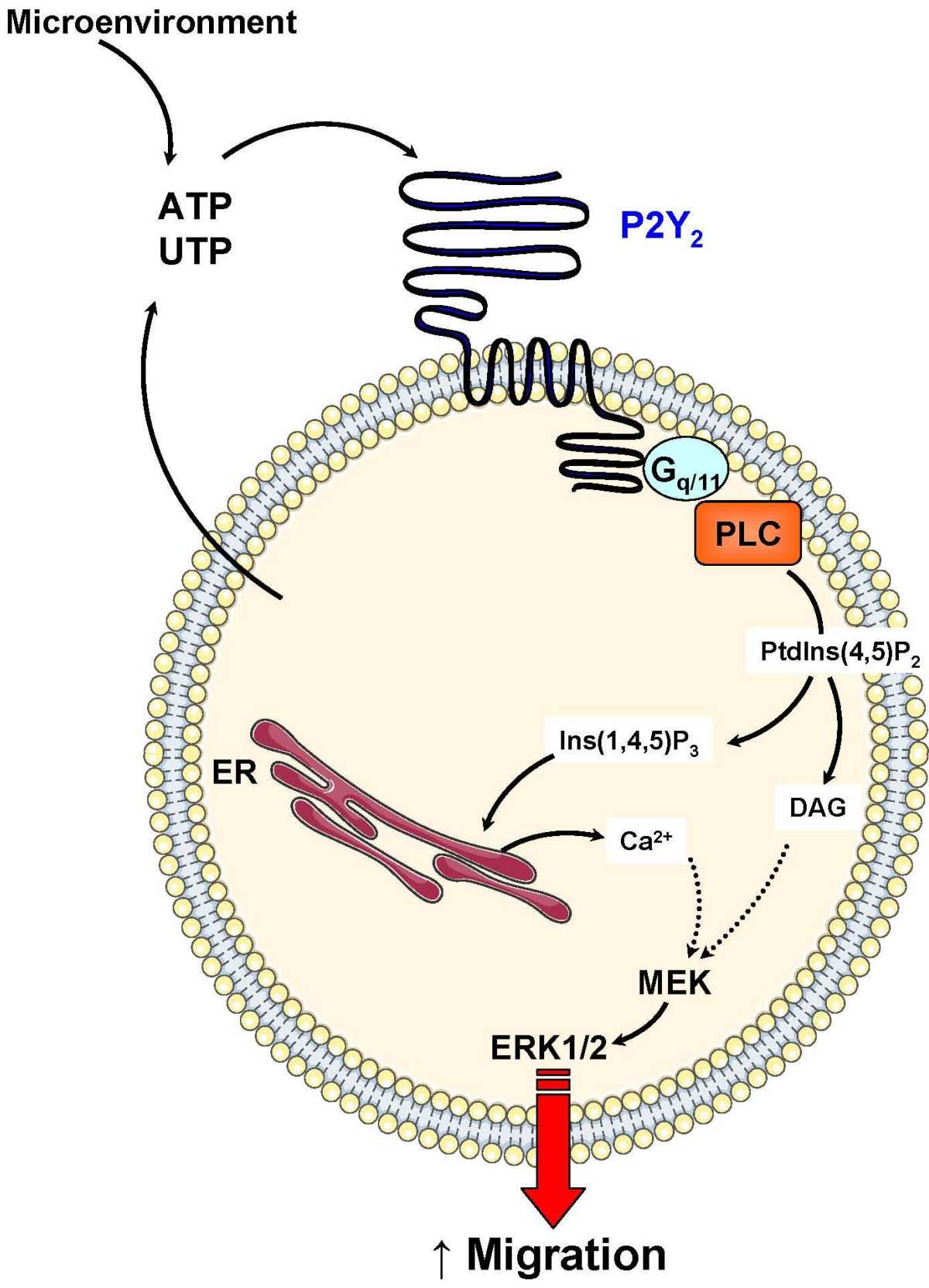


Figure 6



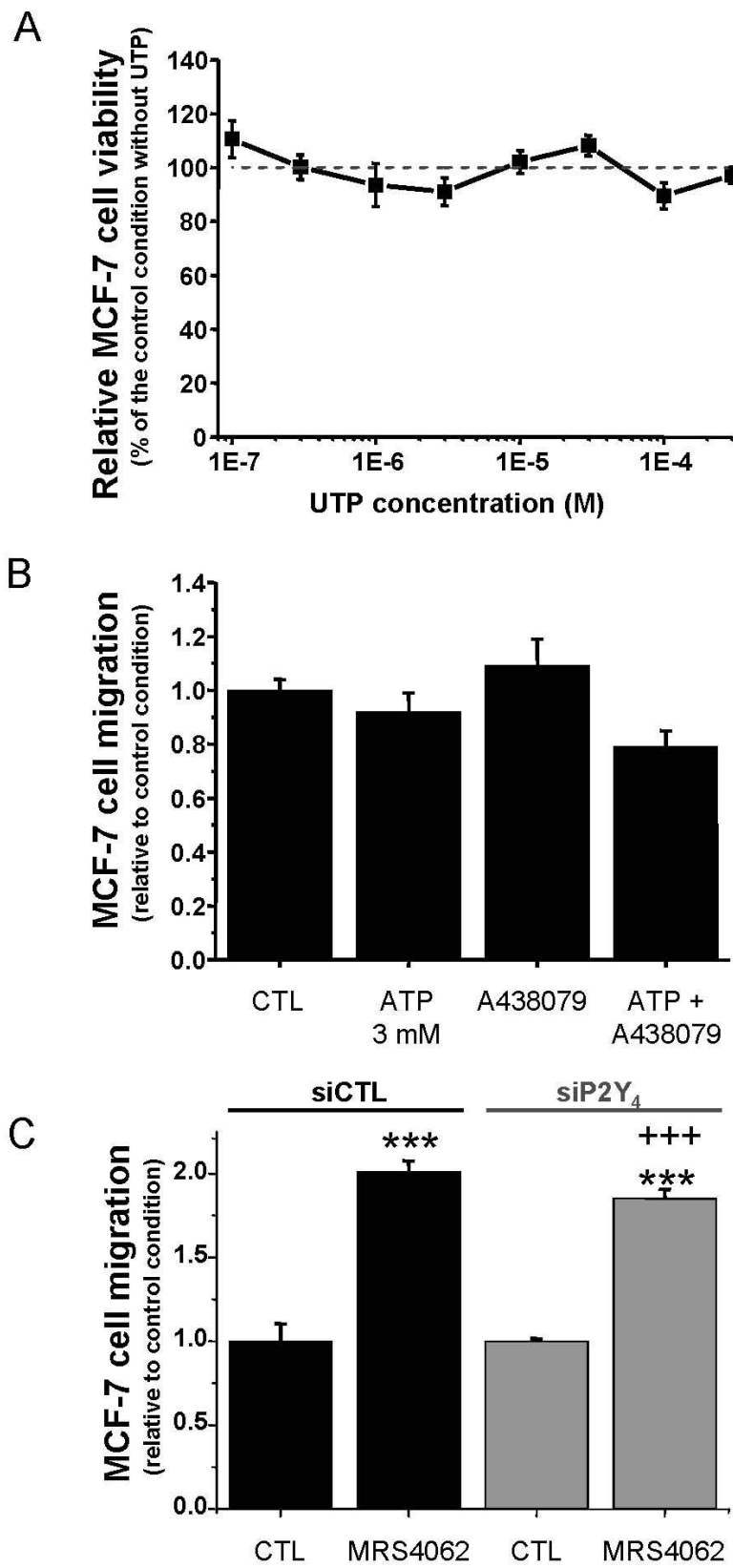
Supplementary Figure legends

Supplementary Figure 1:

A, Effect of increasing concentrations of extracellular UTP, from 0.1 to 300 μ M, on MCF-7 cells viability, assessed after 24 hours of culture (N=3 independent experiments).

B, Effect of 3 mM extracellular ATP on MCF-7 cells migration, relative to a control (CTL) condition without ATP, in presence or not of the P2X₇ receptor antagonist A438079 (10 μ M) (N=3 independent experiments).

C, Relative migration of MCF-7 cancer cells upon extracellular stimulation with the agonist MRS4062 (10 μ M). Cells were transfected with small interfering RNA (siRNA) directed against *P2RY4* gene expression (siP2Y₄) or scramble sequence not targeting any known gene as a control (siCTL). Results are relative to the control condition (no agonist treatment) of the siCTL transfection. *** indicates a statistical difference from the control condition (CTL) of the siCTL transfection at $P < 0.001$. +++ indicates a statistical difference between CTL and MRS4062 conditions of the siP2Y₄ transfection at $P < 0.001$ (N=3 independent experiments).



Bibliographie

Ouvrages électroniques

INSTITUT NATIONAL DU CANCER. *La situation du cancer en France en 2012*. [En ligne], Boulogne-Billancourt : INCa, 2012, [adresse valide vérifiée le 12 novembre 2013]. <http://lesdonnees.e-cancer.fr/>

Sites web consultés

INSTITUT NATIONAL DU CANCER : Les données : Epidémiologie du cancer du sein en France métropolitaine - mortalité : <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/1-types-cancer/9-cancer-sein/6-epidemiologie-du-cancer-du-sein-en-france-metropolitaine-mortalite.html> [adresse valide vérifiée le 12 novembre 2013]

http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/sante/epidemiologie/cancersein/glandemammaire/glande_mamm_cancerisation [adresse valide vérifiée le 12 novembre 2013]

<http://www.cellbiol.net/ste/alphERCEPTIN1.php> [adresse valide vérifiée le 12 novembre 2013]

Servier Medical Art. [adresse valide vérifiée le 12 novembre 2013]. <http://www.servier.fr/servier-medical-art>

Publications internationales

A

Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J.-M., Barnard, E. a, Boyer, J.L., Kennedy, C., Miras-Portugal, M.T., King, B.F., Gachet, C., Jacobson, K. a, et al. (2005). The recently deorphanized GPR80 (GPR99) proposed to be the P2Y₁₅ receptor is not a genuine P2Y receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 8–9.

Abbracchio, M.P., Burnstock, G., Boeynaems, J., Barnard, E.A., Boyer, J.L., Kennedy, C., Knight, G.E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K.A., et al. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol. Rev.* 58, 281–341.

Adinolfi, E., Melchiorri, L., Falzoni, S., Chiozzi, P., Morelli, A., Tieghi, A., Cuneo, A., Castoldi, G., Di Virgilio, F., and Baricordi, O.R. (2002). P2X₇ receptor expression in evolutive and indolent forms of chronic B lymphocytic leukemia. *Blood* 99, 706–708.

Adinolfi, E., Callegari, M.G., Ferrari, D., Bolognesi, C., Minelli, M., Wieckowski, M.R., Pinton, P., Rizzuto, R., and Di Virgilio, F. (2005). Basal activation of the P2X₇ ATP receptor

elevates mitochondrial calcium and potential, increases cellular ATP levels, and promotes serum-independent growth. *Mol. Biol. Cell* 16, 3260–3272.

Adinolfi, E., Callegari, M.G., Cirillo, M., Pinton, P., Giorgi, C., Cavagna, D., Rizzuto, R., and Di Virgilio, F. (2009). Expression of the P2X7 receptor increases the Ca²⁺ content of the endoplasmic reticulum, activates NFATc1, and protects from apoptosis. *J. Biol. Chem.* 284, 10120–10128.

Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A.L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V., and Di Virgilio, F. (2012). Expression of P2X7 receptor increases in vivo tumor growth. *Cancer Res.* 72, 2957–2969.

Adriouch, S., Bannas, P., Schwarz, N., Fliegert, R., Guse, A.H., Seman, M., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2008). ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J.* 22, 861–869.

Amoroso, F., Falzoni, S., Adinolfi, E., Ferrari, D., and Di Virgilio, F. (2012). The P2X7 receptor is a key modulator of aerobic glycolysis. *Cell Death Dis.* 3, e370.

B

Bean, B.P. (1990). ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics. *J. Neurosci.* 10, 1–10.

Becker, D., Woltersdorf, R., Boldt, W., Schmitz, S., Braam, U., Schmalzing, G., and Markwardt, F. (2008). The P2X7 carboxyl tail is a regulatory module of P2X7 receptor channel activity. *J. Biol. Chem.* 283, 25725–25734.

Beigi, R.D., and Dubyak, G.R. (2000). Endotoxin activation of macrophages does not induce ATP release and autocrine stimulation of P2 nucleotide receptors. *J. Immunol.* 165, 7189–7198.

Beijer, S., Hupperets, P.S., van den Borne, B.E., Eussen, S.R., van Henten, A.M., van den Beuken-van Everdingen, M., de Graeff, A., Ambergen, T. a, van den Brandt, P. a, and Dagnelie, P.C. (2009). Effect of adenosine 5'-triphosphate infusions on the nutritional status and survival of preterminal cancer patients. *Anticancer. Drugs* 20, 625–633.

Bell-McGuinn, K.M., Garfall, A.L., Bogoy, M., Hanahan, D., and Joyce, J. a (2007). Inhibition of cysteine cathepsin protease activity enhances chemotherapy regimens by decreasing tumor growth and invasiveness in a mouse model of multistage cancer. *Cancer Res.* 67, 7378–7385.

Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.-V., Molinié, F., Danzon, A., Bara, S., et al. (2008). Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* 56, 159–175.

Bianchi, B.R., Lynch, K.J., Touma, E., Niforatos, W., Burgard, E.C., Alexander, K.M., Park, H.S., Yu, H., Metzger, R., Kowaluk, E., et al. (1999). Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur. J. Pharmacol.* 376, 127–138.

- Bobanovic, L.K., Royle, S.J., and Murrell-Lagnado, R.D. (2002). P2X receptor trafficking in neurons is subunit specific. *J. Neurosci.* 22, 4814–4824.
- Bodin, P., and Burnstock, G. (2001). Purinergic signalling: ATP release. *Neurochem. Res.* 26, 959–969.
- Boumechache, M., Masin, M., Edwardson, J.M., Górecki, D.C., and Murrell-Lagnado, R. (2009). Analysis of assembly and trafficking of native P2X4 and P2X7 receptor complexes in rodent immune cells. *J. Biol. Chem.* 284, 13446–13454.
- Bours, M.J.L., Swennen, E.L.R., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., and Dagnelie, P.C. (2006). Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Ther.* 112, 358–404.
- Boyd, N.F., Lockwood, G. a, Byng, J.W., Tritchler, D.L., and Yaffe, M.J. (1998). Mammographic densities and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 1133–1144.
- Boyle, P., and Boffetta, P. (2009). Alcohol consumption and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 11 Suppl 3, S3.
- Brake, A.J., Wagenbach, M.J., and Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371, 519–523.
- Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., and Jordans, S. (2008). Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 90, 194–207.
- Brown, S.G., Townsend-Nicholson, A., Jacobson, K. a, Burnstock, G., and King, B.F. (2002). Heteromultimeric P2X(1/2) receptors show a novel sensitivity to extracellular pH. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 673–680.
- Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacol. Rev.* 24, 509–581.
- Burnstock, G. (2007a). Purine and pyrimidine receptors. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 1471–1483.
- Burnstock, G. (2007b). Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol. Rev.* 87, 659–797.
- Burnstock, G. (2008). Unresolved issues and controversies in purinergic signalling. *J. Physiol.* 586, 3307–3312.
- Burnstock, G. (2012). Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *Bioessays* 34, 218–225.
- Burnstock, G., and Kennedy, C. (2011). P2X receptors in health and disease. *Adv. Pharmacol.* 61, 333–372.
- Burnstock, G., and Knight, G.E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int. Rev. Cytol.* 240, 31–304.
- Burnstock, G., and Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal.*
- Burnstock, G., Campbell, G., Bennett, M., and Holman, M.E. (1964). Innervation of the guinea-pig taenia coli: are there intrinsic inhibitory nerves which are distinct from sympathetic nerves? *Int. J. Neuropharmacol.* 3, 163–166.

C

- Cabrini, G., Falzoni, S., Forchap, S.L., Pellegatti, P., Balboni, A., Agostini, P., Cuneo, A., Castoldi, G., Baricordi, O.R., and Di Virgilio, F. (2005). A His-155 to Tyr polymorphism confers gain-of-function to the human P2X7 receptor of human leukemic lymphocytes. *J. Immunol.* 175, 82–89.
- Chambers, A.F., Groom, A.C., and MacDonald, I.C. (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.
- Chambers, J.K., Macdonald, L.E., Sarau, H.M., Ames, R.S., Freeman, K., Foley, J.J., Zhu, Y., McLaughlin, M.M., Murdock, P., McMillan, L., et al. (2000). A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J. Biol. Chem.* 275, 10767–10771.
- Chen, J.-F., Eltzschig, H.K., and Fredholm, B.B. (2013). Adenosine receptors as drug targets-what are the challenges? *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 265–286.
- Chen, Y.-Y., Chiang, S.-Y., Lin, J.-G., Ma, Y.-S., Liao, C.-L., Weng, S.-W., Lai, T.-Y., and Chung, J.-G. (2010). Emodin, aloe-emodin and rhein inhibit migration and invasion in human tongue cancer SCC-4 cells through the inhibition of gene expression of matrix metalloproteinase-9. *Int. J. Oncol.* 36, 1113–1120.
- Chessell, I.P., Michel, A.D., and Humphrey, P.P. (1998). Effects of antagonists at the human recombinant P2X7 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 124, 1314–1320.
- Chong, J.-H., Zheng, G.-G., Zhu, X.-F., Guo, Y., Wang, L., Ma, C.-H., Liu, S.-Y., Xu, L.-L., Lin, Y.-M., and Wu, K.-F. (2010). Abnormal expression of P2X family receptors in Chinese pediatric acute leukemias. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391, 498–504.
- Cockcroft, S., and Gomperts, B.D. (1980). The ATP4- receptor of rat mast cells. *Biochem. J.* 188, 789–798.
- Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., and Stojilkovic, S.S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacol. Rev.* 63, 641–683.
- Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., and Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2–5.
- Communi, D., Gonzalez, N.S., Detheux, M., Brézillon, S., Lannoy, V., Parmentier, M., and Boeynaems, J.M. (2001). Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J. Biol. Chem.* 276, 41479–41485.
- Compan, V., Ulmann, L., Stelmashenko, O., Chemin, J., Chaumont, S., and Rassendren, F. (2012). P2X2 and P2X5 subunits define a new heteromeric receptor with P2X7-like properties. *J. Neurosci.* 32, 4284–4296.
- Conus, S., and Simon, H.-U. (2008). Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem. Pharmacol.* 76, 1374–1382.
- Corriden, R., and Insel, P. a (2010). Basal release of ATP: an autocrine-paracrine mechanism for cell regulation. *Sci. Signal.* 3, re1.

Corvol, J.C., Studler, J.M., Schonn, J.S., Girault, J. a, and Hervé, D. (2001). Galpha(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. *J. Neurochem.* 76, 1585–1588.

Costa-Junior, H.M., Sarmiento Vieira, F., and Coutinho-Silva, R. (2011). C terminus of the P2X7 receptor: treasure hunting. *Purinergic Signal.* 7, 7–19.

Coutinho-Silva, R., Corrêa, G., Sater, A.A., and Ojcius, D.M. (2009). The P2X(7) receptor and intracellular pathogens: a continuing struggle. *Purinergic Signal.* 5, 197–204.

D

Dardano, A., Falzoni, S., Caraccio, N., Polini, A., Tognini, S., Solini, A., Berti, P., Di Virgilio, F., and Monzani, F. (2009). 1513A>C polymorphism in the P2X7 receptor gene in patients with papillary thyroid cancer: correlation with histological variants and clinical parameters. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 695–698.

Deli, T., Varga, N., Adám, A., Kenessey, I., Rásó, E., Puskás, L.G., Tóvári, J., Fodor, J., Fehér, M., Szigeti, G.P., et al. (2007). Functional genomics of calcium channels in human melanoma cells. *Int. J. Cancer* 121, 55–65.

De Palma, M., Murdoch, C., Venneri, M.A., Naldini, L., and Lewis, C.E. (2007). Tie2-expressing monocytes: regulation of tumor angiogenesis and therapeutic implications. *Trends Immunol.* 28, 519–524.

De Leeuw, W.J., Berx, G., Vos, C.B., Peterse, J.L., Van de Vijver, M.J., Litvinov, S., Van Roy, F., Cornelisse, C.J., and Cleton-Jansen, A.M. (1997). Simultaneous loss of E-cadherin and catenins in invasive lobular breast cancer and lobular carcinoma in situ. *J. Pathol.* 183, 404–411.

DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 309–316.

Denlinger, L.C., Sommer, J.A., Parker, K., Gudipaty, L., Fisette, P.L., Watters, J.W., Proctor, R.A., Dubyak, G.R., and Bertics, P.J. (2003). Mutation of a dibasic amino acid motif within the C terminus of the P2X7 nucleotide receptor results in trafficking defects and impaired function. *J. Immunol.* 171, 1304–1311.

Ding, S., and Sachs, F. (1999). Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *J. Gen. Physiol.* 113, 695–720.

Di Virgilio, F. (2007). Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 465–472.

Di Virgilio, F. (2012). Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Res.* 72, 5441–5447.

Di Virgilio, F., Ferrari, D., and Adinolfi, E. (2009). P2X(7): a growth-promoting receptor-implications for cancer. *Purinergic Signal.* 5, 251–256.

Donnelly-Roberts, D.L., Namovic, M.T., Han, P., and Jarvis, M.F. (2009). Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1203–1214.

Drury, A.N., and Szent-Györgyi, A. (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J. Physiol.* 68, 213–237.

E

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174.

Egeblad, M., Nakasone, E.S., and Werb, Z. (2010). Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell* 18, 884–901.

Engel, J., Eckel, R., Kerr, J., Schmidt, M., Fürstenberger, G., Richter, R., Sauer, H., Senn, H.-J., and Hölzel, D. (2003). The process of metastatisation for breast cancer. *Eur. J. Cancer* 39, 1794–1806.

Erb, L., Garrad, R., Wang, Y., Quinn, T., Turner, J.T., and Weisman, G.A. (1995). Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J. Biol. Chem.* 270, 4185–4188.

F

Falzone, S., Donvito, G., and Di Virgilio, F. (2013). Detecting adenosine triphosphate in the pericellular space. *Interface Focus* 3, 20120101.

Farrell, A.W., Gadeock, S., Pupovac, A., Wang, B., Jalilian, I., Ranson, M., and Sluyter, R. (2010). P2X7 receptor activation induces cell death and CD23 shedding in human RPMI 8226 multiple myeloma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1800, 1173–1182.

Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893–2917.

Fidler, I.J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.

Fields, R.D., and Burnstock, G. (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 423–436.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186.

Forrester, T. (1972). An estimate of adenosine triphosphate release into the venous effluent from exercising human forearm muscle. *J. Physiol.* 224, 611–628.

Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M., and Kaina, B. (2002). Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br. J. Cancer* 87, 635–644.

G

Gerber, B., Müller, H., Reimer, T., Krause, A., and Friese, K. (2003). Nutrition and lifestyle factors on the risk of developing breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 79, 265–276.

Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., Lalmanach, G., and Le Guennec, J.-Y. (2009). Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 284, 8680–8691.

Gocheva, V., and Joyce, J.A. (2007). Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 6, 60–64.

Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D., and Joyce, J. a (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* 20, 543–556.

Gómez-Villafuertes, R., del Puerto, A., Díaz-Hernández, M., Bustillo, D., Díaz-Hernández, J.I., Huerta, P.G., Artalejo, A.R., Garrido, J.J., and Miras-Portugal, M.T. (2009). Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II signalling cascade mediates P2X7 receptor-dependent inhibition of neuritogenesis in neuroblastoma cells. *FEBS J.* 276, 5307–5325.

Gonzales, E.B., Kawate, T., and Gouaux, E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. *Nature* 460, 599–604.

Gorodeski, G.I. (2009). P2X7-mediated chemoprevention of epithelial cancers. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 1313–1332.

Greig, A.V.H., Linge, C., Healy, V., Lim, P., Clayton, E., Rustin, M.H. a, McGrouther, D.A., and Burnstock, G. (2003). Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *J. Invest. Dermatol.* 121, 315–327.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883–899.

Group, A.B.C.S. (2000). Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group. *Br. J. Cancer* 83, 1301–1308.

Gu, L.-Q., Li, F.-Y., Zhao, L., Liu, Y., Chu, Q., Zang, X.-X., Liu, J.-M., Ning, G., and Zhao, Y.-J. (2010). Association of XIAP and P2X7 receptor expression with lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Endocrine* 38, 276–282.

Gudipaty, L., Humphreys, B.D., Buell, G., and Dubyak, G.R. (2001). Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C943–53.

Guo, C., Masin, M., Qureshi, O.S., and Murrell-Lagnado, R.D. (2007). Evidence for functional P2X4/P2X7 heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* 72, 1447–1456.

Guo, L.-H., Trautmann, K., and Schluesener, H.J. (2005). Expression of P2X4 receptor by lesional activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *J. Neuroimmunol.* 163, 120–127.

Gutiérrez-Martín, Y., Bustillo, D., Gómez-Villafuertes, R., Sánchez-Nogueiro, J., Torregrosa-Hetland, C., Binz, T., Gutiérrez, L.M., Miras-Portugal, M.T., and Artalejo, A.R. (2011). P2X7 receptors trigger ATP exocytosis and modify secretory vesicle dynamics in neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 286, 11370–11381.

H

Haines, W.R., Torres, G.E., Voigt, M.M., and Egan, T.M. (1999). Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X(1) and P2X(5) isoforms. *Mol. Pharmacol.* 56, 720–727.

Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Harden, T.K., Sesma, J.I., Fricks, I.P., and Lazarowski, E.R. (2010). Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor. *Acta Physiol. (Oxf).* 199, 149–160.

Hattori, F., Ohshima, Y., Seki, S., Tsukimoto, M., Sato, M., Takenouchi, T., Suzuki, A., Takai, E., Kitani, H., Harada, H., et al. (2012). Feasibility study of B16 melanoma therapy using oxidized ATP to target purinergic receptor P2X7. *Eur. J. Pharmacol.* 695, 20–26.

Haynes, S.E., Hollopeter, G., Yang, G., Kurpius, D., Dailey, M.E., Gan, W.-B., and Julius, D. (2006). The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 9, 1512–1519.

Hayoz, S., Jia, C., and Hegg, C. (2012). Mechanisms of constitutive and ATP-evoked ATP release in neonatal mouse olfactory epithelium. *BMC Neurosci.* 13, 53.

Hibell, a D., Thompson, K.M., Xing, M., Humphrey, P.P., and Michel, a D. (2001). Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 947–957.

Hoffmann, C., Moro, S., Nicholas, R.A., Harden, T.K., and Jacobson, K.A. (1999). The role of amino acids in extracellular loops of the human P2Y₁ receptor in surface expression and activation processes. *J. Biol. Chem.* 274, 14639–14647.

Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., et al. (2001). Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409, 202–207.

Honore, P., Donnelly-Roberts, D., Namovic, M.T., Hsieh, G., Zhu, C.Z., Mikusa, J.P., Hernandez, G., Zhong, C., Gauvin, D.M., Chandran, P., et al. (2006). A-740003 [N-(1-

{[(cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl]amino}-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1376–1385.

Huang, H.C., Chu, S.H., and Chao, P.D. (1991). Vasorelaxants from Chinese herbs, emodin and scoparone, possess immunosuppressive properties. *Eur. J. Pharmacol.* 198, 211–213.

Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., and Roper, S.D. (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 6436–6441.

Humphreys, B.D., Virginio, C., Surprenant, A., Rice, J., and Dubyak, G.R. (1998). Isoquinolines as antagonists of the P2X7 nucleotide receptor: high selectivity for the human versus rat receptor homologues. *Mol. Pharmacol.* 54, 22–32.

Hunter, K.W., Crawford, N.P.S., and Alsarraj, J. (2008). Mechanisms of metastasis. *Breast Cancer Res.* 10 Suppl 1, S2.

I

Inoue, K., Tsuda, M., and Koizumi, S. (2004). ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *J. Pharmacol. Sci.* 94, 112–114.

J

Jacobson, K. a, and Boeynaems, J.-M. (2010). P2Y nucleotide receptors: promise of therapeutic applications. *Drug Discov. Today* 15, 570–578.

Jain, M., Bakhshi, S., Shukla, A. a, and Chauhan, S.S. (2010). Cathepsins B and L in peripheral blood mononuclear cells of pediatric acute myeloid leukemia: potential poor prognostic markers. *Ann. Hematol.* 89, 1223–1232.

Jarvis, M.F., and Khakh, B.S. (2009). ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56, 208–215.

Jedeszko, C., and Sloane, B.F. (2004). Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol. Chem.* 385, 1017–1027.

Jelassi, B., Chantôme, A., Alcaraz-Pérez, F., Baroja-Mazo, A., Cayuela, M.L., Pelegrin, P., Surprenant, A., and Roger, S. (2011). P2X(7) receptor activation enhances SK3 channels- and cystein cathepsin-dependent cancer cells invasiveness. *Oncogene* 30, 2108–2122.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69–90.

Jiang, L.-H. (2012). P2X receptor-mediated ATP purinergic signaling in health and disease. *Cell Health Cytoskeleton.* 83–101.

Jiang, L.H., Mackenzie, a B., North, R. a, and Surprenant, A. (2000). Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Mol. Pharmacol.* 58, 82–88.

Jiang, L.H., Rassendren, F., Spelta, V., Surprenant, A., and North, R. a (2001). Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 14902–14908.

Jiang, Q., Guo, D., Lee, B.X., Van Rhee, a M., Kim, Y.C., Nicholas, R. a, Schachter, J.B., Harden, T.K., and Jacobson, K. a (1997). A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y1 receptor. *Mol. Pharmacol.* 52, 499–507.

Jones, C. a, Vial, C., Sellers, L. a, Humphrey, P.P. a, Evans, R.J., and Chessell, I.P. (2004). Functional regulation of P2X6 receptors by N-linked glycosylation: identification of a novel alpha beta-methylene ATP-sensitive phenotype. *Mol. Pharmacol.* 65, 979–985.

Joyce, J.A., and Hanahan, D. (2004). Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle* 3, 1516–1619.

Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9, 239–252.

Joyce, J. a, Baruch, A., Chehade, K., Meyer-Morse, N., Giraud, E., Tsai, F.-Y., Greenbaum, D.C., Hager, J.H., Bogoy, M., and Hanahan, D. (2004). Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* 5, 443–453.

K

Kaczmarek-Hájek, K., Lörinczi, E., Hausmann, R., and Nicke, A. (2012). Molecular and functional properties of P2X receptors--recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal.* 8, 375–417.

Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J., and Nedergaard, M. (2008). Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *J. Neurosci.* 28, 4702–4711.

Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., and Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460, 592–598.

Key, T.J., Verkasalo, P.K., and Banks, E. (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2, 133–140.

Khakh, B.S. (2001). Molecular physiology of P2X receptors and ATP signalling at synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 165–174.

Khakh, B.S., and North, R.A. (2006). P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527–532.

Kim, C., Chung, J.M., and Chung, K. (2003). Changes in the gene expression of six subtypes of P2X receptors in rat dorsal root ganglion after spinal nerve ligation. *Neurosci. Lett.* 337, 81–84.

Kim, M., Jiang, L.H., Wilson, H.L., North, R. a, and Surprenant, A. (2001). Proteomic and functional evidence for a P2X7 receptor signalling complex. *EMBO J.* 20, 6347–6358.

King, B.F., Townsend-Nicholson, a, Wildman, S.S., Thomas, T., Spyer, K.M., and Burnstock, G. (2000). Coexpression of rat P2X2 and P2X6 subunits in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 20, 4871–4877.

Kowalski, P.J., Rubin, M. a, and Kleer, C.G. (2003). E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res.* 5, R217–22.

Koyama, M., Kelly, T.R., and Watanabe, K.A. (1988). Novel type of potential anticancer agents derived from chrysophanol and emodin. Some structure-activity relationship studies. *J. Med. Chem.* 31, 283–284.

Künzli, B.M., Berberat, P.O., Giese, T., Csizmadia, E., Kaczmarek, E., Baker, C., Halaceli, I., Büchler, M.W., Friess, H., and Robson, S.C. (2007). Upregulation of CD39/NTPDases and P2 receptors in human pancreatic disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292, G223–30.

L

Lah, T.T., Kalman, E., Najjar, D., Gorodetsky, E., Brennan, P., Somers, R., and Daskal, I. (2000). Cells producing cathepsins D, B, and L in human breast carcinoma and their association with prognosis. *Hum. Pathol.* 31, 149–160.

Lankelma, J.M., Voorend, D.M., Barwari, T., Koetsveld, J., Van der Spek, A.H., De Porto, A.P.N. a, Van Rooijen, G., and Van Noorden, C.J.F. (2010). Cathepsin L, target in cancer treatment? *Life Sci.* 86, 225–233.

Laufs, S., Schumacher, J., and Allgayer, H. (2006). Urokinase-receptor (u-PAR): an essential player in multiple games of cancer: a review on its role in tumor progression, invasion, metastasis, proliferation/dormancy, clinical outcome and minimal residual disease. *Cell Cycle* 5, 1760–1771.

Lazarowski, E.R., Boucher, R.C., and Harden, T.K. (2000). Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations. *J. Biol. Chem.* 275, 31061–31068.

Lazarowski, E.R., Boucher, R.C., and Harden, T.K. (2003). Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol. Pharmacol.* 64, 785–795.

Lê, K.T., Babinski, K., and Séguéla, P. (1998). Central P2X4 and P2X6 channel subunits coassemble into a novel heteromeric ATP receptor. *J. Neurosci.* 18, 7152–7159.

Lewis, C., Neidhart, S., Holy, C., North, R.A., Buell, G., and Surprenant, A. (1995). Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432–435.

Li, D.-M., and Feng, Y.-M. (2011). Signaling mechanism of cell adhesion molecules in breast cancer metastasis: potential therapeutic targets. *Breast Cancer Res. Treat.* 128, 7–21.

Li, X., Zhou, L., Feng, Y.-H., Abdul-Karim, F.W., and Gorodeski, G.I. (2006). The P2X7 receptor: a novel biomarker of uterine epithelial cancers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 1906–1913.

Li, X., Qi, X., Zhou, L., Catera, D., Rote, N.S., Potashkin, J., Abdul-Karim, F.W., and Gorodeski, G.I. (2007). Decreased expression of P2X7 in endometrial epithelial pre-cancerous and cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 106, 233–243.

Liu, L., Zou, J., Liu, X., Jiang, L.-H., and Li, J. (2010). Inhibition of ATP-induced macrophage death by emodin via antagonizing P2X7 receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 640, 15–19.

Lopez-Castejon, G., Theaker, J., Pelegrin, P., Clifton, A.D., Braddock, M., and Surprenant, A. (2010). P2X(7) receptor-mediated release of cathepsins from macrophages is a cytokine-independent mechanism potentially involved in joint diseases. *J. Immunol.* 185, 2611–2619.

Lustig, K.D., Shiao, K., Brake, J., and Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 5113–5117.

Lynch, C.C., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation.* 70, 561–573.

M

Ma, Y.-S., Weng, S.-W., Lin, M.-W., Lu, C.-C., Chiang, J.-H., Yang, J.-S., Lai, K.-C., Lin, J.-P., Tang, N.-Y., Lin, J.-G., et al. (2012). Antitumor effects of emodin on LS1034 human colon cancer cells in vitro and in vivo: roles of apoptotic cell death and LS1034 tumor xenografts model. *Food Chem. Toxicol.* 50, 1271–1278.

Mackenzie, A.B., Young, M.T., Adinolfi, E., and Surprenant, A. (2005). Pseudoapoptosis induced by brief activation of ATP-gated P2X7 receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 33968–33976.

Masterson, J., and O’Dea, S. (2007). Posttranslational truncation of E-cadherin and significance for tumour progression. *Cells. Tissues. Organs* 185, 175–179.

McGee, S.F., Lanigan, F., Gilligan, E., and Groner, B. (2006). Mammary gland biology and breast cancer. Conference on Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer Progression. *EMBO Rep.* 7, 1084–1088.

Metcalfe, K., Lubinski, J., Lynch, H.T., Ghadirian, P., Foulkes, W.D., Kim-Sing, C., Neuhausen, S., Tung, N., Rosen, B., Gronwald, J., et al. (2010). Family history of cancer and cancer risks in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 1874–1878.

Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., et al. (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334, 1573–1577.

Minn, A.J., Kang, Y., Serganova, I., Gupta, G.P., Giri, D.D., Doubrovin, M., Ponomarev, V., Gerald, W.L., Blasberg, R., and Massagué, J. (2005). Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumors. *J. Clin. Invest.* 115, 44–55.

Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 764–775.

Müller, a, Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., et al. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50–56.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 8, 618–631.

Murphy, N., and Lynch, M. a (2012). Activation of the P2X7 receptor induces migration of glial cells by inducing cathepsin B degradation of tissue inhibitor of metalloproteinase 1. *J. Neurochem.* 123, 761–770.

N

Nelson, D.W., Gregg, R.J., Kort, M.E., Perez-Medrano, A., Voight, E. a, Wang, Y., Grayson, G., Namovic, M.T., Donnelly-Roberts, D.L., Niforatos, W., et al. (2006). Structure-activity relationship studies on a series of novel, substituted 1-benzyl-5-phenyltetrazole P2X7 antagonists. *J. Med. Chem.* 49, 3659–3666.

Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* 9, 274–284.

Nicke, A. (2008). Homotrimeric complexes are the dominant assembly state of native P2X7 subunits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 803–808.

Nicke, A., Kerschensteiner, D., and Soto, F. (2005). Biochemical and functional evidence for heteromeric assembly of P2X1 and P2X4 subunits. *J. Neurochem.* 92, 925–933.

Nkondjock, A., and Ghadirian, P. (2005). Facteurs de risque du cancer du sein. 21.

North, R.A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol. Rev.* 82, 1013–1067.

Nouh, M. a, Mohamed, M.M., El-Shinawi, M., Shaalan, M. a, Cavallo-Medved, D., Khaled, H.M., and Sloane, B.F. (2011). Cathepsin B: a potential prognostic marker for inflammatory breast cancer. *J. Transl. Med.* 9, 1.

Novak, I., Jans, I.M., and Wohlfahrt, L. (2010). Effect of P2X(7) receptor knockout on exocrine secretion of pancreas, salivary glands and lacrimal glands. *J. Physiol.* 588, 3615–3627.

O

Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S.J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M.K.K., Huang, X., Caldwell, S., Liu, K., Smith, P., et al. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13132–13137.

Olsson, H. (2000). Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 345–350.

Orriss, I.R., Knight, G.E., Utting, J.C., Taylor, S.E.B., Burnstock, G., and Arnett, T.R. (2009). Hypoxia stimulates vesicular ATP release from rat osteoblasts. *J. Cell. Physiol.* 220, 155–162.

P

Paget, S. (1889). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* 8, 98–101.

Pantel, K., and Brakenhoff, R.H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat. Rev. Cancer* 4, 448–456.

Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor. *EMBO J.* 25, 5071–5082.

Pellegatti, P., Falzoni, S., Pinton, P., and Rizzuto, R. (2005). A Novel Recombinant Plasma Membrane-targeted Luciferase Reveals a New Pathway for ATP Secretion. *16*, 3659–3665.

Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V., and Di Virgilio, F. (2008). Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* 3, e2599.

Peto, J., Collins, N., Barfoot, R., Seal, S., Warren, W., Rahman, N., Easton, D.F., Evans, C., Deacon, J., and Stratton, M.R. (1999). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 943–949.

Pfeiffer, Z.A., Aga, M., Prabhu, U., Watters, J.J., Hall, D.J., and Bertics, P.J. (2004). The nucleotide receptor P2X7 mediates actin reorganization and membrane blebbing in RAW 264.7 macrophages via p38 MAP kinase and Rho. *J. Leukoc. Biol.* 75, 1173–1182.

Pharoah, P.D., Day, N.E., Duffy, S., Easton, D.F., and Ponder, B. a (1997). Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer* 71, 800–809.

Q

Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141, 39–51.

R

- Raffaghello, L., Chiozzi, P., Falzoni, S., Di Virgilio, F., and Pistoia, V. (2006). The P2X7 receptor sustains the growth of human neuroblastoma cells through a substance P-dependent mechanism. *Cancer Res.* 66, 907–914.
- Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413–492.
- Rassendren, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R.A., and Surprenant, A. (1997a). Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J.* 16, 3446–3454.
- Rassendren, F., Buell, G.N., Virginio, C., Collo, G., North, R.A., and Surprenant, A. (1997b). The permeabilizing ATP receptor, P2X7. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* 272, 5482–5486.
- Rathinam, R., and Alahari, S.K. (2010). Important role of integrins in the cancer biology. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 223–237.
- Ren, S., Zhang, Y., Wang, Y., Lui, Y., Wei, W., Huang, X., Mao, W., and Zuo, Y. (2010). Targeting P2X7 receptor inhibits the metastasis of murine P388D1 lymphoid neoplasm cells to lymph nodes. *Cell Biol. Int.* 34, 1205–1211.
- Ridley, A.J. (2011). Life at the leading edge. *Cell* 145, 1012–1022.
- Roberts, J. a, Vial, C., Digby, H.R., Agboh, K.C., Wen, H., Atterbury-Thomas, A., and Evans, R.J. (2006). Molecular properties of P2X receptors. *Pflugers Arch.* 452, 486–500.
- Roger, S., Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2008). Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *J. Neurosci.* 28, 6393–6401.
- Roger, S., Gillet, L., Baroja-Mazo, A., Surprenant, A., and Pelegrin, P. (2010a). C-terminal calmodulin-binding motif differentially controls human and rat P2X7 receptor current facilitation. *J. Biol. Chem.* 285, 17514–17524.
- Roger, S., Mei, Z.-Z., Baldwin, J.M., Dong, L., Bradley, H., Baldwin, S. a, Surprenant, A., and Jiang, L.-H. (2010b). Single nucleotide polymorphisms that were identified in affective mood disorders affect ATP-activated P2X7 receptor functions. *J. Psychiatr. Res.* 44, 347–355.

S

- Sakurai-Yageta, M., Recchi, C., Le Dez, G., Sibarita, J.-B., Daviet, L., Camonis, J., D’Souza-Schorey, C., and Chavrier, P. (2008). The interaction of IQGAP1 with the exocyst complex is required for tumor cell invasion downstream of Cdc42 and RhoA. *J. Cell Biol.* 181, 985–998.
- Sappino, A.P., Skalli, O., Jackson, B., Schürch, W., and Gabbiani, G. (1988). Smooth-muscle differentiation in stromal cells of malignant and non-malignant breast tissues. *Int. J. Cancer* 41, 707–712.

- Schwab, J.M., Guo, L., and Schluesener, H.J. (2005). Spinal cord injury induces early and persistent lesional P2X4 receptor expression. *J. Neuroimmunol.* 163, 185–189.
- Schwarz, N., Fliegert, R., Adriouch, S., Seman, M., Guse, A.H., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2009). Activation of the P2X7 ion channel by soluble and covalently bound ligands. *Purinergic Signal.* 5, 139–149.
- Schwiebert, E.M., and Zsembery, A. (2003). Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1615, 7–32.
- Scully, O.J., Bay, B., Yip, G., and Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 9, 311–320.
- Seman, M., Adriouch, S., Scheuplein, F., Krebs, C., Freese, D., Glowacki, G., Deterre, P., Haag, F., and Koch-Nolte, F. (2003). NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity* 19, 571–582.
- Sengstake, S., Boneberg, E.-M., and Illges, H. (2006). CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs. *Int. Immunol.* 18, 1171–1178.
- Sevenich, L., Werner, F., Gajda, M., Schurigt, U., Sieber, C., Müller, S., Follo, M., Peters, C., and Reinheckel, T. (2011). Transgenic expression of human cathepsin B promotes progression and metastasis of polyoma-middle-T-induced breast cancer in mice. *Oncogene* 30, 54–64.
- Slater, M., Scolyer, R. a, Gidley-Baird, A., Thompson, J.F., and Barden, J. a (2003). Increased expression of apoptotic markers in melanoma. *Melanoma Res.* 13, 137–145.
- Slater, M., Danieleto, S., Gidley-Baird, A., Teh, L.C., and Barden, J. a (2004a). Early prostate cancer detected using expression of non-functional cytolytic P2X7 receptors. *Histopathology* 44, 206–215.
- Slater, M., Danieleto, S., Pooley, M., Cheng Teh, L., Gidley-Baird, A., and Barden, J. a (2004b). Differentiation between cancerous and normal hyperplastic lobules in breast lesions. *Breast Cancer Res. Treat.* 83, 1–10.
- Slater, M., Danieleto, S., and Barden, J.A. (2005). Expression of the apoptotic calcium channel P2X7 in the glandular epithelium is a marker for early prostate cancer and correlates with increasing PSA levels. *J. Mol. Histol.* 36, 159–165.
- Sluyter, R., and Stokes, L. (2011). Significance of P2X7 receptor variants to human health and disease. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 5, 41–54.
- Smart, M.L., Gu, B., Panchal, R.G., Wiley, J., Cromer, B., Williams, D. a, and Petrou, S. (2003). P2X7 receptor cell surface expression and cytolytic pore formation are regulated by a distal C-terminal region. *J. Biol. Chem.* 278, 8853–8860.
- Solini, A., Cuccato, S., Ferrari, D., Santini, E., Gulinelli, S., Callegari, M.G., Dardano, A., Faviana, P., Madec, S., Di Virgilio, F., et al. (2008). Increased P2X7 receptor expression and function in thyroid papillary cancer: a new potential marker of the disease? *Endocrinology* 149, 389–396.

Sorensen, C.E., and Novak, I. (2001). Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. Use of fluorescent probes and confocal microscopy. *J. Biol. Chem.* 276, 32925–32932.

Stagg, J., Divisekera, U., Duret, H., Sparwasser, T., Teng, M.W.L., Darcy, P.K., and Smyth, M.J. (2011). CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.* 71, 2892–2900.

Steinberg, T.H., Newman, a S., Swanson, J. a, and Silverstein, S.C. (1987). ATP4-permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. *J. Biol. Chem.* 262, 8884–8888.

Stelmashenko, O., Lalo, U., Yang, Y., Bragg, L., North, R.A., and Compan, V. (2012). Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules. *Mol. Pharmacol.* 82, 760–766.

Stokes, L., and Surprenant, A. (2009). Dynamic regulation of the P2X4 receptor in alveolar macrophages by phagocytosis and classical activation. *Eur. J. Immunol.* 39, 986–995.

Suadicani, S.O., Brosnan, C.F., and Scemes, E. (2006). P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. *J. Neurosci.* 26, 1378–1385.

Surprenant, A., Rassendren, F., Kawashima, E., North, R.A., and Buell, G. (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272, 735–738.

Symons, M., and Segall, J.E. (2009). Rac and Rho driving tumor invasion: who's at the wheel? *Genome Biol.* 10, 213.

T

Tabolacci, C., Lentini, A., Mattioli, P., Provenzano, B., Oliverio, S., Carlomosti, F., and Beninati, S. (2010). Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16-F10 melanoma cells. *Life Sci.* 87, 316–324.

Tafani, M., Schito, L., Pellegrini, L., Villanova, L., Marfe, G., Anwar, T., Rosa, R., Indelicato, M., Fini, M., Pucci, B., et al. (2011a). Hypoxia-increased RAGE and P2X7R expression regulates tumor cell invasion through phosphorylation of Erk1/2 and Akt and nuclear translocation of NF- κ B. *Carcinogenesis* 32, 1167–1175.

Tafani, M., Di Vito, M., Frati, A., Pellegrini, L., De Santis, E., Sette, G., Eramo, A., Sale, P., Mari, E., Santoro, A., et al. (2011b). Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma. *J. Neuroinflammation* 8, 32.

Takai, E., Tsukimoto, M., Harada, H., Sawada, K., Moriyama, Y., and Kojima, S. (2012). Autocrine regulation of TGF- β 1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. *J. Cell Sci.* 125, 5051–5060.

Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70, 5649–5669.

Tang, C.-M., and Yu, J. (2013). Hypoxia-inducible factor-1 as a therapeutic target in cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 28, 401–405.

Torres, G.E., Egan, T.M., and Voigt, M.M. (1999). Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J. Biol. Chem.* 274, 6653–6659.

Tsukimoto, M., Maehata, M., Harada, H., Ikari, A., Takagi, K., and Degawa, M. (2006). P2X7 receptor-dependent cell death is modulated during murine T cell maturation and mediated by dual signaling pathways. *J. Immunol.* 177, 2842–2850.

U

Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., and Rassendren, F. (2008). Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *J. Neurosci.* 28, 11263–11268.

V

Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Surprenant, A., and Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371, 516–519.

Van Damme, J., Struyf, S., and Opdenakker, G. (2004). Chemokine-protease interactions in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 14, 201–208.

Van Rhee, A.M., Fischer, B., Van Galen, P.J., and Jacobson, K.A. (1995). Modelling the P2Y purinoceptor using rhodopsin as template. *Drug Des. Discov.* 13, 133–154.

Vasiljeva, O., Korovin, M., Gajda, M., Brodoefel, H., Bojic, L., Krüger, A., Schurigt, U., Sevenich, L., Turk, B., Peters, C., et al. (2008). Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice. *Oncogene* 27, 4191–4199.

Verhoef, P. a, Estacion, M., Schilling, W., and Dubyak, G.R. (2003). P2X7 receptor-dependent blebbing and the activation of Rho-effector kinases, caspases, and IL-1 beta release. *J. Immunol.* 170, 5728–5738.

W

Wang, Q., Li, X., Wang, L., Feng, Y.-H., Zeng, R., and Gorodeski, G. (2004a). Antiapoptotic effects of estrogen in normal and cancer human cervical epithelial cells. *Endocrinology* 145, 5568–5579.

Wang, Q., Wang, L., Feng, Y.-H., Li, X., Zeng, R., and Gorodeski, G.I. (2004b). P2X7 receptor-mediated apoptosis of human cervical epithelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C1349–58.

Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, a N., Smart, T.G., King, B.F., Burnstock, G., and Barnard, E. a (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 324, 219–225.

Wei, W., Ryu, J.K., Choi, H.B., and McLarnon, J.G. (2008). Expression and function of the P2X(7) receptor in rat C6 glioma cells. *Cancer Lett.* 260, 79–87.

Wendt, M.K., Taylor, M. a, Schiemann, B.J., and Schiemann, W.P. (2011). Down-regulation of epithelial cadherin is required to initiate metastatic outgrowth of breast cancer. *Mol. Biol. Cell* 22, 2423–2435.

White, N., Butler, P.E.M., and Burnstock, G. (2005). Human melanomas express functional P2 X(7) receptors. *Cell Tissue Res.* 321, 411–418.

White, P.J., Webb, T.E., and Boarder, M.R. (2003). Characterization of a Ca²⁺ response to both UTP and ATP at human P2Y₁₁ receptors: evidence for agonist-specific signaling. *Mol. Pharmacol.* 63, 1356–1363.

Wiley, J.S., Chen, R., Wiley, M.J., and Jamieson, G.P. (1992). The ATP₄- receptor-operated ion channel of human lymphocytes: inhibition of ion fluxes by amiloride analogs and by extracellular sodium ions. *Arch. Biochem. Biophys.* 292, 411–418.

Wiley, J.S., Dao-Ung, L.P., Gu, B.J., Sluyter, R., Shemon, A.N., Li, C., Taper, J., Gallo, J., and Manoharan, A. (2002). A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X₇ receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet* 359, 1114–1119.

Wu, P.-Y., Lin, Y.-C., Chang, C.-L., Lu, H.-T., Chin, C.-H., Hsu, T.-T., Chu, D., and Sun, S.H. (2009). Functional decreases in P2X₇ receptors are associated with retinoic acid-induced neuronal differentiation of Neuro-2a neuroblastoma cells. *Cell. Signal.* 21, 881–891.

Y

Yamaguchi, H., and Oikawa, T. (2010). Membrane lipids in invadopodia and podosomes: key structures for cancer invasion and metastasis. *Oncotarget* 1, 320–328.

Yegutkin, G.G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim. Biophys. Acta* 1783, 673–694.

Yilmaz, M., and Christofori, G. (2010). Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol. Cancer Res.* 8, 629–642.

Youlden, D.R., Cramb, S.M., Dunn, N. a M., Muller, J.M., Pyke, C.M., and Baade, P.D. (2012). The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 36, 237–248.

Z

Zhang, X.-J., Zheng, G.-G., Ma, X.-T., Yang, Y.-H., Li, G., Rao, Q., Nie, K., and Wu, K.-F. (2004). Expression of P2X7 in human hematopoietic cell lines and leukemia patients. *Leuk. Res.* 28, 1313–1322.

Zhang, Y., Gong, L., Zhang, H., Du, Q., You, J., Tian, X., and Fang, W. (2010). Extracellular ATP enhances in vitro invasion of prostate cancer cells by activating Rho GTPase and upregulating MMPs expression. *Cancer Lett.* 293, 189–197.

Zhou, L., Qi, X., Potashkin, J. a, Abdul-Karim, F.W., and Gorodeski, G.I. (2008). MicroRNAs miR-186 and miR-150 down-regulate expression of the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor by activation of instability sites at the 3'-untranslated region of the gene that decrease steady-state levels of the transcript. *J. Biol. Chem.* 283, 28274–28286.

Zhu, S., Wang, Y., Wang, X., Li, J., and Hu, F. (2013). Emodin inhibits ATP-induced IL-1 β secretion, ROS production and phagocytosis attenuation in rat peritoneal macrophages via antagonizing P2X7 receptor. *Pharm. Biol.* 5.

IMPLICATION DES RÉCEPTEURS P2X₇ DANS L'INVASIVITÉ DES CELLULES CANCÉREUSES HUMAINES

Résumé

Le récepteur-canal P2X₇ est fortement exprimé et est fonctionnel dans la lignée de cellules cancéreuses mammaires humaines hautement invasives MDA-MB-435s. L'activation de P2X₇ par l'ATP extracellulaire est responsable de l'émission des prolongements cellulaires et l'augmentation de la migration cellulaire. En outre, l'activation de P2X₇ augmente l'invasion cellulaire à travers la matrice extracellulaire et fait intervenir la libération de forme mature de cathepsines à cystéine dans le milieu extracellulaire. L'inhibition pharmacologique de P2X₇ diminue l'invasivité des cellules cancéreuses dans un modèle de micrométastases chez le poisson zèbre. Nous avons également montré que l'émodine (1,3,8-trihydroxy-6-méthylanthraquinone) une anthraquinone isolée de *Rheum officinale* Baill (Rhubarbe chinoise) inhibe l'invasivité des cellules cancéreuses humaines via l'antagonisme de P2X₇ et n'as pas d'effet sur les autres récepteurs P2X. Nos résultats démontrent un nouveau mécanisme entre la fonctionnalité de P2X₇ dans les cellules cancéreuses et l'invasivité cellulaire, un paramètre clé dans la croissance tumorale et le développement des métastases. Ceci suggère également un rôle thérapeutique potentiel pour les antagonistes des P2X₇.

Mots-clés: Récepteur P2X₇, migration cellulaire, invasivité cellulaire, cathepsines à cystéine, émodine

Abstract

P2X₇ receptor channel is highly expressed and fully functional in the highly invasive human breast cancer cell line MDA-MB-435s. Its activation by extracellular ATP is responsible for the extension of neurite-like cellular prolongations, and the increase in cell migration. Furthermore, P2X₇ activation enhanced invasion through the extracellular matrix and was related to the increase of mature forms of cysteine cathepsins in the extracellular medium. Pharmacological targeting of P2X₇ decreases cancer cell invasiveness in a zebrafish model of micrometastases. We also showed that emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone) an anthraquinone derivative originally isolated from *Rheum officinale* Baill (Chinese Rhubarb) inhibits human cancer cell invasiveness by specifically antagonizing the P2X₇ and not the other members of the P2X family. Our results demonstrate a novel mechanistic link between P2X₇ functionality in cancer cells and invasiveness, a key parameter in tumour growth and in the development of metastases. These results also suggest a potential therapeutic role for the newly developed P2X₇ antagonists.

Keywords: P2X₇ receptors, migration, cancer cell invasion, cystein cathepsins, emodin