

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

Inserm UMR 1069 Nutrition, Croissance et Cancer

THÈSE présentée par :

Lucie CLARYSSE

soutenue le : 11 Octobre 2013

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François-Rabelais de Tours**

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

Régulation du canal SK3 par l'AMPC et le calcium extracellulaire dans les cellules cancéreuses du sein

THÈSE dirigée par :

M. VANDIER Christophe

Professeur des Universités, Université de Tours

RAPPORTEURS :

M. ROUDBARAKI Morad

Professeur des Universités, Université de Lille 1

M. KAMEL Saïd

Professeur des Universités, Université d'Amiens

JURY :

M. ROUDBARAKI Morad

Professeur des Universités, Université Lille 1

M. KAMEL Saïd

Professeur des Universités, Université d'Amiens

M. VANDECASTEELE Grégoire

Directeur de Recherche INSERM, Université Paris 11

M. CHEVALIER Stéphan

Professeur des Universités, Université de Tours

M. VANDIER Christophe

Professeur des Universités, Université de Tours

« Y como no sabía que fuera imposible, le hizo » A. Einstein

Para Ti y para siempre tuya.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser mes sincères remerciements aux membres de mon jury de thèse ayant accepté de juger ce travail en Octobre prochain, malgré leurs emplois du temps chargés. J'adresse un grand merci particulier aux Professeurs Saïd Kamel et Morad Roudbaraki, pour avoir pris le temps de relire ce travail avec attention en tant que rapporteurs de cette thèse. J'espère que je serais à la hauteur des questions et discussions que nous pourrions avoir lors de la soutenance.

Je remercie également le Docteur Grégoire Vandecasteele, pour l'intérêt qu'il a toujours porté à notre travail et pour la semaine très intéressante et sympathique que j'ai passé dans son laboratoire à Chatenay-Malabry. C'était une superbe expérience et j'en garde de très bons souvenirs. Merci pour tous les conseils scientifiques (et non scientifiques) ! Le fait que tu aies accepté d'être examinateur au sein de mon jury de thèse me touche beaucoup. Vive l'AMPc et le FRET !

Merci au Professeur Philippe Bougnoux, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire Nutrition, Croissance et Cancer en Master 1, et jusqu'à la fin de cette thèse. Merci également pour l'intérêt avec lequel vous avez assisté à mes présentations de résultats pendant ces 5 années.

Je souhaite également remercier le Professeur Stéphan Chevalier, qui a pris le relais du Pr. Bougnoux en tant que Directeur de l'unité Inserm U1069 dans laquelle j'ai eu la chance de réaliser mes travaux de thèse. Merci d'être resté accessible et disponible malgré tes responsabilités, et d'avoir pris du temps pour nous aider à avancer dans ce travail de thèse et de rédaction de l'article.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Professeur Christophe Vandier. La thèse n'est pas un long fleuve tranquille, et tu as toujours été présent et à l'écoute, ce qui a rendu la tâche bien plus simple pour moi. Merci d'avoir toujours su trouver les mots pour me rassurer et trouver des solutions à tous les problèmes, qu'ils soient d'ordre scientifique, ou non. Je croise les doigts pour les futures manips, mais avec toi aux commandes, je ne m'inquiète pas trop.

Je souhaite remercier le Docteur Aurélie Chantôme, de m'avoir encadrée (ou plutôt supportée) pendant mon M2 puis ma thèse. J'ai appris beaucoup de choses grâce à toi, toutes les techniques et des milliers d'astuces utiles. J'ai compris que pour aller au bout de

cette thèse, il fallait s'armer de patience, et de ténacité. Bon courage pour tes travaux de recherche.

Merci à tous les collègues du département de Physiologie Animale, Nicolas Peineau, Gilles Bedfer, Marilou Fauquet, Maryse Pingaud et François Gannier. Vous avez contribué au plaisir que j'ai pu prendre à enseigner et au fait que je prenne maintenant cette voie. Merci au Dr Patrick Vourc'h de l'unité Inserm U930, de m'avoir initiée à la technique de qPCR, et de m'avoir permis d'accéder à la plateforme de l'UTILL. Merci également pour tous les conseils et les encouragements.

Merci également à l'équipe de l'unité Inserm U966, du troisième étage bâtiment Dutrochet, pour m'avoir accueillie souvent pour les manip ! Un grand merci à Anne, Alain et Mélanie, pour l'aide précieuse et les discussions que nous avons eues. Merci Mélanie pour la relecture !

Qu'aurait été ce travail sans Toi, Marie Potier-Cartereau (yes ! je l'ai écrit sans faute !) ? Tu es une personne tellement géniale, que ce soit pour tes qualités scientifiques, et aussi pour tes capacités à toujours voir les choses du bon côté, avec un positivisme sans faille. Merci pour tout le soutien, la correction de ce manuscrit, les petits textos de motivation ! Malgré ton absence physique de cette fin de thèse, pour cause d'Arthrose, tu as su être hyper présente, et je pense que sans toi, ça n'aurait vraiment pas été facile ! Alors merci, merci, merci ! (Je pourrais continuer longtemps mais il y a déjà trop de pages dans ce manuscrit !) Bonne route à toi, Ben et Arthuro (el guapo !), mais avec ta vie parfaite (^^), aucun doute qu'elle sera belle ;-).

Les canaux ioniques, c'est la vie ! (Il paraît). Un merci à toi aussi, qui est toujours là pour embaumer le bureau 3, mais aussi pour égayer nos journées ! C'est grâce à toi que j'ai vécu cette expérience, puisque tu m'as donné le goût de la recherche en Master 1, et même si cela n'a pas été simple pour moi, j'en garde une bonne expérience et tu y as largement contribué ! Merci Seb !

Ah Pietro, el Pietro ! Je ne sais pas trop quoi dire tellement il y a de raisons pour lesquelles il faut que je te remercie. Docteur Besson, saches que tu es la personne la plus cultivée et intelligente que je connaisse. Tu n'es pas que cultivé, tu es aussi très attentionné. Merci d'avoir toujours été à mes côtés, enfin plutôt, dans mon dos (au sens littéral du terme !)... Si tu avais eu des enfants, ils auraient été aussi heureux que moi de te côtoyer, et

de grandir sous ton « aile ». Si seulement tu te voyais comme nous te voyons, tu irais encore plus loin !

Je souhaite remercier tous les membres du laboratoire N2C, qui ont rendu ces 3 ans de thèse et deux ans de Master très agréables, dans une ambiance bon enfant et exceptionnelle. Merci à Cath' pour ton efficacité et ta gentillesse (et ton talent de bijoutière !). Merci à Isa et Dinedine d'avoir pris du temps pour nous aider, et d'avoir toujours fait en sorte que l'on ait tout ce dont on pouvait avoir besoin pour les manips ! Merci Julie (la grande) pour la relecture du mat et mét biomol ! Merci à Karine, Karo, Aurore (vive les dunois !) pour les petites attentions et autres discussions.

Merci aux anciens, les « vieux thésards », pour les superbes moments que l'on a pu passer à la fin de vos thèses, et au début de la mienne ! C'était une ambiance incomparable, qui donnait la pêche ! Voir vos trognes sur le mur d'électrophy m'a bien encouragée (et surtout bien faite marrer, bien longtemps après vos départs !). Merci donc à Banban, Sophie, Mimsy, Lucie (la petite, pas si petite !), Aurélia, Romain et Ludo ! Bon vent à vous tous, vous méritez que votre vie soit belle !

Merci aux ptits M2, Charlychou, Laurianne, Oriane et Julie, vous qui m'avez tellement soutenue pendant la rédaction, vous êtes des choux, et vous allez me manquer ! Vous êtes la crème de la crème, et je vous souhaite toute la réussite que vous souhaitez et que vous méritez ! Bon courage et merci également à Emeline et Audrey. Bon courage à la relève, Maxime et Yann. Merci pour le temps précieux que vous m'avez accordé pour m'aider à mettre les bouchées doubles à la fin de cette thèse.

Merci à mes co-thésards, Ramez (Ramsex), Bilel (Bilouuuul) et Virginie (Virginouf) ! Nous avons vraiment passé de bons moments, et même si on a mis un peu de temps à s'approcher et à se comprendre, je suis très heureuse d'avoir partagé toutes ces galères, mais aussi ces instants de complicité, et je vous remercie pour le soutien et la bonne humeur qui a régné entre nous ! Plein de courage à tous pour la fin, c'est hard, mais on survit !

Merci à tous mes amis, qui sont tous aussi géniaux, et disponibles et d'un grand soutien en toute circonstance ! Merci à Choupi, qui a été là au début et qui est toujours là, plus de la même manière, mais toujours aussi attentionné et adorable. Merci à mes « collègues » de l'ADOCT : Rimoric, Fx, Aurore, Marmotte, Fillot, Anthony M., Loïc, Stéphanie, Flavie ...! Je suis désolée d'avance si j'en oublie, et faites tout pour que cette

super asso continue à aider et donner la patate aux doctorants de Tours city ! Merci à mes potes chartrains : Chouchou (myyyy giftttt issss myyy sonng), Les Jumelles et leurs chéris (Tulpain power), à Aurore et JB, on a vraiment passé des supers moments de détente et de folie, qui m'ont beaucoup apporté pendant ces deux dernières années ! Et ça va continuer !!!

Merci à tous mes amis de la grande asso SGDF ! Le scoutisme, c'est ma vie, et vous y avez une grande place ! Merci à tous les chefs et cheftaines avec qui j'ai pu faire des camps, tous mes collègues accompagnateurs pédagogiques du Territoire Centre Loire qui déboite, et à tous les chefs que j'ai pu accompagner ! Merci spécial à Pierre, Marie, Jojo Patate, Pupuce, Iris (vive les chats-princesses FB), Carole (rolcacaààààà), Yassin (ouais t'es pas scout et alors ?) Fx, Elo et Geo (vive les piok) et Flococo ! Merci pour ces valeurs que nous partageons, et sachez que vous comptez beaucoup à mes yeux ! Un big up tout spécial à Simon, toutes ces lignes n'existeraient pas sans ton génie de l'informatique !! Merci à ma Bieutche, pour ton soutien à toute épreuve, je te souhaite de réussir tout ce que tu entreprendras et d'être heureuse, avec tes supers projets humanitaires tellement tournés vers l'autre. Merci pour tout et tout et aussi, tout ! =)

Un énorme Merci à mes collègues de Master, avec qui j'ai vraiment apprécié les mercredi soir aux Berthoms ! Mais tellement d'autres choses aussi ! Merci à Justine, Chachoune, Louis-Val, et Bricou ! Vous êtes géniaux et je vous souhaite le meilleur, en espérant vous avoir près de moi dans les autres moments importants à venir ! Merci tout spécial à Ma Claire, toi qui a toujours su être là pour moi, j'espère que je l'ai été aussi, et le serais toujours, de mon côté. Tu vas cartonner en Italie, ou ailleurs, tu es la meilleure !

Un gigantesque Merci à Laure (d'Hossegor) et Fabio (Il dottore Cazzo). A nous trois, on aurait pu changer le monde ! A la mode Minus et Cortex !!! Je tiens tellement à vous, vous n'avez pas idée. Je vous dois tellement, sans vous, je ne serais pas en train d'écrire ces mots aujourd'hui ! C'est dommage je ne peux ni me moquer de vos accents si chantants et entraînants par écrit (ni d'une certaine démarche humhum...) mais le cœur y est ! Bref, que de réussite à vous souhaiter pour la suite, vous êtes brillants ! Merci d'exister. (On va à la guinguette ?)

Merci à mes cop's du foyer, qui m'ont fait découvrir et aimer Tours. Un grand merci à toi ma Xiki pour ton soutien et tes mots réconfortants malgré la distance, et ta vision de la vie si enjouée et positive qui me donne la frite ! Tu as une place si importante dans ma vie

que je ne trouve pas les mots pour te remercier. La vida es bella contigo, no existe palabras para decirte cuanto te quiero! Muxas gracias por ser como eres. (y Al tambien ^^).

Que serait la vie, sans les zaaaamis zinzins !? Merci à vous, qui êtes là, depuis dix ans (onze ? douze... ? je ne les compte plus, parce que quand on aime...) et une fois encore, dans les derniers moments de la rédaction, vous êtes présents. Merci donc pour votre soutien sans faille à : Pipoooo et Gawelle Castapouet (la correction etc ^^ et à mini Castapouet), à Gg et Clairoune, à mes deux Henryyyyyyyys préférés (Il a dit Capoué !), et à mon Prout (on va crever dans l'canouuuuuu). C'est sûr, on finira notre vie dans une maison de retraite où il ne faudra pas nous empêcher de chanter : followww the leader followww the leader !!oh oh ! lalaliliiiiilaaaalaala (bref). Je vous aime. Merci aussi à Alex, Béné, et tous mes amis du Lycée et de lonnnngue date (Docrothée !).

Je souhaite aussi remercier ma (future ?) belle famille, la super Famille Tiercelin ! Vous êtes tous merveilleux et c'est un vrai plaisir de passer du temps avec vous. Merci à Pépi, Milaure, Marion, Jeff, Emma (et Pauline ! qui a deux jours aujourd'hui !!), Lucie, Fx, Solange et Simon. Vous formez une belle famille (dans les deux sens du terme) et je me sens chanceuse ! Et merci aussi aux Gab's et à Domi, les supers collègues de Tonio, qui m'ont bien soutenue, et grâce à qui j'ai pu prendre de bons bols d'air salvateurs à Morillard city farm ! Merci également à toi, Vincent, à tes ptites vaches, ta tomme et ta merveilleuse crème fraîche pour tout le soutien et le grand air que vous m'avez apportés dans les derniers moments de la thèse !

Je ne sais pas trop quoi écrire te concernant, mais je sais que malgré tout ce qui a pu arriver... J'ai pu me prouver que j'étais capable d'aller jusqu'au bout, et c'est ma plus grande fierté, en espérant qu'elle fera aussi la tienne. Merci de m'avoir donné la vie, et la chance de faire des études longues, enrichissantes et passionnantes.

Merci à ma famille, Mam, Cam et Maya. C'est beaucoup d'émotions d'écrire ces mots car vous savez à quel point je vous aime, et à quel point je vous suis reconnaissante de rendre ma vie si joyeuse. J'ai de la chance de vous avoir. La vie nous a forgé une belle petite famille et je ne voudrais en changer pour rien au monde. Merci pour votre soutien ! (et merci à Nico et Francis (avé l'accent dou sud hein !). Je suis fière d'être ta fille Maman, et votre sœur Cam et Maya ! Merci également à Pouch et Mouch, les grands parents les plus géniaux du monde, tellement adorables et attentionnés ; et à mes supers tatas Sylvioune et

Yéyé (et mes supers tontons aussi)! Merci à mes cousinous Marinou, Valen, Quentin, Tanguy, Matthiassou, Alexouille, Emma et Titou ! Je suis fière de faire partie de cette famille.

Il me faut aussi remercier quelqu'un que personne ne remercie jamais (enfin je ne crois pas avoir lu de remerciements de thèse en parlant)... Je voudrais te remercier, toi, ma thèse. Cela n'a pas été facile de te côtoyer tous les jours, de t'avoir en tête très (trop) souvent... Mais cela n'a pas été que des difficultés, et il y a eu bien des joies grâce à toi, la manip qui marche au bout d'un certain temps d'acharnement, la commande qui arrive pile poil pour la manip urgente, le sourire de mon directeur de thèse quand une manip va dans le sens de notre hypothèse, le poste de patch que j'affectionne particulièrement... et surtout, Merci, car grâce à toi, j'ai plus appris que pendant mes 5 années d'études qui t'ont précédé, j'ai appris la persévérance, la ténacité, et pourquoi pas la volonté... ?

Enfin, je voudrais te remercier, Toi, mi hombre, El Tonio. Mon Tierceprout, ces 250 pages (et quelques) ne suffiraient pas pour décrire la façon dont tu as changé ma vie, et à quel point je suis heureuse de t'avoir. J'aurais cru que la rédaction et la fin de la thèse allaient être très difficiles, mais avec toi à mes côtés, tout paraît plus simple et réalisable. Merci de rendre ma vie aussi jolie, d'être aussi attentionné et rassurant, et d'être Toi (et pas que pour ce que tu crois ^^). No hay nadie más importante en mi vida que ti, me haces viajar, sonreír, ser feliz, y todo lo que deseo. Mi único sueño es de compartir toda mi vida contigo. Solo tengo una cosa que decirte más: TQMMMMM, y más. Je te dois tellement... et vive les Scouts et Guides de France, deuxième agence matrimoniale de France =) !

Résumé

Le tissu osseux représente un site préférentiel pour le développement de métastases du cancer du sein. Nous avons démontré l'implication d'un canal K^+ de petite conductance activé par le Ca^{2+} intracellulaire, le canal SK3, dans la migration des cellules cancéreuses de sein MDA-MB-435s et le développement de métastases osseuses de type ostéolytique (Chantôme et al 2013). L'objectif de cette thèse a été d'étudier des mécanismes régulant le canal SK3 dans un contexte de métastases osseuses. Nous nous sommes intéressés au Ca^{2+} extracellulaire car l'ostéolyse entraîne sa libération dans le microenvironnement osseux. Nous avons voulu déterminer si ce Ca^{2+} extracellulaire pouvait moduler l'expression et l'activité du canal SK3. Afin de répondre à ces questions, nous avons eu recours à de nombreuses techniques telles que le western blot, la qPCR et les gènes rapporteurs (luciférase) afin de quantifier les effets du Ca^{2+} extracellulaire sur l'expression de SK3. De plus, nous avons eu recours à une technique de mesure de la migration cellulaire et de mesure de la $[Ca^{2+}]$ cytosolique par fluorescence (Fura-2AM), ainsi qu'à la technique de patch clamp, pour étudier l'activité du canal SK3 en réponse à ce Ca^{2+} extracellulaire. Nous avons montré que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{ext.}$: i) favorise l'expression protéique et transcriptionnelle de SK3. Cette modulation fait intervenir le récepteur au calcium (CaSR), qui en diminuant la quantité d'AMPC intracellulaire réduit l'activité de la PKA et lève ainsi son inhibition de la transcription du gène *KCNN3* (codant pour SK3) ; ii) favorise la migration cellulaire dépendante du canal SK3, mécanisme impliquant également le CaSR ; iii) active le canal SK3 qui, par ailleurs, voit son activité réduite par l'élévation de la $[AMPC]_{int.}$. De plus, l'augmentation d'AMPC déplace un canal calcique partenaire de SK3, le canal Orai 1, hors des radeaux lipidiques et diminue ainsi l'entrée constitutive de Ca^{2+} et la migration cellulaire dépendantes du canal SK3. L'ensemble de ces résultats montre que l'expression et l'activité de SK3 sont régulées par l'AMPC et le Ca^{2+} extracellulaire. Ces résultats permettent d'envisager une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant l'AMPC pour le traitement des métastases osseuses du cancer du sein.

Mots clés : SK3, AMPC, Ca^{2+} , CaSR, PKA, métastases osseuses, Orai 1.

Abstract

Bone is one of the most common sites of metastasis in breast cancer. We recently showed that the small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, SK3 channel, is a mediator of MDA-MB-435s breast cancer cells migration and of osteolytic bone metastasis development of breast cancer. The aim of my PhD was to elucidate some of the molecular mechanisms that may explain how bone microenvironment regulate SK3 channel which in turn triggers metastases development. Considering that upon osteolysis the mineralized bone matrix could release Ca^{2+} , we hypothesized that this release could modulate SK3 expression and activity. To assess this question, we used several techniques, including western blot, quantitative PCR, and gene reporter luciferase to quantify extracellular Ca^{2+} effects on SK3 expression, migration assays and cytosolic Ca^{2+} measurements (Fura-2) and patch clamp technique to measure SK3 activity in response to a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$ increase. We show that increasing $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$: i) increases SK3 expression through Calcium Sensing Receptor (CaSR) activation which, in turn, decreases $[\text{AMPC}]_{\text{int}}$ and PKA activation, leading to a reduction of its inhibition effect on *KCNN3* (SK3 gene) transcription; ii) increases SK3-dependent migration through CaSR activation; iii) increases SK3 channel activity that is in addition, decreased by intracellular cAMP elevation. Furthermore, cAMP elevation moves the Ca^{2+} channel Orai1 (SK3 partner) outside of lipid rafts and reduce the SK3 dependent-constitutive Ca^{2+} entry and cell migration. Taken together, our results show that both SK3 expression and activity are regulated by cAMP and extracellular Ca^{2+} . These results underscore an innovative opportunity to use therapeutic approaches targeting cAMP for the treatment of breast cancer bone metastasis.

Keywords: SK3, cAMP, External calcium, CaSR, bone metastasis, Orai1.

Publications:

1. **Clarysse L.**, Gueguinou M., Potier-Cartereau M., Vandecasteele G., Bougnoux P., Chevalier S., Chantôme A., Vandier C. cAMP inhibition of SK3 channel: consequence on the regulation of Ca²⁺ entry and cancer cell migration by SK3-Orai1 complex (*en cours*)
2. Aure K. ¹, Dubourg O. ¹, Jardel C., **Clarysse L.**, Damien Sternberg,, Emmanuel Fournier, P. L., nathalie streichenberger, Petiot Philippe, Helene, Gervais-Bernard, c. v., Anne-Laure Bedat-Millet, Valerie Drouin-Garraud,, and Frederic Bouillaud, C. V., Bertrand Fontaine, and Anne Lombès (2013) Episodic weakness due to mitochondrial DNA MT-ATP6/8 mutations. *Neurology (sous presse)*.
3. Jelassi, B., Anachelin, 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, 1487-1496
4. Chantôme, A.¹, Potier-Cartereau, M.¹, **Clarysse, L.**, Fromont, G., Marionneau-Lambot, S., Gueguinou, M., Pages, J. C., Collin, C., Oullier, T., Girault, A., Arbion, F., Haelters, J. P., Jaffres, P. A., Pinault, M., Besson, P., Joulin, V., Bougnoux, P., and Vandier, C. (2013) Pivotal role of the lipid raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res (sous presse)*.

1 : co-premiers auteurs.

Table des matières

I. Introduction	24
1.1. Généralités sur les métastases osseuses	25
1.1.1. Historique et chiffres clés	25
a) Histoire des métastases	25
b) Chiffres clés	28
1.1.2. Mécanismes connus conduisant à l'apparition des métastases osseuses dans le cancer du sein	31
a) Généralités sur les mécanismes à l'origine du développement de métastases	31
b) Une cible métastatique préférentielle du cancer du sein, l'os	38
Le tissu osseux : généralités.....	38
L'os : un tissu dynamique	39
Facteurs extracellulaires de la niche osseuse favorisant les métastases osseuses	41
1.1.3. Implication du CaSR dans le développement tumoral et métastatique	45
a) Généralités sur le CaSR	45
b) Rôles physiologiques du CaSR.....	49
c) Implication du CaSR dans le cancer du sein et les métastases osseuses.....	51
1.2. Rôle des canaux potassiques de petite conductance activés par le Ca²⁺ (SKCa) dans le développement tumoral et métastatique	53
1.2.1. Généralités sur les SK_{Ca}	54
a) Phylogénie et nomenclature des SK _{Ca}	54
b) Structure des SK _{Ca}	56
c) Electrophysiologie et pharmacologie des SK _{Ca}	61
Electrophysiologie des SK _{Ca}	61
Pharmacologie des SKCa.....	64
1.2.2. Rôles physiologiques et pathologiques des canaux SK3	66
a) Rôles physiologiques de SK3	66
b) Rôles pathologiques de SK3	67
1.2.3. Régulation du canal SK3	68
1.2.4. Rôle du canal SK3 dans la biologie de la cellule cancéreuse	70
a) Canaux potassiques et cancer.....	70
b) SKCa et cancer.....	71

1.2.5. Rôle de SK3 dans le développement de métastases osseuses.....	73
1.3. Rôle de l'AMPC dans le développement métastatique	79
1.3.1. Généralités.....	79
a) Régulation de la [AMPC] _{int} : balance entre les activités de l'adénylate cyclase et des phosphodiesterases.....	79
b) La protéine kinase dépendante de l'AMPC : la PKA	83
c) Autres effecteurs de l'AMPC :	84
d) Régulation transcriptionnelle dépendante de l'AMPC	87
1.3.2. Rôle de la voie AMPc dans la biologie de la cellule cancéreuse.....	92
a) Rôle de la voie AMPc dans la prolifération des cellules cancéreuses	92
b) Rôle de la voie AMPc dans la migration des cellules cancéreuses.....	94
c) Rôle de la voie AMPc dans le développement de métastases osseuses	97
1.3.3. Régulation des K_{Ca} par la voie AMPc.....	98
a) Régulation de l'activité des K _{Ca} par la voie AMPc	99
b) Régulation de l'expression des K _{Ca} par la voie AMPc	100
1.4. Objectifs du travail	101
II. Matériel et Méthodes.....	103
2.1. Lignées et culture cellulaire.....	104
2.1.1. Lignée MDA-MB-435s	104
2.1.2. Lignées HEK 293 T.....	105
2.1.3. Congélation et stockage cellulaire	106
2.2. Solutions et molécules utilisées.....	106
2.2.1. Solutions et milieux de culture cellulaire:.....	106
a) DMEM et α MEM	106
b) Sérum de veau fœtal : HyClone et SVF	107
c) Opti-MEM	108
d) Phosphate Buffered saline Solution (PBS) et Trypsine-EDTA.....	108
e) Solution physiologique saline (PSS)	109
f) Milieu intrapipette : MIP.....	109
g) Solution de Ringer.....	110
2.2.2. Molécules utilisées	111

2.3. Etude de l'expression des protéines et canaux ioniques : Technique du Western Blot	114
2.3.1. Lyse cellulaire.....	114
2.3.2. Dosage de protéines.....	115
2.3.3. Electrophorèse.....	117
2.3.4. Transfert.....	119
2.3.5. Révélation.....	120
2.4. Etude des niveaux d'expression des transcrits : PCR semi-quantitative et PCR quantitative.....	122
2.4.1. Extraction d'acides ribonucléiques (ARN) totaux.....	122
2.4.2. RT : Reverse-Transcription : Conversion ARN-ADN complémentaire.....	123
2.4.3. PCR semi-quantitative ou RT-PCR.....	123
2.4.4. PCR quantitative ou qPCR : Méthode « SyberGreen ».....	124
2.5. Mesure de la concentration d'AMPc intracellulaire : dosage ELISA et sonde de FRET	128
2.5.1. Mesure sur cellules vivantes : sonde FRET : Epac-2-camp.....	128
2.5.2. Dosage ELISA de l'AMPc intracellulaire.....	130
2.6. Biologie Moléculaire :.....	131
2.6.1. Vecteurs d'expression:.....	132
a) Préparation des plasmides.....	132
b) Transformation bactérienne.....	132
c) Amplification bactérienne.....	133
d) Purification des plasmides.....	133
2.6.2. Transfections transitoires:.....	135
a) « Small interfering RNA »: siRNA.....	135
b) Surexpression transitoire de protéines d'intérêt :.....	136
2.6.3. Transfection stable:.....	137
Expression stable du promoteur du gène KCNN3 dans la lignée MDA-MB-435s.....	138
2.6.4. Mutagenèse dirigée.....	139

2.7. Mesure de l'activité du promoteur de KCNN3 : gène rapporteur : luciférase (bioluminescence).....	141
2.7.1. Expression stable du promoteur de KCNN3	141
2.7.2. Expression transitoire du promoteur de KCNN3 dans les cellules MDA-MB-435s	143
2.8. Etude des courants potassiques par la technique du Patch clamp :	144
2.8.1. Principe du patch clamp.....	144
2.8.2. Installation de patch-clamp.....	145
2.8.3. Approche et configurations utilisées	147
2.8.4. Protocoles utilisés	150
a) Relations courant/voltage :	151
b) Rampes de voltage imposé :	151
2.9. Migration cellulaire	152
2.10. Viabilité cellulaire : Sels de tétrazolium ou MTT	154
2.11. Mesure des variations de Ca²⁺ libre intracellulaire	155
2.11.1. Sonde Fura-2AM.....	155
2.11.2. Spectrofluorimètre	156
2.11.3. Protocoles.....	156
a) Protocole d'étude de l'entrée constitutive :	156
b) Protocole d'étude de l'entrée capacitive :	157
c) Validation des protocoles :	157
2.12. Analyses statistiques	159
III. Résultats et Discussion.....	160
3.1. Partie I. Le Ca²⁺ extracellulaire régule l'expression de SK3 via la voie AMPc	161
3.1.1. Régulation de l'expression de SK3 par le Ca ²⁺ extracellulaire.....	161
a) Effets du Ca ²⁺ extracellulaire sur l'expression de la protéine SK3.....	161
b) Effet du Ca ²⁺ extracellulaire sur l'expression transcriptionnelle de KCNN3.....	162
c) Influence du Ca ²⁺ extracellulaire sur l'activité du promoteur KCNN3.....	163
3.1.2. Mise en évidence du rôle du CaSR dans la régulation de l'expression de SK3	164

a)	Modulation de l'expression protéique de SK3 par le CaSR.....	164
b)	Régulation transcriptionnelle de SK3 par le CaSR.....	168
c)	Etude de la régulation du promoteur de SK3 par le CaSR.....	168
3.1.3.	Régulation de l'expression de SK3 par la voie AMPc/PKA.....	169
a)	Effet d'une élévation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ sur la production d'AMPc.....	170
b)	Implication de la protéine $G_{\alpha i}$ dans la régulation de l'expression de SK3.....	173
c)	Influence de la $[AMPc]_{int}$ sur l'expression de SK3.....	174
d)	Rôles des effecteurs de l'AMPc sur l'expression de SK3.....	176
e)	Identification du facteur de transcription répresseur de la transcription de SK3.....	178
3.1.4.	Rôle de la voie $G_{\alpha q11}$.....	180
3.1.5.	Discussion.....	183
3.2.	<i>Partie II. Conséquences de l'activation de la voie Ca^{2+}/CaSR sur la migration cellulaire.....</i>	189
3.2.1.	Le Ca^{2+} extracellulaire régule la migration dépendante du canal SK3.....	189
3.2.2.	Implication du CaSR dans la régulation de la migration dépendante activée par l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$.....	190
3.2.3.	Modulation de la migration des cellules MDA-MB-435s par l'AMPc intracellulaire.....	192
3.2.4.	Discussion.....	192
3.3.	<i>Partie III. Régulation de l'activité du canal SK3 par l'AMPc et conséquences sur l'entrée de Ca^{2+} et la migration dépendantes de SK3.....</i>	194
3.3.1.	L'élévation de $[Ca^{2+}]_{ext}$ augmente l'amplitude du courant SK3.....	194
3.3.2.	Les agents éleveurs d'AMPc réduisent l'amplitude du courant SK3.....	195
3.3.3.	Effets de l'élévation d'AMPc sur les courants SK2 et SK1.....	198
3.3.4.	Les agents éleveurs d'AMPc réduisent la migration dépendante du canal SK3.....	202
3.3.5.	Les agents éleveurs d'AMPc réduisent l'entrée calcique dépendante de SK3.....	203
3.3.6.	Effets des agents élevant la $[AMPc]_{int}$ sur la localisation membranaire de Orai 1 et SK3.....	205

3.3.7. Discussion	207
3.4. Partie IV. Etude de l'implication d'autres facteurs du microenvironnement osseux dans la régulation de SK3.....	214
3.4.1. Rôle du SDF-1 sur la migration dépendante de SK3	214
3.4.2. Rôle du RANKL sur l'expression de SK3 et la migration dépendante de ce canal	215
IV. Conclusion et Perspectives	219
V. Références bibliographiques	224

Liste des tableaux

Tableau 1. Nomenclature IUPHAR et HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) des canaux K_{Ca} .

Tableau 2. Modulateurs pharmacologiques des SK_{Ca} .

Tableau 3. Composition de la solution physiologique saline utilisée pour les expériences de patch clamp et de mesure de la $[Ca^{2+}]_{ext}$. (pH : 7.4 tamponné au NaOH)

Tableau 4. Exemple de composition de milieu intrapipette utilisé pour les expériences de patch clamp (pH : 7.2 tamponné au KOH, pCa 6.4)

Tableau 5. Composition du milieu de Ringer utilisé pour les mesures de la $[AMPC]_{int}$ (pH : 7.4 ajusté à l'aide de NaOH ; Osmolarité : 300 mOsm)

Tableau 6. Elaboration de la gamme étalon de BSA et des échantillons pour le dosage de protéines totales à l'aide du Kit BCA Assay.

Tableau 7. Composition des différents tampons utilisés en western blot

Tableau 8. Composition des gels d'électrophorèse utilisés.

Tableau 9. Composition du mélange pour l'amplification des transcrits par RT-PCR

Tableau 10. Amorces utilisées pour amplifier les gènes d'intérêts par PCR

Tableau 11. Liste des plasmides utilisés.

Tableau 12. Tableau des séquences de siRNA utilisés ici.

Tableau 13. Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.

Liste des figures

- Figure 1.** Clichés représentant des métastases supposées sur un crâne et des os ayant appartenu à un Inca ayant vécu il y a 2000 ans, au Pérou.
- Figure 2.** Schéma récapitulatif de l'histoire de la découverte des mécanismes impliqués dans le processus métastatique depuis 1829.
- Figure 3.** Schéma représentant les deux modèles de progression temporelle des métastases.
- Figure 4.** Schéma représentant les étapes du processus métastatique.
- Figure 5.** Schéma représentant l'anatomie d'un os long.
- Figure 6.** Schéma représentant une coupe transversale d'un os.
- Figure 7.** Schéma représentant l'implication des différents facteurs du microenvironnement osseux lors de la colonisation métastatique par les cellules cancéreuses du sein
- Figure 8. A.** Schéma représentant la structure du CaSR et ses ligands principaux
- Figure 9.** Rôle différentiel du CaSR dans la production de PTHrP par les cellules épithéliales de sein normales et cancéreuses.
- Figure 10.** Implication du CaSR dans le cercle vicieux métastatique entre les cellules cancéreuses du sein, et le microenvironnement osseux.
- Figure 11.** Classification phylogénétique des canaux K^+ .
- Figure 12.** Structure d'un canal SK_{Ca} .
- Figure 13.** Schémas représentant la structure tridimensionnelle d'un canal SK_{Ca} .
- Figure 14.** Structure et mécanismes fonctionnels de la calmoduline.
- Figure 15.** Caractéristiques électrophysiologiques du courant $SK2$.
- Figure 16.** Courants représentatifs de chaque SK_{Ca} .
- Figure 17.** Implication de $SK3$ dans la migration cellulaire.
- Figure 18.** Le développement de métastases osseuses est dépendant du canal $SK3$.
- Figure 19.** Métastases ostéolytiques et implication du canal $SK3$ dans l'entrée calcique.
- Figure 20.** Coopération fonctionnelle d'Orai 1 et de $SK3$ dans la migration et l'entrée calcique dépendantes du canal $SK3$.
- Figure 21.** Modèle hypothétique de l'implication du complexe Orai 1/ $SK3$ dans la migration cellulaire et la colonisation du tissu osseux.
- Figure 22.** Structure générale des ACs transmembranaires.
- Figure 23.** Structure des différentes familles de PDEs.
- Figure 24.** Schéma représentant l'activation de la PKA par l'AMPc.
- Figure 25.** Schéma représentant la structure des isoformes d'Epac.
- Figure 26.** Schéma représentant la structure d'un canal HCN.
- Figure 27.** Schéma représentant la structure des FT appartenant à la famille CREB.
- Figure 28.** Représentation schématique des transcrits ICER en relation avec le gène codant pour CREM.
- Figure 29.** Résumé des différents FT impliqués dans la voie AMPc/PKA.
- Figure 30.** Résumé des différentes voies de signalisation majeures induites par l'AMPc.
- Figure 31.** Utilisation de la sonde pmAKAR3 pour montrer une localisation plus importante de l'activité de la PKA à la membrane, au niveau de l'avant de la cellule qui migre par rapport à l'activité mesurée à l'arrière de la cellule.
- Figure 32.** Aspect microscopique des cellules MDA-MB-435s.
- Figure 33.** Comparaison du niveau d'expression de la protéine $SK3$ dans les deux milieux de culture cellulaire utilisés
- Figure 34.** Structure chimique de la néomycine.
- Figure 35.** Structure chimique de la FSK.
- Figure 36.** Structure chimique de la cyclosporine A.
- Figure 37.** Structure chimique du NPS 2390
- Figure 38.** Structure chimique de l'ISO.
- Figure 39.** Structure du CI-1044
- Figure 40.** Structure chimique de l'apamine
- Figure 41.** Exemple de courbe étalon obtenue par dosage colorimétrique à l'aide du kit BCA.
- Figure 42.** Photographie des différents éléments utilisés pour l'électrophorèse
- Figure 43.** Schéma du montage de transfert des protéines sur membrane de PVDF.
- Figure 44.** Schéma explicatif de la révélation par chimiluminescence
- Figure 45.** Technique de PCR quantitative
- Figure 46.** Structure de la sonde Epac2camp et mécanisme de détection des variations d'AMPc intracellulaires.
- Figure 47.** Principe du dosage de l'AMPc intracellulaire à l'aide du kit NewEast Biosciences
- Figure 48.** Carte du plasmide pGL 4.17 utilisé pour transduire le promoteur KCNN3 couplé à la luciférase.
- Figure 49.** Principe de la mutagenèse dirigée utilisée ici pour muter le site CRE.
- Figure 50.** Structure du plasmide utilisé pour l'étude du promoteur KCNN3.
- Figure 51.** Réactions enzymatiques obtenues à l'aide du kit Dual-Glo®
- Figure 52.** Installation du poste de patch-clamp.
- Figure 53.** Configurations de patch clamp utilisées.

Figure 54. Exemple de protocole I/V utilisé en voltage imposé.

Figure 55. Exemple de protocole de rampe utilisé en voltage imposé.

Figure 56: Schéma du montage permettant d'évaluer la migration *in vitro*.

Figure 57 : Images représentatives des clichés obtenus suite à une comparaison de la migration cellulaire sur inserts, de cellules MDA-MB-435s avec deux $[Ca^{2+}]_{ext}$ différentes.

Figure 58. Structure du Fura-2-AM.

Figure 59. Protocoles de mesure de Ca^{2+} intracellulaire.

Figure 60. Etude cinétique des effets d'une élévation de Ca^{2+} extracellulaire sur l'expression de la protéine SK3 observée par western blot dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 61. Western blot représentatif des effets d'une diminution du Ca^{2+} extracellulaire sur l'expression de la protéine SK3 dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 62. Image représentative de l'effet du Ca^{2+} extracellulaire sur le niveau d'expression des transcrits *KCNN3* codant pour SK3 dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 63. Effets de l'élévation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ sur l'expression des transcrits SK3 après 24 h d'enrichissement du milieu dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 64. Effets du Ca^{2+} extracellulaire sur l'activité du promoteur *KCNN3*.

Figure 65. Effets de la néomycine sur l'expression de SK3.

Figure 66. Cliché représentatif des effets du NPS 2390 sur l'expression de la protéine SK3.

Figure 67. Validation du siCaSR dans nos deux modèles cellulaires.

Figure 68. Conséquences de l'extinction de la protéine CaSR sur l'expression de la protéine SK3.

Figure 69. Influence de l'inactivation du CaSR sur l'augmentation de l'expression protéique de SK3 induite par l'élévation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$.

Figure 70. Effets du siCaSR sur l'expression des transcrits *KCNN3* et *KCNN2*.

Figure 71. Effet du siCaSR sur l'activité du promoteur *KCNN3*.

Figure 72. Voie de signalisation impliquant la protéine $G_{\alpha i}$, activée par le CaSR.

Figure 73. Etude de la $[AMPC]_{int}$ par ELISA, en réponse à une stimulation de l'adénylate cyclase (FSK 10 μM ; 30 min) et une augmentation de Ca^{2+} extracellulaire (5 mM pendant 30 min) dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 74. Exemple représentatif de trace obtenue par FRET avec la sonde Epac-2-camp.

Figure 75. Effet mimant l'inactivation du CaSR en diminuant la $[AMPC]_{int}$ de 1,8 mM à 400 μM .

Figure 76. Effet de l'inhibition de la protéine $G_{\alpha i}$ par la PTX (12 h de traitement) sur l'activité du promoteur *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s-p*KCNN3*

Figure 77. Western blot représentatif de l'effet de la PTX après 15 h d'incubation sur l'expression protéique de SK3 dans les cellules MDA-MB-435s

Figure 78. Effet de la FSK sur l'expression protéique de SK3 dans les cellules MDA-MB-435s

Figure 79. Effet d'un traitement de 24 h par la FSK 10 μM sur les transcrits *KCNN3*

Figure 80. A. Relation Effet-dose de la FSK sur l'activité du promoteur *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 81. Voies potentiellement impliquées dans la régulation de la transcription de *KCNN3* par l'AMPC.

Figure 82. Effets du KT5720, un inhibiteur de la PKA, sur l'effet de la FSK sur l'expression de la protéine SK3 dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 83. Effet d'un prétraitement de 30 min avec le KT 5720 (3 μM) avec ou sans FSK (24 h) sur la transcription de *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s

Figure 84. Western blot représentatif des effets sur l'expression protéique de SK3 suite au traitement de 24 h par un activateur sélectif de l'Epac : l'ESCA, dans les cellules MDA-MB-435s

Figure 85. Effet d'une mutation sur le site CRE, empêchant la fixation des FT de la famille CREB, présent sur le promoteur *KCNN3*.

Figure 86. Régulation hypothétique de l'expression du canal SK3 par la voie dépendante de la protéine $G_{\alpha q11}$

Figure 87. Effets de l'inhibition de la CaN par son domaine auto-inhibiteur (AID 50 μM , à gauche), et par la cyclosporine (CsA, 8 μM) sur l'expression des transcrits *KCNN3* (à gauche) et de la protéine SK3 (à droite).

Figure 88. Effets de l'inhibition de la voie NFAT, par la CsA (8 μM , 24 h) en présence d'une $[Ca^{2+}]_{ext} = 5mM$ sur l'activité du promoteur *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 89. Western blot représentatif de l'effet de l'inhibition de la translocation nucléaire de NFAT par la CsA (8 μM ; 24 h), dans les cellules MDA-MB-435s, en présence de 5 mM de Ca^{2+} extracellulaire

Figure 90. Modèle hypothétique de la régulation de la transcription du canal SK3 par le Ca^{2+} extracellulaire.

Figure 91. Modulation de la transcription dépendante de CREB par le Ca^{2+} intracellulaire.

Figure 92. Effets du Ca^{2+} extracellulaire sur la migration des cellules MDA-MB-435s à 24 h, possédant ou non SK3.

Figure 93. Effets de la néomycine, un agoniste du CaSR sur la migration des cellules MDA-MB-435s.

Figure 94. Implication du CaSR dans la réponse à l'élévation de Ca^{2+} extracellulaire de la migration dépendante de SK3.

Figure 95. Effets d'une élévation prolongée de la $[AMPC]_{int}$ sur la migration des cellules MDA-MB-435s.

Figure 96. Trace représentative d'une mesure de l'amplitude du courant porté par le canal SK3 en présence de 2 et 5 mM de Ca^{2+} extracellulaire obtenue par un protocole de rampe de potentiel (-70 ; +70 mV) dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 97. Trace représentative du décours de la densité de courant SK3 mesurée au potentiel de membrane de 0 mV, et des effets d'une augmentation de la $[AMPC]_{int}$.

Figure 98. Moyenne des amplitudes relatives du courant SK3 mesuré à $V_m = 0$ mV en présence de CI-1044 et d'ISO, et d'apamine, dans les cellules MDA-MB-435s par rapport au contrôle sans molécule.

Figure 99. Courbe effet-dose de l'ISO sur le courant SK3 dans les cellules HEK293T-rSK3 en présence de CI-1044.

Figure 100. Courbe I/V représentative des effets de la FSK (10 μ M) et du CI-1044 (100 μ M) sur le courant SK3 dans les cellules HEK293T-rSK3, en fonction du temps.

Figure 101. Amplitudes moyennes relatives des courants SK3 mesurés à $V_m = 0$ mV, en réponse à la FSK et au CI-1044 par rapport au contrôle dans les cellules HEK293T-rSK3.

Figure 102. Traces représentative des effets d'une augmentation d'AMPC sur la densité de courant SK3 en fonction du voltage membranaire imposé.

Figure 103. Trace représentative des effets du CI-1044 et de l'ISO sur le courant hSK1 dans les cellules HEK 293.

Figure 104. Effets de l'élévation de l'AMPC sur le courant SK2 mesuré en fonction du voltage membranaire imposé.

Figure 105. Pourcentages d'inhibition des courants sensibles à l'apamine par le CI-1044 (100 μ M) associé à l'ISO.

Figure 106. Effets de la FSK et du CI-1044 sur la migration des cellules MDA-MB-435s.

Figure 107. Comparaison des effets du CI-1044 (100 μ M) et de la FSK (10 μ M) sur la migration des cellules SK3+ et des cellules SK3-.

Figure 108. Effets du CI-1044 et de la FSK sur l'entrée de Ca^{2+} constitutive mesurée dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 109. Comparaison des effets de la FSK et du CI-1044 sur le pourcentage d'inhibition de l'entrée constitutive de Ca^{2+} dans les cellules SK3+ et les cellules SK3-.

Figure 110. Western blot montrant l'expression membranaire des protéines SK3 suite au traitement de 24 h avec la FSK (10 μ M) et le CI-1044 (100 μ M) dans les cellules MDA-MB-435s.

Figure 111. Comparaison de la localisation membranaire des canaux Orai 1 et SK3 dans les cellules MDA-MB-435s en présence (à droite) ou non (à gauche) de FSK et de CI-1044, pendant 30 min.

Figure 112. Effet de la néomycine sur le courant SK3 mesuré dans les cellules MDA-MB-435s à l'aide d'un protocole de rampe balayant les voltages de -100 à +100 mV

Figure 113. Alignement des séquences protéiques de rSK2, rSK3 et hSK1

Figure 114. Effets du SDF-1 sur la migration des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-435s et MDA-MB-231.

Figure 115. Etude de l'expression du RANK en cytométrie en flux

Figure 116. Effets du RANKL sur l'activité du promoteur *KCNN3* transfecté de manière transitoire dans les cellules MDA-MB-435s

Figure 117. Western blot représentatif de la dégradation de la protéine I κ B α en réponse à une cinétique de traitements courts avec le RANKL (100 ng/mL) sur les cellules MDA-MB-435s.

Figure 118. Effets du RANKL sur la migration des cellules MDA-MB-435s.

Figure 119. Schéma résumant les résultats majeurs obtenus lors de ce travail de thèse.

Abréviations:

[AMPc]_{ext/int}: concentration en AMPc extracellulaire/intracellulaire

[Ca²⁺]_{ext/int}: concentration calcique extracellulaire/intracellulaire

5'AMP : 5' Adénosine Mono Phosphate

AC: Adénylate Cyclase

AHP: After-HyperPolarization

AID: AutoInhibitory-Domain of calcineurin

AKAP: A- Kinase Anchoring Protein

AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique

AMPK: AMPc dependant Kinase

ATF-1: cyclic AMP-dependent Transcription Factor

ATP: Adénosine TriPhosphate

BK_{Ca}: Big conductance Calcium-activated Potassium Channels

CAM: Cell Adhesion Molecule

CaM: CalModulin

CaMBD: Calmodulin-Binding Protein

CaN: CalciNeurine

CaSR: Calcium-Sensing Receptor

CI-1044: inhibiteur des PDE4s

CNG: Cyclic Nucleotid-Gated channels

CRE: cAMP-Responsive Element

CREB: CRE- Binding protein

CREM: CRE-Modulator

CsA: CycloSporine A

CSC: Cancer Stem Cells

CSH: Cellules Souches Hématopoïétiques

CXCR-4: Récepteur du SDF-1

DAG : DiAcylGlycérol

DTC: Disseminated Tumor Cells

EDHF: Endothelial Derived Hyperpolarizing Factor

EGF /R: Epidermal Growth Factor/Receptor

Epac: Exchange protein activated by cAMP

ER α / β : Récepteurs α / β aux œstrogènes

ESCA: Epac-Selective cAMP Analogs

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfert

FSK : Forskoline

FT: Facteur de transcription

GDP: Guanosine DiPhosphate

GMPc: Guanosine MonoPhosphate cyclique

GTP: Guanosine TriPhosphate

HCN: Hyperpolarisation-activated Cyclic Nucleotid gated channels

ICER: Inducible cAMP Early Repressor

IGF-1: Insulin-Like Growth Factor-1

IK_{Ca}: Intermediate conductance Calcium-activated Potassium Channels
IL: InterLeukines
IP₃/R : Inositol-triPhosphate/-Receptor
ISO: Isoprénaline
K_{Ca}: Calcium-activated Potassium Channels
KCNN1/2/3: gène codant pour SK1/2/3.
LTP: Long-Term Potentiation
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MEC: Matrice ExtraCellulaire
MMP: Matrix MetalloProteinase
NFAT: Nuclear Factor of Activated T cells
NFκB: Nuclear Factor Kappa B
NOS: Nitric Oxide Synthase
N- et C-term : Extrémités amino- et carboxy-terminales d'une protéine
OPG: Ostéoprotégérine
PDEs: Phosphodiesterases
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PKA : Protéine Kinase A (dépendante de l'AMPC)
PKC: Protéine Kinase C
PKG: Protéine Kinase G
PLCβ: PhosphoLipase C β
P_o: Probabilité d'Ouverture d'un canal ionique
PTH: ParaThyroid Hormone
PTHrP: PTH-related Peptide
PTX: Pertussis Toxin
RANK/L: Receptor Activator of NFκB/Ligand
RCPG: Récepteur Couplé aux Protéines G
SDF-1: Stromal Derived Factor
SK_{Ca}: Small conductance Calcium-activated Potassium Channels
Sp1/3: Specificity protein 1/3
TEM: Transition Epithéliale-Mésenchymateuse
TGFβ: Tumor Growth Factor β
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

I. Introduction

1.1. Généralités sur les métastases osseuses.

1.1.1. Historique et chiffres clés

a) Histoire des métastases

Contrairement aux tumeurs primaires, *in situ*, qui peuvent dans la plupart des cas être traités localement s'elles sont prises en charge à temps, il est difficile d'éliminer les foyers métastatiques ou tumeurs secondaires qui se développent en relation avec la tumeur primaire. Ces métastases étant responsables de 90 % des décès liés au développement d'un cancer (Hanahan *et al.*, 2000), il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes à l'origine du développement métastatique.

Certains auteurs se sont attachés à décrire l'histoire du cancer, et ont répertorié des cas datant de l'Antiquité. Ainsi, en 2011, le chercheur Hadju S., dans sa revue sur l'histoire du cancer (Hajdu, 2011), fait état de descriptions précises d'une tumeur du sein chez la femme ayant été inscrites sur le papyrus dit d'Edwin Smith, datant de 3000 avant J-C et découvert en 1862. Il est cependant impossible de savoir s'il s'agissait bien de lésions cancéreuses malignes ou simplement d'infections bénignes. Hippocrate décrira plus tard (460-375 avant JC) une tumeur du sein, en lui donnant le nom de cancer du fait de la forme de la tumeur qui lui rappelle celle d'un crabe (Hajdu, 2011). Entre 3000 avant JC et le XIV^{ème} siècle, les médecins et chercheurs ne s'attachent qu'à décrire la tumeur primaire, et à en chercher les causes qu'ils pensent endogènes (théorie des humeurs : bile noire, bile jaune, etc...).

Si l'on étudie l'histoire des métastases, on se rend vite compte que les recherches concernent principalement le tissu osseux. L'une des raisons est que ce tissu se conserve mieux que tout autre tissu à travers les âges. De nombreuses études rapportées par Léonard Weiss décrivent des tumeurs osseuses observées chez des dinosaures, suite aux fouilles archéologiques datant des années 20. C'est ainsi qu'est décrit un hémangiome supposé dans les vertèbres sacrées d'un Apatosaurus ayant vécu à l'ère Mésozoïque (-70 à -195 million d'années) découvert en 1923 par Moodie et coll. (Weiss, 2000). De même, des lésions osseuses du palais, du fémur et des vertèbres sacrées, supposées être liées au développement de métastases ostéolytiques ont été observées chez un crocodile datant du

Jurassique (-40 à -150 millions d'années) dont le foyer primaire semble être le pelvis (Weiss, 2000). On imagine qu'il était difficile à l'époque, compte tenu des limites d'exploration (seuls les rayons X étaient utilisés et moins performants qu'à l'heure actuelle) et étant donné l'âge avancé des échantillons, de mettre en évidence la nature exacte de ces lésions. En effet, celle-ci pourraient être liées à des infections ou des traumatismes ayant eu lieu *ante-* ou *post-mortem*.

Concernant les études de cas de métastases observées chez l'Homme, il existe de nombreuses recherches concernant les momies et restes humains découverts lors de fouilles archéologiques. Il est bien connu que dans l'Antiquité, l'espérance de vie étant plus faible, les cancers étaient considérés comme des maladies observées chez des individus âgés. Et dans la plupart des cas, ceux-ci décédaient du fait de la vieillesse, ou des conséquences du développement de la tumeur primaire, avant même l'apparition de foyers secondaires. Il faut ajouter à cela le fait que la conservation des tissus humains (même osseux) n'est pas totale et peut induire des biais dans l'étude des métastases osseuses ostéolytiques.

L'utilisation des rayons X depuis leur découverte en 1895 par le physicien allemand Wilhelm Röntgen, a permis de détecter les tumeurs du tissu osseux, qu'elles soient des foyers primaires ou secondaires. Par exemple, ils ont permis l'étude des momies découvertes en Egypte dans les années 1920. L'incidence des cancers osseux primaires est encore de nos jours très faible ce qui laisse penser que les lésions osseuses observées chez les momies ou dans les restes humains issus de fouilles archéologiques seraient des métastases (Weiss, 2000)(Figure 1).

Ce n'est qu'assez récemment, du fait du progrès repoussant les limites des techniques de détections des foyers secondaires et de l'allongement de l'espérance de vie, que les métastases sont décrites. Ainsi, le terme de « métastases » a été utilisé la première fois en 1829 par un chercheur Français Jean Claude Récamier (Talmadge *et al.*, 2010). Il ne pensait pas alors que ce soit un phénomène commun à tous les cancers, une fois les stades avancés de cancer atteints, mais plutôt que les métastases étaient dues à une communication neuronale (ou neurogène par opposition à hématogène : communication *via* le sang) entre l'organe atteint par le foyer primaire, et le ou les organes concernés par les métastases. Durant les années 1830, certains chercheurs parlent de la présence de cellules cancéreuses dans le sang avant même le développement de la tumeur primaire, et ces

cellules viendraient se loger au hasard dans un organe, où elles entraîneraient l'installation d'une tumeur primaire (Théorie de Carswell 1833-1838). L'hypothèse de Virchow (1860), proposait que les cellules tumorales présentes dans la circulation (qu'il nomme « tumeur embolique ») soient capables d'influencer la croissance des cellules du microenvironnement recevant ces métastases.



Figure 1. Clichés représentant des métastases supposées sur un crâne et des os ayant appartenu à un Inca ayant vécu il y a 2000 ans, au Pérou (Trouvé par Urtega & Pack 1996 et figure adaptée de Weiss L , 2001). Les tâches noires représentent des dépôts mélanosiques (tissu anormalement noir), qui constituent ce que l'équipe d'Urtaga définit comme du tissu métastatique.

Dans les années 1890, la théorie du « *seed and soil* » de Stephen Paget prévaut dans la compréhension des mécanismes à l'origine du développement métastatique. Il s'agit de penser que pour qu'un foyer secondaire, futur site métastatique, se développe, il faut que le microenvironnement de l'organe dans lequel il va se développer possède des facteurs favorisant le développement de ces métastases. Cette théorie est d'abord confrontée avec celle d'Ewig qui pense à une implication de contraintes mécaniques entre le site primaire et le site secondaire, thèse qui sera réfutée par Fidler et coll. en 1980. Cette équipe, démontre que les cellules cancéreuses se détachant du foyer primaire, passent à travers tout le réseau circulatoire, et s'arrêtent pour s'installer dans des organes où l'environnement est favorable (Talmadge *et al.*, 2010). Le concept de niche métastatique se développe alors, validant la théorie de S. Paget comme une base de la recherche sur les métastases, 120 ans après sa publication. Aussi, depuis 30 à 40 ans, les chercheurs s'attachent donc à l'étude des facteurs

spécifiques du tissu hôte, ainsi qu'à la détermination des caractéristiques génétiques et moléculaires des cellules initiatrices de métastases. Toutes ces études aujourd'hui à la recherche de thérapies ciblées, et adaptées aux profils génétiques des patients (Figure 2).

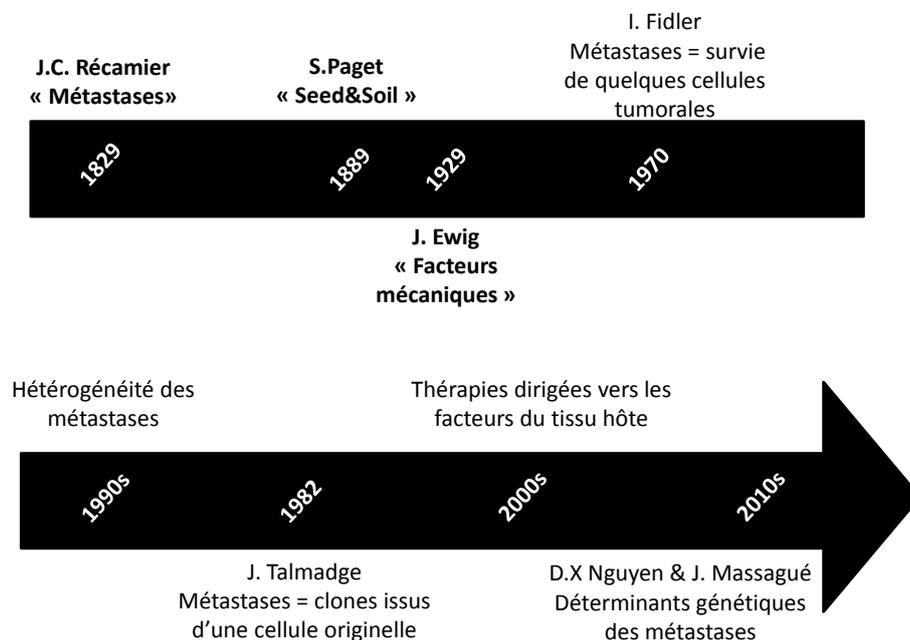


Figure 2. Schéma récapitulatif de l'histoire de la découverte des mécanismes impliqués dans le processus métastatique depuis 1829. De nombreux auteurs se sont intéressés à la compréhension des mécanismes à l'origine du développement de métastases. Les événements majeurs sont signalés en gras.

Des années 1980 à nos jours, les études se sont attachées à décrire les mécanismes par lesquels les métastases peuvent se développer, en étudiant soit :

- les « **graines** » (« **seed** » pour S. Paget), à savoir les cellules cancéreuses du foyer primaires qui s'extravaseront pour former des métastases,
- le « **sol** » (ou « **soil** » pour S. Paget), qui est représenté par le microenvironnement de l'organe cible de ces foyers secondaires, ou la niche métastatique.

Que ce soit le « sol » ou les « graines », les deux interagissent de façon à donner soit la tumeur primaire (*in situ*) soit la tumeur secondaire (à distance).

b) Chiffres clés

Parmi les tumeurs osseuses, les métastases représentent 70 % des tumeurs malignes (Pointillart V. *et al*, 2003). Les métastases osseuses sont une complication fréquente de nombreux cancers primaires. Elles sont une cause d'admission en services de soin et de diagnostic de plusieurs types de cancers, puisqu'elles engendrent souvent des fractures

associées à des douleurs au niveau des côtes, du rachis, des fémurs, des tibias, ou encore des humérus.

L'étude de Conroy T et coll. a montré que sur 429 patients admis pour des métastases osseuses au Centre Alexis-Vautrin de Vandœuvre-lès-Nancy, la localisation des lésions cancéreuses primaires était majoritairement le sein (32,6 % des patients). Les cancers du poumon (22,1 %) et de la prostate (7,7 %) sont également des tumeurs primaires associées au développement de métastases osseuses, d'après cette étude (Conroy *et al.*, 1988). Cette étude est sans doute biaisée par un nombre plus important de femmes que d'hommes ce qui explique le plus faible pourcentage de cancer de la prostate. Dans tous les cas, on note une certaine spécificité de la localisation de la tumeur primaire ayant la capacité de développer des métastases osseuses. Les cancers de la thyroïde et du rein sont aussi des cancers primaires qui métastasent fréquemment dans l'os. A eux seuls, les cancers du sein, des poumons, de la prostate et de la thyroïde représentent 80 % des cancers responsables de métastases osseuses (Weiss, 2000).

L'os représente ainsi le troisième site d'établissement de foyers cancéreux secondaires, après les poumons et le foie. Les os longs et le squelette axial sont principalement concernés par ces métastases, on observe ainsi rarement des métastases en dessous de genoux (5 %) ou de l'avant-bras aux os de la main (1 %) (Pointillart V. *et al.*, 2003). Une des explications probable concerne la différence de vascularisation interne des os. En effet, les os longs et vertèbres possèdent une moelle osseuse beaucoup plus vascularisée que les os se rapprochant des extrémités, favorisant ainsi la colonisation osseuse. Il existe trois types de métastases osseuses :

- ✓ **Ostéolytiques** : 75-80 % des cas. Par exemple, le cancer du sein entraîne des métastases osseuses de ce type (Kingsley *et al.*, 2007). Dans ce cas, les ostéoclastes sont activés par les cellules cancéreuses à tropisme osseux. Leur activité entraîne une dégradation progressive de la matrice osseuse.
- ✓ **Ostéocondensantes** : 15 % des cas. C'est le cas pour les métastases osseuses se développant suite à un cancer de la prostate, ou du cancer du col de l'utérus par

exemple (O'Keefe *et al.*, 2003). Les cellules cancéreuses impliquées sécrètent des facteurs qui stimulent l'activité des ostéoblastes, conduisant à la formation d'os.

- ✓ **Mixtes** : 5-10 % des cas. On observe alors un mélange entre métastases ostéocondensantes et ostéolytiques. C'est le cas du cancer du poumon à petites cellules. Certains cancers du sein et de la prostate peuvent présenter ce type de métastases osseuses également.

Le cancer qui nous intéresse dans cette étude, est le cancer du sein. Dans 80 % des cas de cancer du sein ayant atteint un stade avancé (stade IV), on observe des métastases ostéolytiques (Kingsley *et al.*, 2007). Selon l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS), dans un rapport publié en 2011, il y aurait eu 53 000 nouveaux cas de cancer du sein en France en 2011, ce qui représente 36 % des cancers féminins ; avec un âge moyen au diagnostic de 65 ans. Cette même année, le cancer du sein a causé le décès de 11 500 femmes. Ce cancer reste le cancer le plus fréquent chez la femme. En 2000, le rapport de l'European Network of Cancer Registries (ENCR) (Tyczynski, 2002), place la France comme le troisième pays européen concernant l'incidence du cancer du sein. Une étude française, ayant eu lieu dans la région Rhône-Alpes entre 2001 et 2006 a apporté quelques données sur les métastases liées au cancer du sein. Sur 371 patientes atteintes de cancer du sein métastatique, 17,6 % présentaient des métastases à l'inclusion (Paviot *et al.*, 2009). A la fin de l'étude, 69 % des patientes avaient des métastases osseuses survenues 36,8 mois après la détection de la tumeur primaire, en moyenne. Cette étude renforce l'idée selon laquelle les métastases osseuses sont des complications dans le cancer du sein apparaissant tardivement après la détection de la tumeur primaire. Les métastases, qu'elles soient osseuses ou non, représentent 90 % des causes de décès par cancer (Hanahan *et al.*, 2000). Elles constituent donc une cause de santé publique majeure, et il est intéressant d'essayer d'appréhender les mécanismes à l'origine du développement métastatique osseux, pour proposer des thérapies ciblées aux patientes.

1.1.2. Mécanismes connus conduisant à l'apparition des métastases osseuses dans le cancer du sein

a) Généralités sur les mécanismes à l'origine du développement de métastases

Les métastases résultent de plusieurs mécanismes impliquant à la fois les cellules cancéreuses de la tumeur primaire, le microenvironnement de cette tumeur ainsi que celui de l'organe qui sera la cible des métastases. De manière étonnante, les mécanismes à l'origine du développement de métastases sont encore peu connus à l'heure actuelle, bien que leur apparition soit dramatique pour les patientes. Ce manque de connaissances est associé au fait que les métastases soient composées de nombreux types cellulaires composant le microenvironnement tumoral. Cette notion d'hétérogénéité cellulaire et des mécanismes impliqués dans le développement de métastases est maintenant largement reconnue et contribue à rendre les métastases difficiles à éradiquer (Nguyen, 2011) (Chaffer *et al.*, 2011). Il y aurait plusieurs types cellulaires composant la tumeur primaire, dont des cellules souches cancéreuses, indifférenciées, et capables de subir la transition TEM (transition épithéliale-mésenchymateuse) pour donner des foyers secondaires à distance.

Depuis une trentaine d'années, quatre hypothèses principales concernant le développement métastatique se côtoient sans forcément s'exclure les unes les autres. L'état actuel des connaissances ne permet pas encore de valider complètement ces hypothèses, et il convient donc de toutes les prendre en compte.

- i) La théorie de S. Paget (« Seed & Soil ») propose que les cellules cancéreuses de la tumeur primaire s'arrêtent là où le « terrain » secondaire sécrète des facteurs favorables et présente des caractéristiques compatibles avec leur développement.
- ii) La théorie de J. Ewig, qui postule que des contraintes mécaniques, telles que le diamètre très étroit des capillaires dans lesquels les cellules cancéreuses arrivent, peuvent retenir ces cellules et favoriser leur adhésion au vaisseau du tissu cible.

- iii) D'autres études proposent que les cellules cancéreuses qui vont pouvoir établir des sites métastatiques distants, soient des cellules qui ont acquis des propriétés particulières dans la tumeur primaire, ce qui leur confère un avantage sélectif. On parle alors de « signature métastatique ». C'est la théorie de Fidler qui associe le développement métastatique à un processus qu'ils qualifient de darwinien (Fidler, 2003).
- iv) Enfin, des modèles ont été développés sur la base qu'il existerait des gènes de prédisposition à l'établissement des métastases, exprimés par les cellules de la tumeur primaire, qui permettraient de prédire quels seront les organes ciblés (Théorie défendue par Weinberg).

Ces quatre modèles décrits ici très exhaustivement permettent d'appréhender plus facilement les mécanismes à l'origine du développement métastatique. L'équipe de J. Massagué propose un modèle intégratif rassemblant ces quatre hypothèses quant à l'origine des métastases (Nguyen *et al.*, 2007).

Il existe également deux hypothèses (Figure 3) concernant le développement métastatique dans le temps, qui se ferait soit consécutivement au développement de la tumeur primaire soit de façon parallèle à ce dernier (Klein, 2009) (Coghlin *et al.*, 2010). On parle alors de modèle de progression linéaire ou de dissémination lente, décrit par Leslie Fould, et de modèle de progression parallèle ou de dissémination rapide décrit dans les années 50, respectivement (pour revue (Coghlin *et al.*, 2010)).

Le modèle linéaire, part du principe que les cellules constituant la tumeur primaire doivent accumuler des anomalies génétiques et épigénétiques aboutissant à une sélection clonale, de cellules capables d'aller coloniser un autre organe. Dans ce modèle, il est proposé que les métastases se développent tardivement, comme une conséquence du développement tumoral primaire.

Le modèle de progression parallèle ou rapide, quant à lui, pose l'hypothèse que les métastases soient disséminées bien avant la détection de la tumeur primaire elle-même (diamètre tumeur > 1cm). Cette progression parallèle suppose la présence de cellules cancéreuses disséminées dans le sang, décrites dans la littérature comme étant des précurseurs de métastases et appelées DTC (Disseminated Tumour Cells). Il existe quelques

arguments en faveur de ce modèle de progression parallèle, tels que le fait que les cellules disséminées retrouvées dans le sang de patients atteints de cancer de la prostate ou du sein présentent moins d'aberrations génétiques que les cellules issues d'une tumeur primaire de même type cancéreux (Klein *et al.*, 2002). Les auteurs sont également nombreux à décrire le phénomène de dormance associé à ce modèle de dissémination rapide ou parallèle. En effet, les cellules seraient rapidement disséminées en parallèle de la progression tumorale primaire, sous forme de DTC (voire de cellules souches cancéreuses (Klein *et al.*, 2002)), qui iraient s'installer dans des organes cibles ou ils resteraient en dormance pendant des mois voire des années (Coghlin *et al.*, 2010). Elles constituent ainsi comme des réserves de métastases en dormance jusqu'à ce que l'environnement soit favorable à leur développement. C'est le cas par exemple de certaines cellules cancéreuses du sein, qui peuvent rester ainsi en dormance pendant plusieurs années dans la moelle osseuse (Nguyen *et al.*, 2009). Une publication récente fait état de l'existence de cellules de tumeurs primaires de sein ayant changé de phénotype, pour acquérir une qualité de « cellules souches cancéreuses » capable de métastases à l'os, du fait de la signature osseuse ainsi acquise, par dédifférenciation (L *et al.*, 2013). Ces cellules seraient recrutées par les cellules cancéreuses de la tumeur primaire, et permettraient de diriger la dissémination de ces cellules métastatiques vers l'organe hôte : l'os (Coghlin *et al.*, 2010; Nguyen *et al.*, 2007).

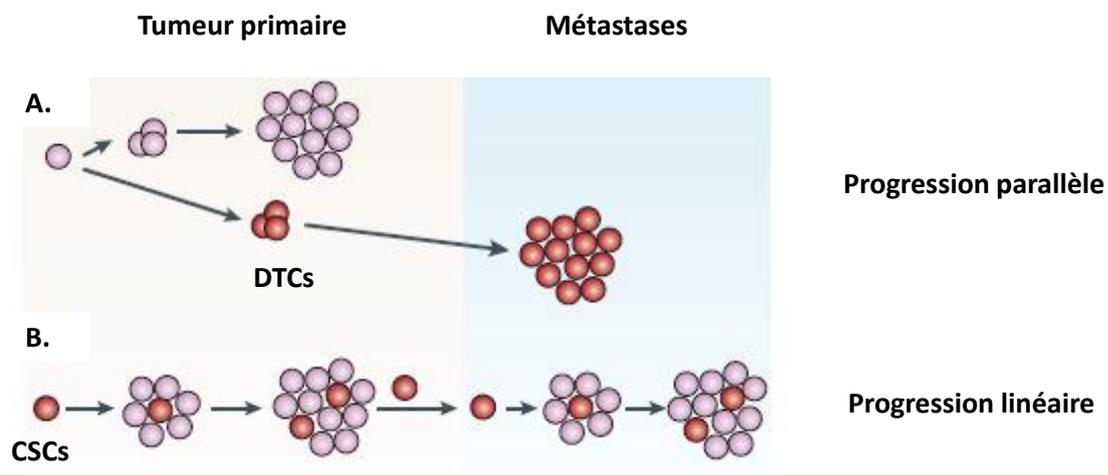


Figure 3. Schéma représentant les deux modèles de progression temporelle des métastases. A. Progression parallèle : la tumeur primaire (violet) se développe en parallèle des cellules cancéreuses disséminées (DTCs, en rouge), qui donneront des métastases. B. Modèle de progression linéaire : les cellules souches cancéreuses (CSCs) se développent pour donner dans un premier temps la tumeur primaire, puis ces cellules, une fois sorties de la tumeur primaire, ont la capacité d'entraîner le développement d'une tumeur secondaire (modifié d'après (Weigelt *et al.*, 2005).

Il existe donc de nombreuses zones d'ombre concernant les mécanismes à l'origine du processus métastatique. L'état actuel des connaissances permet malgré tout de proposer un modèle, bien que probablement incomplet et naïf des étapes du processus métastatique. Ces étapes dépendent de trois principes, à savoir : i) les métastases sont constituées de cellules cancéreuses primaires migrantes, et des cellules stromales avec lesquelles elles interagissent pour détourner leur fonction à leur profit (fibroblastes, cellules épithéliales, endothéliales et immunitaires), ii) les cellules de la tumeur primaire qui sont sélectionnées pour donner des métastases sont tels des « champions de décathlon », puisqu'elles doivent réussir à franchir de nombreuses étapes leur permettant d'établir un site cancéreux secondaire, et enfin iii) les métastases peuvent seulement se développer dans des organes ayant un microenvironnement spécifique, une vascularisation propice, et qui expriment des facteurs favorables au développement du foyer secondaire (Fidler, 2003; Nguyen *et al.*, 2009). De manière intéressante, certaines protéines peuvent être exprimées dans la tumeur primaire et n'y avoir aucune fonction, mais avoir un rôle dans la progression des métastases (Nguyen *et al.*, 2009).

Il est maintenant admis qu'il existe des phases critiques nécessaires au développement tumoral, et de la même manière des phases indispensables à la colonisation d'un autre organe par les cellules issues d'une tumeur primaire (Hanahan *et al.*, 2000; Hussein *et al.*, 2011), que nous allons décrire (et qui sont présentées dans la figure 4) :

- ✓ La croissance tumorale primaire entraîne l'installation d'une hypoxie progressive au sein de cette tumeur primaire. La diminution d'oxygène entraîne l'activation du facteur HIF1 α (Hypoxia-Induced Factor-1 α), qui favorise le développement de nouveaux vaisseaux ou angiogenèse.
- ✓ La colonisation locale du tissu environnant la tumeur primaire. Cette étape suppose l'implication de protéases qui vont dégrader la matrice extracellulaire (MEC), et permettre aux cellules cancéreuses de coloniser leur environnement proche.
- ✓ Une faible quantité de cellules va pouvoir sortir de cette tumeur primaire, et entrer dans les néo-vaisseaux ainsi formés. On parle alors d'embolie des cellules métastatiques qui se retrouvent dans les capillaires sanguins, ou de dissémination

hématogène. Les cellules se retrouvent ensuite dans le sang veineux. Elles peuvent aussi entrer dans les vaisseaux lymphatiques et se disséminer via ce réseau, on parle alors de dissémination lymphatique. C'est le cas par exemple des métastases observées dans les ganglions axillaires situés à proximité du sein.

- ✓ Il est nécessaire ensuite que les cellules cancéreuses présentes dans la circulation soient capables d'y survivre.
- ✓ Les cellules métastatiques doivent ensuite adhérer à la paroi d'un capillaire sanguin irriguant l'organe cible. De nombreuses molécules d'adhésion telles que les molécules d'adhésion cellulaire (CAM pour Cell Adhesion Molecules), ou les intégrines. Par exemple, dans les cellules cancéreuses du pancréas, on observe un « switch » dans l'expression de certaines CAM, puisque ces cellules perdent l'expression de la cadhérine E au profit de la cadhérine N. Ce switch a été montré comme impliqué dans la TEM, et permet l'adhésion différentielle nécessaire au détachement vis-à-vis de la tumeur primaire, et l'adhésion aux parois des capillaires de l'organe hôte (Christofori, 2006).
- ✓ Les cellules doivent ensuite sortir du capillaire vers le parenchyme de l'organe hôte des métastases. La variabilité du type de vascularisation irriguant les organes concernés par les métastases facilite plus ou moins cette étape. Par exemple, la moelle osseuse représente un site favori pour l'établissement de nombreuses métastases du fait de sa vascularisation fenêtrée.
- ✓ La dernière étape, est la plus critique du point de vue clinique, puisqu'elle consiste à coloniser le tissu hôte, en détournant le fonctionnement normal des cellules hôtes, au profit de leur propre prolifération et de la migration cellulaire. On observe une certaine réciprocité, car les cellules hôtes peuvent également participer au détournement des fonctions biologiques des cellules cancéreuses. Cette étape est donc largement influencée par l'interaction entre les cellules cancéreuses et les cellules stromales du tissu hôte. La tumeur primaire peut également préparer l'organe hôte en produisant des facteurs libérés dans la circulation, dans le but de faciliter la croissance des cellules cancéreuses une fois installées dans l'organe hôte.

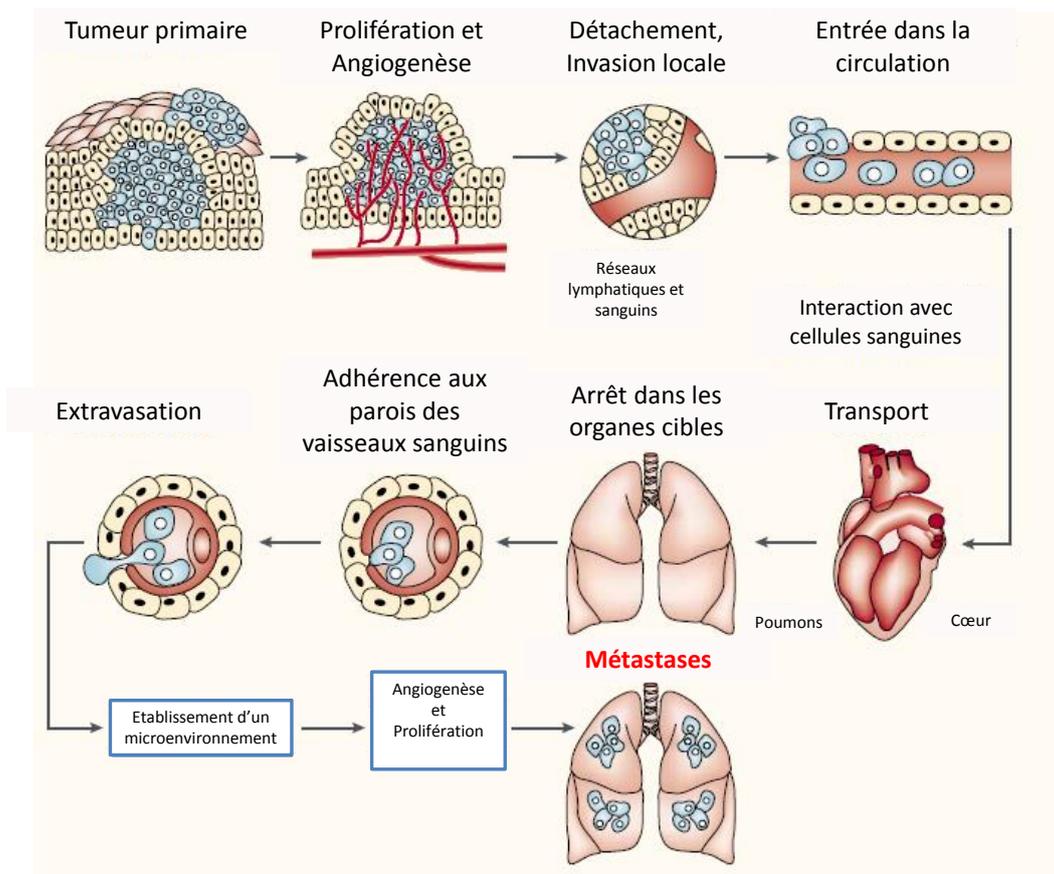


Figure 4. Schéma représentant les étapes du processus métastatique (Adapté d'après Chambers *et al.*, et Fidler, 2003). Dans un premier temps, les cellules de la tumeur primaire se développent et ceci entraîne une angiogenèse, qui va permettre l'entrée de cellules métastatiques dans les vaisseaux (sanguins ou lymphatique). Les cellules qui survivent au transport dans la circulation s'arrêtent là où le terrain est fertile, et où les contraintes physiques les stoppent. Les métastases doivent alors adhérer à la paroi d'un capillaire puis s'extravaser dans l'organe hôte. Elles détournent alors la physiologie des cellules normales constituant le microenvironnement de l'organe hôte, et l'interaction entre ces métastases et l'organe hôte entraîne une prolifération et une angiogenèse, conduisant à l'établissement de foyers secondaires proprement dits, ou métastases.

Au regard de ces nombreuses étapes qu'il faut réussir à franchir, il est évident que la probabilité qu'une cellule puisse établir un foyer secondaire est très faible (Weiss, 2000). En effet, un très faible nombre de cellules cancéreuses primaires réussissent à réunir tous les éléments et toutes les aptitudes requises pour établir un foyer tumoral secondaire. Ainsi, il a été calculé que seulement 0,1 % des cellules cancéreuses réussissent à échapper du foyer primaire, et sur cette faible proportion, seules 0,01 % des cellules survivent et arrivent effectivement à établir un foyer secondaire (Fidler, 1970). Néanmoins, toutes les cellules cancéreuses n'ont pas nécessité d'acquérir toutes les aptitudes nécessaires décrites plus haut. Par exemple, seules certaines cellules cancéreuses peuvent ainsi se spécialiser dans la

digestion matricielle (cellules « leader »), permettant ainsi de tracer le chemin pour les autres cellules cancéreuses métastatiques (Hanahan *et al.*, 2000).

Face à la problématique de l'hétérogénéité des cellules cancéreuses qui vont produire des métastases, il est nécessaire d'étudier les déterminants génétiques et épigénétiques à l'origine du processus métastatique bien qu'ils ne soient pas les seuls mécanismes impliqués. Ceci permettrait d'identifier des marqueurs de prédiction du site hôte à partir de l'étude des cellules composant la tumeur primaire, chez les patients. En effet, une étude a montré qu'en greffant des cellules métastatiques dans une tumeur primaire de sein, on observait une augmentation de la probabilité de développer des métastases dans le site secondaire de prélèvement (Minn *et al.*, 2007). Bien qu'assez peu renseigné, ce domaine de recherche se développe à l'heure actuelle, et certains auteurs ont ainsi déterminé trois classes de gènes impliqués dans les étapes métastatiques, qu'ils ont appelés « gènes métastatiques » (Kang *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2007). La première classe est constituée des gènes de l'initiation métastatique. Ces gènes sont impliqués dans l'invasion, l'angiogenèse et la survie dans la circulation sanguine ou lymphatique. La seconde classe concerne les gènes impliqués dans la progression métastatique, tels que les gènes impliqués dans la fonction d'extravasation, de survie et de réinitiation d'un foyer cancéreux à distance. Les gènes codant pour l'épiréguline (ligand de l'EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor) et certaines métalloprotéases (MMP1) font partie de cette classe. Enfin, la dernière classe de gènes métastatiques est constituée des gènes de la virulence métastatique, et sont les gènes impliqués dans la colonisation spécifique d'un tissu. Par exemple, les gènes codant pour les facteurs du microenvironnement osseux tels que les gènes codant pour l'interleukine 6 (IL-6), ou le peptide PTHrP (ParaThyroid Hormone-related Protein).

Il existe donc des étapes communes à l'établissement d'un foyer secondaire tumoral, et ce peu importe le type de tumeur primaire concerné. Le fait que les métastases s'installent dans différents organes requiert différents modes d'infiltration et de colonisation dans le tissu hôte, qui sont acquis par les cellules cancéreuses avant ou pendant la colonisation du tissu. Il est donc nécessaire de prendre en compte plusieurs facteurs dans l'étude d'un type de métastases : le type de cancer primaire, l'hétérogénéité des cellules

constituant les métastases, les mutations génétiques impliquées, les facteurs du microenvironnement du tissu hôte, les cellules stromales composant le tissu hôte, et leur capacité à produire des facteurs favorables au développement de ces métastases.

b) Une cible métastatique préférentielle du cancer du sein, l'os

Il existe deux types de complications osseuses qui sont associées au développement d'un cancer du sein : l'hypercalcémie et les métastases osseuses (Martin *et al.*, 2000). L'hypercalcémie est principalement liée à la production de la PTHrP (ParaThyroid Hormone related Protein) par les cellules cancéreuses. Ce peptide diminue l'excrétion rénale de Ca^{2+} , conduisant à une augmentation de la calcémie. Nous ne traiterons pas plus précisément de cette hypercalcémie, puisque le sujet de notre étude concerne les métastases osseuses associées au développement d'un cancer du sein.

Le tissu osseux : généralités

Le tissu osseux est un tissu qualifié de solide, du fait de ses caractéristiques tissulaires particulières. En effet, c'est le seul tissu humain qui soit à la fois solide, très résistant, et souple et léger. Il possède trois fonctions : métabolique (homéostasie), mécanique (maintien de la stature) et hématopoïétique. Ces fonctions sont assurées par différents types cellulaires.

Les tissus osseux préférentiellement ciblés par les métastases sont les os compacts ou longs. Ils sont constitués de deux parties (Figure 5) : la diaphyse, et les deux épiphyses. Au centre de ces os, on trouve une cavité médullaire, remplie de moelle osseuse (Widmaier E.P., *et al.*, 2003). C'est ce tissu, responsable de l'hématopoïèse, et possédant un endothélium fenestré qui permet l'accès facilité des cellules cancéreuses dans le tissu osseux.

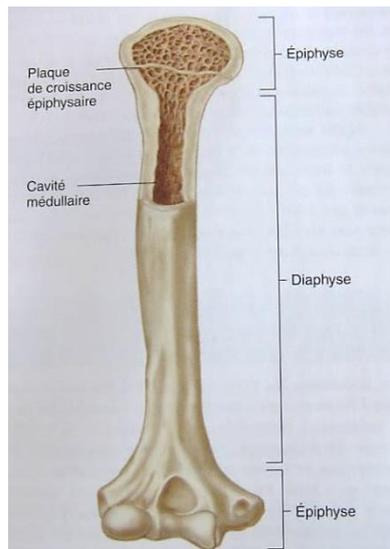


Figure 5. Schéma représentant l'anatomie d'un os long. Les os long sont constitués de deux parties principales : l'épiphyse (ou extrémité des os) et la diaphyse, qui constitue le corps de l'os. Les os sont creux et contiennent une cavité médullaire, remplie de moelle osseuse, un tissu très vascularisé qui est le siège de l'hématopoïèse, et un réservoir de cellules souches hématopoïétiques (d'après Widmaier E.P. *et al.*, 2003).

L'os : un tissu dynamique

L'os est un tissu conjonctif globalement constitué d'une matrice minérale calcifiée, composée principalement de collagène et de phosphate de Ca^{2+} . Il est observé que 99 % du Ca^{2+} présent dans l'organisme est contenu dans l'os. La matrice osseuse, aussi appelée *ostéoïde*, est en constant renouvellement, du fait de l'activité des cellules qui constituent le tissu osseux, qui sont : les *ostéoblastes*, les *ostéoclastes*, les *ostéocytes* (figure 6) et les *cellules bordantes*. Les deux premiers types cellulaires sont à l'origine du remodelage osseux permanent, qui en fait un tissu dynamique.

Les *ostéoblastes* sont des cellules ostéoformatrices situées à la périphérie de l'os, qui produisent des constituants de la MEC, en particulier du collagène, des protéoglycanes, ainsi que de l'ostéopontine. Ces protéines seront minéralisées ensuite par formation de cristaux de phosphate de Ca^{2+} qui constitueront l'ostéoïde. Ces cristaux sont regroupés sous le nom d'hydroxyapatite.

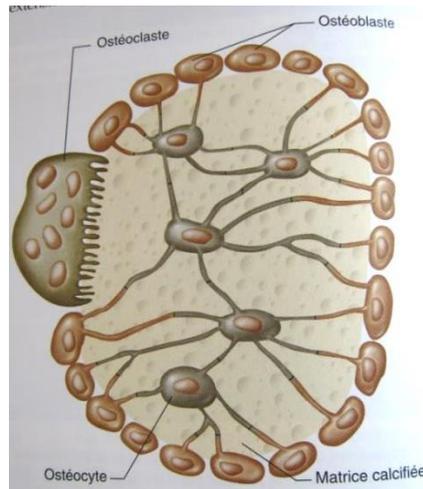


Figure 6. Schéma représentant une coupe transversale d'un os. Plusieurs types cellulaires le composent, on trouve les ostéoblastes qui entourent la matrice osseuse minéralisée, et sont chargés de sa production. Les ostéoclastes sont des cellules qui sont capables de digérer la matrice osseuse calcifiée, pour remodeler le tissu osseux. Enfin, les ostéocytes sont des cellules qui dérivent des ostéoblastes, et qui sont piégés dans la matrice osseuse. Ils communiquent avec d'autres cellules à l'aide de petits canaux creusés dans la matrice (d'après Widmaier E.P. *et al.*, 2003).

Lorsque l'ostéoïde finit par entourer les ostéoblastes, ils deviennent des *ostéocytes*, ces cellules à grandes protrusions cytoplasmiques permettent aux cellules constituant le tissu osseux proprement dit de communiquer entre elles, via des jonctions occlusives.

Les ostéoblastes peuvent être mis au repos, sous forme de *cellules bordantes*. Ces cellules restent à la périphérie de l'os, afin de pouvoir être recrutées à nouveau, capable de réactiver leur fonction ostéoblastique. Ces cellules ont une forme particulière puisqu'elles sont allongées et plus petites que les autres cellules constituant l'os (Figure 6).

Les *ostéoclastes*, quant à eux sont responsables de la dégradation de la matrice osseuse. Ce sont des cellules qui possèdent un volume beaucoup plus important que les deux autres types cellulaires, du fait de la fusion de plusieurs ostéoclastes immatures pour donner des ostéoclastes actifs. Ce sont donc des cellules plurinucléées, qui sont polarisées, c'est-à-dire qu'elles possèdent un pôle apical interagissant avec l'os à résorber (Figure 6). Le rôle de ces cellules est la résorption osseuse, permise par la sécrétion d'enzymes protéolytiques (comme la cathepsine K) digérant l'ostéoïde. Cette digestion libère des facteurs osseux dans le microenvironnement, tel que les ions calciques. L'activité des ostéoclastes est favorisée par un pH acide maintenu aux alentours de 6.9 via une libération de protons par ces mêmes cellules (Kingsley *et al.*, 2007).

Au cours de la vie, l'os est en perpétuel remodelage, du fait de l'activité parallèle des ostéoblastes et des ostéoclastes. Il existe une balance entre dégradation et synthèse osseuse permettant le renouvellement de ce tissu, en conditions physiologiques. Toute cette régulation est sous la dépendance de nombreuses hormones (ostéocondensation : insuline, insulin growth factor like-1 (IGF-1), les œstrogènes, la calcitonine. Ostéorésorption : la parathormone (PTH), le cortisol, et les hormones thyroïdiennes), mais également de contraintes physiques liées à la pesanteur ou les contractions musculaires. Ce remodelage permanent permet également de libérer du Ca^{2+} en cas d'hypocalcémie, et ce *via* la PTH.

Les os touchés par les métastases osseuses sont les os qui ont le taux de renouvellement le plus élevé, comme les côtes, la colonne, le pelvis et les os longs (Theman *et al.*, 2009). Dans le cadre des métastases osseuses s'installant suite au développement d'un cancer du sein, il a été démontré que la plupart des foyers métastatiques étaient ostéolytiques (Martin *et al.*, 2000). Cette ostéolyse est permise du fait de l'interaction entre cellules de la niche osseuse (ostéoblastes et ostéoclastes) et les cellules cancéreuses de sein ayant élu domicile dans l'os. Ainsi, les cellules cancéreuses sécrètent des facteurs favorisant l'activité des ostéoclastes, qui en résorbant l'os entraînent une libération de facteurs dans le microenvironnement osseux, qui peuvent alors favoriser l'activité des cellules cancéreuses.

Facteurs extracellulaires de la niche osseuse favorisant les métastases osseuses

Les nombreuses études concernant l'établissement de métastases osseuses mettent en lumière l'existence d'un **cercle vicieux** entre les cellules hôtes et les cellules cancéreuses élisant domicile dans l'os. Ce cercle vicieux est permis grâce à la sécrétion de nombreux facteurs, et par l'expression de protéines membranaires (récepteurs) spécifiques de ces facteurs par les deux partenaires impliqués. Nous allons présenter ici les principaux facteurs impliqués dans le développement de métastases osseuses chez les patientes atteints d'un cancer du sein (Figure 7).

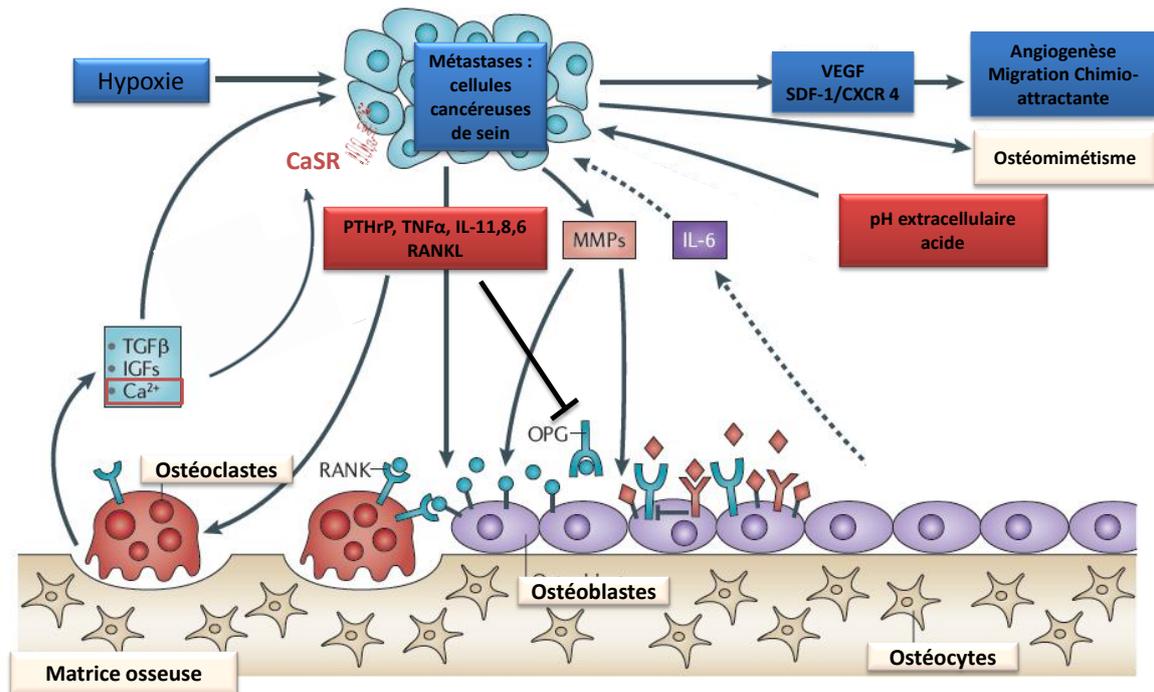


Figure 7. Schéma représentant l'implication des différents facteurs du microenvironnement osseux lors de la colonisation métastatique par les cellules cancéreuses du sein. Les cellules cancéreuses du sein arrivent dans le microenvironnement osseux, et sont aussitôt régulées par les facteurs libérés par les ostéoclastes et ostéoblastes (TGF β , IGFs, Ca²⁺, SDF-1) qui stimulent leur prolifération et l'angiogenèse tumorale. A leur tour, les cellules cancéreuses du sein vont sécréter des facteurs favorisant l'activité ostéoclastique soit en inhibant l'OPG, ou en activant la maturation des cellules progénitrices d'ostéoclastes via la libération de RANKL, TNF α , et d'interleukines (IL-11, IL-8 et IL-6). Il y a donc une mise en place précoce d'un cercle vicieux entre les cellules métastatiques et les cellules stromales osseuses, favorisé par la présence de facteurs physiques comme l'hypoxie ou l'acidité présents dans la niche osseuse (adapté d'après (Kingsley *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2009; Weilbaecher *et al.*, 2011)).

Le premier facteur est le facteur de croissance tumorale **TGF β** (Tumor Growth Factor β), qui est le principal acteur de cette dissémination osseuse. C'est le facteur de croissance le plus abondant dans l'os (Kingsley *et al.*, 2007). Son action est large, puisqu'il inhibe la croissance de la tumeur primaire (stades précoces) et la prolifération des cellules épithéliales normales, alors qu'il va promouvoir la colonisation du tissu hôte par les cellules métastatiques (Kang *et al.*, 2003). Il y a donc perte de l'inhibition de la croissance tumorale lors du développement du cancer, lors des stades avancés du cancer. Dans l'os, le TGF β agit de manière paracrine : il est sécrété par les ostéoblastes dans la matrice osseuse, puis activé lors de la résorption osseuse (Akhtari *et al.*, 2008). Il régule ainsi le remodelage osseux, tout en favorisant la TEM, mais également l'invasion, l'angiogenèse et en diminuant la veille immunitaire dans le tissu hôte. Il est aussi exprimé par les cellules cancéreuses qui vont ainsi renforcer le cercle vicieux en favorisant l'activité des ostéoclastes. On comprend donc

l'importance de ce facteur du microenvironnement osseux dans la colonisation de l'os par les cellules cancéreuses du sein.

Un autre facteur important et sécrété par les cellules cancéreuses, en réponse au TGF β , est la **PTHrP** ou protéine dérivée de la parathormone (PTH ; car elle partage de nombreuses homologues avec l'extrémité N terminale (N-term) cette PTH). Ce peptide a été découvert dans la parathyroïde bovine, d'où son nom. Il est impliqué dans la régulation de l'homéostasie calcique, au niveau de la glande mammaire, des intestins, du rein, et de l'os. Il a été montré que 92 % des métastases osseuses sécrétaient cette protéine (Akhtari *et al.*, 2008). Elle est également produite par les cellules MDA-MB-435s (cellules étudiées lors de ma thèse) suite à leur inoculation dans un modèle murin, après avoir développé des métastases osseuses (Kingsley *et al.*, 2007). La PTHrP permet l'induction de la production de RANKL (ou ligand du récepteur activateur de NF κ B (RANK)) par les ostéoblastes, un autre facteur impliqué dans le processus métastatique, que nous verrons plus loin. Cette protéine active la résorption osseuse en se fixant sur son récepteur PTHrP-R présent sur les ostéoclastes (Martin *et al.*, 2000).

Le **RANK-L**, est une cytokine libérée par les cellules stromales qui promeut l'activation des ostéoclastes, ou ostéoclastogenèse (Kang *et al.*, 2003). Il est également appelé facteur de différenciation ostéoclastique (ODF). Les cellules cancéreuses peuvent aussi le sécréter, c'est le cas de nombreuses cellules cancéreuses du sein telles que les MDA-MB-435s. Ce ligand permet la transcription des gènes qui sont sous la dépendance du facteur de transcription NF κ B. Ce ligand peut être capturé par un récepteur soluble leurre, l'ostéoprotégérine (OPG), responsable de la fin du signal de différenciation ostéoclastique dans l'os normal. Il y a donc une compétition entre RANK et OPG au sein de la niche osseuse métastatique, et ces deux récepteurs sont à prendre en compte dans la compréhension des mécanismes à l'origine de l'ostéolyse (Das *et al.*, 2012).

Un autre facteur exprimé au sein de la niche osseuse est le **SDF-1** (Stromal Derived Factor 1, ou CXCL12). C'est une cytokine impliquée le « homing » des cellules souches hématopoïétiques (CSH) vers l'os. En effet, les cellules stromales osseuses (ostéoblastes) libèrent cette cytokine, qui agit physiologiquement comme chimio-attractant sur les CSH. De nombreuses études font part de l'implication de ce facteur dans le tropisme osseux des cellules cancéreuses métastatiques du sein (Akhtari *et al.*, 2008). Enfin, l'équipe de

Chambers et coll. reporte le fait que le SDF-1 est retrouvé dans tous les organes où les cellules cancéreuses de sein métastasent fréquemment (Chambers *et al.*, 2002) ce qui fait de ce facteur un facteur non spécifique du site de métastases. La spécificité viendrait de l'expression de son récepteur CXCR4. Les cellules cancéreuses sont également nombreuses à exprimer ce récepteur, c'est le cas par exemple des cellules MDA-MB-435s (Weilbaecher *et al.*, 2011).

Il existe également deux autres facteurs importants pour l'activation de la maturation des ostéoclastes : le **TNF α** (Tumor Necrosis Factor α) et le **CSF-1** (Colony Stimulating Factor) qui sont produits par les cellules cancéreuses du sein. Le premier est un facteur de nécrose tumorale sécrété par les cellules immunitaires physiologiquement, et dont le rôle est détourné ici puisqu'il active la voie PTHrP/RANK. Le CSF-1 est quant à lui un facteur permettant la différenciation des cellules progénitrices d'ostéoclastes en ostéoclastes mûres. Ces deux facteurs peuvent être synthétisés par les cellules cancéreuses du sein qui métastasent à l'os, et engendrent ainsi une activité ostéoclastique plus importante, conduisant à une ostéolyse marquée (Joyce *et al.*, 2009).

Dans le cadre du développement d'un cancer du sein, il faut également citer les facteurs de croissance **VEGF** (Vascular Endothelial Growth Factor) et **PGDF** (Platelet Derived Growth Factor) qui sont des protéines impliquées dans la signalisation conduisant à la colonisation osseuse, en activant notamment l'angiogenèse et la croissance tumorale des cellules métastatiques s'étant installées dans l'os (Das *et al.*, 2012).

Afin que le tissu osseux soit colonisé par les métastases issues d'une tumeur du sein, il est nécessaire que ces cellules adhèrent à la matrice. Les intégrines sont des protéines d'adhésion dont le rôle dans l'établissement de métastases est largement décrit (Christofori, 2006; Martin *et al.*, 2000). En particulier, l'**intégrine $\alpha_v\beta_3$** est décrite comme étant exprimée par les cellules cancéreuses de sein, et son niveau d'expression est positivement corrélée à la présence de métastases osseuses ostéolytiques (Weilbaecher *et al.*, 2011). Cette glycoprotéine est associée en dimères, et de manière intéressante elle est exprimée par les cellules MDA-MB-435s. Elle constitue un récepteur pour de nombreuses protéines constituant la matrice osseuse : l'ostéopontine, le TGF β , la vitronectine, la fibronectine etc..., ce qui permet l'adhésion des cellules cancéreuses du sein à la matrice osseuse, lors de la phase précoce de la dissémination métastatique (Cleazardin, 2009).

La plupart des facteurs décrits précédemment agissent en parallèle et alimentent le cercle vicieux établi entre les métastases et le tissu osseux. Par exemple, la PTHrP inhibe l'OPG et active la production de RANKL par les ostéoblastes, ce qui favorise l'ostéoclastogénèse (Mundy, 2002). D'autres facteurs sont également impliqués, tels que certaines interleukines (IL-11 ; IL-6) activant l'ostéoclastogénèse, mais également certains facteurs de croissance (*i.e.* : IGF-1) qui sont peu décrits mais néanmoins piégés au sein de la matrice osseuse, et permettent le développement de la tumeur secondaire dans ce tissu osseux.

L'ostéolyse osseuse induite par les métastases issue d'une tumeur primaire de sein, libère un dernier facteur, qui nous intéresse particulièrement dans cette étude : **le Ca^{2+}** . En effet, la matrice osseuse étant constituée principalement de cristaux de phosphate de Ca^{2+} , sa dégradation massive par les ostéoclastes activés par les cellules cancéreuses, libère du Ca^{2+} extracellulaire. La concentration de Ca^{2+} extracellulaire ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$) peut ainsi augmenter localement entre 8 et 40 mM (Kingsley et al., 2007). Ce Ca^{2+} peut ensuite aller activer le récepteur au Ca^{2+} (CaSR), un récepteur couplé aux protéines G, présentant un intérêt particulier dans notre étude. Il peut ensuite activer des voies de signalisation entraînant l'expression ou la répression de certaines protéines favorisant la colonisation osseuse, telles que la PTHrP, alimentant ainsi le cercle vicieux décrit précédemment et présenté dans la figure 7.

1.1.3. Implication du CaSR dans le développement tumoral et métastatique

a) Généralités sur le CaSR

Le CaSR appartient à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G ou RCPG. Plus précisément, il est inclus dans le groupe II de la sous-famille C ou de classe III des RCPG, car il présente de nombreuses homologies de séquence avec les récepteurs glutaminergiques métabotropiques mGluRs (Brown *et al.*, 2001).

Dans les années 1980, de plus en plus d'études se sont intéressées à l'existence possible d'un récepteur capable de détecter des variations de Ca^{2+} extracellulaire, et d'engendrer une dépolarisation indépendante des canaux calciques. En 1993, Edward M. Brown clone pour la première fois ce CaSR, à partir de la glande parathyroïde bovine (Brown

et al., 1993). Il établit alors que le Ca^{2+} peut agir comme un second messager extracellulaire. C'est en 1995 que le CaSR humain est cloné. Cette protéine de 1078 acides aminés est exprimée dans de nombreux tissus, et pas seulement ceux impliqués dans l'homéostasie calcique (comme l'os), mais aussi dans le foie, le sein, et le cerveau. Sa structure est assez conservée suivant les espèces où elle est étudiée puisqu'on observe 93 % d'homologie entre le CaSR retrouvé dans la parathyroïde bovine et le CaSR humain (Magno *et al.*, 2011).

Ce récepteur possède la structure caractéristique des RCPG, avec 7 segments transmembranaires constitués de 249 acides aminés (Figure 8). Il possède un long domaine extracellulaire N-term de 612 acides aminés, très caractéristique de cette famille, et contient 4 boucles (I à IV), organisées en un motif « Venus flytrap ». Ce motif présente deux lobes ayant l'aspect d'une plante carnivore, et possède en son centre des séquences riches en glutamate qui constituent le domaine de fixation du Ca^{2+} . Cette extrémité N-term est très riche en glycosylations, dont huit qui sont très conservées au cours de l'évolution, à travers les espèces, ce qui permet l'adressage de ce récepteur à la membrane plasmique (Ray *et al.*, 1998). Enfin, la protéine CaSR possède un court domaine C-terminal (C-term) intracellulaire de 216 acides aminés, permettant l'interaction avec les effecteurs de ce récepteur : les protéines G mais également son adressage membranaire (Brown *et al.*, 2001; Magno *et al.*, 2011). Le CaSR, doit s'associer en dimères au niveau de la membrane plasmique afin d'être fonctionnel. Dans la plupart des cas, on décrit une homodimérisation, mais il se peut que le CaSR se dimérise avec un RCPG dont la structure est proche, telle que le mGluR (Magno *et al.*, 2011). L'équipe de Bai et coll. a montré que ce CaSR était associé en homodimères lorsqu'il était exprimé dans les cellules HEK293 (Bai *et al.*, 1998). Cette dimérisation est rendue possible par la présence de cystéines sur l'extrémité N-term du CaSR (Brennan *et al.*, 2009); ces cystéines se retrouvent alors associées en ponts disulfures, qui sont stabilisés lors de la reconnaissance des ligands par le CaSR. La structure de ce CaSR est représentée dans la figure 8.

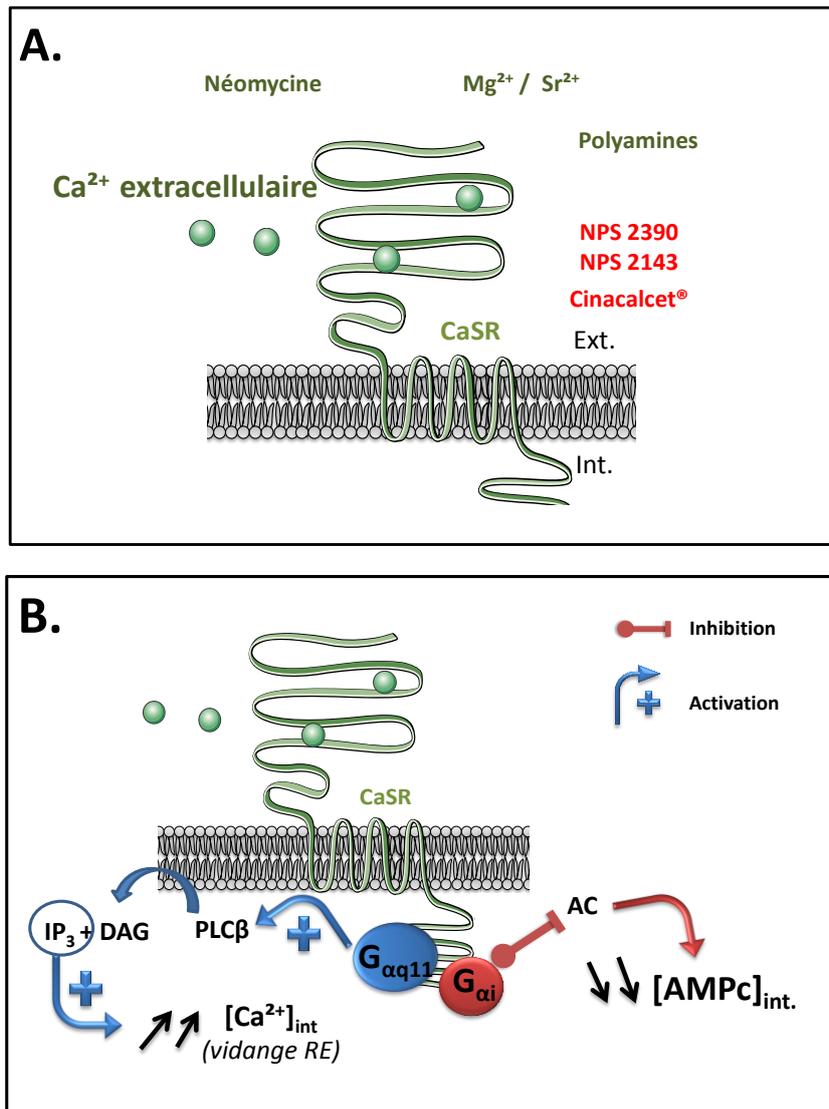


Figure 8. Schéma représentant la structure du CaSR et ses ligands principaux (A) (agonistes en vert, antagonistes en rouge). B. Voies de signalisation principalement activées par le CaSR (Modifié d'après (Saidak *et al.*, 2009b)). (AC : adénylate cyclase, AMPc : adénosine monophosphate, IP_3 : Inositol triphosphate, PLC β : phospholipase C β , DAG ; Diacyl glycérol).

Comme son nom l'indique, le ligand naturel et endogène présentant la plus forte affinité pour le CaSR est le Ca^{2+} . Il existe cependant d'autres ligands qui sont soit des agonistes ou des antagonistes pouvant être allostériques ou orthostériques (Figure 8A). Le magnésium (Mg^{2+}) se fixe sur le même site que le Ca^{2+} mais avec une affinité moindre, on parle d'agoniste orthostérique. De la même manière, des antibiotiques tels que la néomycine, ou des polyamines telles que la spermine, sont des agonistes orthostériques de ce CaSR (Saidak *et al.*, 2009b). Il existe également des modulateurs allostériques de ce CaSR, qui ne se fixent pas sur le domaine de liaison au Ca^{2+} , mais sur les boucles extracellulaires présentes entre les domaines transmembranaires, ou sur la partie N-term du CaSR. C'est le

cas de nombreuses molécules utilisées en clinique telle que le Cinacalcet®, qui appartient à la famille des calcimimétiques (Magno *et al.*, 2011). Ces modulateurs allostériques potentialisent l'effet des ligands naturels du CaSR, et ne se suffisent pas à eux-mêmes pour induire une réponse cellulaire, en absence de Ca²⁺ extracellulaire, par exemple. Ces agonistes ou antagonistes peuvent entraîner des réponses cellulaires différentes. En effet, les acides aminés-L qui sont également des agonistes du CaSR peuvent induire une entrée de Ca²⁺ par activation du canal TRPC1 et non pas *via* celle de la voie classiquement induite par le CaSR, impliquant la phospholipase Cβ (Saidak *et al.*, 2009b).

Les effecteurs du CaSR sont les protéines G, principalement G_{αi} et G_{αq11} (Figure 8B) (Saidak *et al.*, 2009c). Dans cette étude nous nous sommes intéressés principalement à ces deux protéines G mais il faut noter que le CaSR est capable d'activer également la G_{αq12} exprimée dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 et MCF-7 et d'induire des voies de signalisation impliquant la protéine d'échange RhoA (Huang *et al.*, 2009). Cependant, nous nous sommes intéressés particulièrement ici aux deux voies dépendantes de la G_{αi} et G_{αq11}.

La première voie entraîne une diminution de la production d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique), du fait de l'inhibition directe de l'adénylate cyclase (AC, (Brennan *et al.*, 2009)). La seconde voie induit une activation de la PLCβ qui va hydrolyser le PIP₂ (Phosphatidyl Inositol -4,5-diPhosphate) en IP₃ (Inositol -1,4,5- triPhosphate) et DAG (DiAcylGlycérol). L'IP₃ se fixe alors sur son récepteur IP₃R présent sur la membrane du réticulum endoplasmique (RE), ce qui entraîne une vidange des stocks calciques contenus dans le RE dans le cytoplasme (Ward *et al.*, 2002). Ces deux voies principalement étudiées ici sont présentées dans la figure 8B. Les voies de signalisation induites par le CaSR sont nombreuses et complexes, puisqu'il est également capable d'entraîner l'activation des MAPK (Mitogenic Activated Protein Kinases) ou la voie PI3K/Akt, des voies qui ne seront pas étudiées ici.

Le CaSR est exprimé dans de nombreux tissus, et son action y semble spécifique du tissu étudié. Son expression quasi-ubiquitaire laisse penser qu'il est impliqué dans de nombreuses voies de régulation physiologiques cellulaires.

b) Rôles physiologiques du CaSR

Il est évident que ce récepteur a un rôle physiologique majeur dans le maintien de l'homéostasie calcique. On le retrouve ainsi exprimé dans les organes impliqués dans cette homéostasie, tels que le rein, l'intestin ou encore l'os. Les voies de signalisation engendrées ne sont pas les mêmes en fonction du tissu où il est exprimé. Au sein de l'organe dans lequel il a été découvert, la glande parathyroïdienne, il permet le maintien d'une la $[Ca^{2+}]_{ext}$ physiologique entre 1,1 et 1,3 mM, en diminuant la production de PTH en réponse à une élévation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ et inversement (Brennan *et al.*, 2013; Kantham *et al.*, 2009).

Les rôles physiologiques de ce CaSR sont nombreux, puisqu'il est impliqué dans la sécrétion d'hormones, l'inflammation (Brennan *et al.*, 2013), la prolifération (Kwak *et al.*, 2005), l'apoptose (Lin *et al.*, 1998) ou encore la régulation de l'activité de certains canaux ioniques tels que les canaux $K_{IR4.1}$ et $K_{IR4.2}$ (Huang *et al.*, 2007; Magno *et al.*, 2011). Il participe également à la différenciation des kératinocytes induite par l'élévation de Ca^{2+} extracellulaire (Tu *et al.*, 2008), et dans la réparation des dommages cellulaires du tissu épithélial bronchique (Milara *et al.*, 2010). Il serait fastidieux de citer exhaustivement toutes les implications physiologiques très nombreuses du CaSR, nous allons nous concentrer sur son rôle dans la régulation de la physiologie osseuse et de la celle de la glande mammaire.

Les études concernant l'implication du CaSR dans la régulation de la physiologie osseuse sont assez nombreuses. En effet, et bien qu'il y ait encore peu d'évidences concernant l'expression *in vivo* du CaSR dans l'os, il semblerait qu'il soit impliqué dans la détection du Ca^{2+} extracellulaire, ainsi que dans le remodelage osseux (Theman *et al.*, 2009). Il permettrait en cas d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ d'inhiber l'activité des ostéoclastes, et d'activer la migration des ostéoblastes. En effet, les implications du CaSR dans la régulation de l'os sont nombreuses, puisqu'il est montré comme étant impliqué dans le chimiotactisme et la différenciation des cellules progénitrices de la moelle osseuse (Aguirre *et al.*, 2010). Chez la souris, il permet également la localisation et l'accumulation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) au sein de l'endosteum bordant la moelle osseuse, du fait de la forte $[Ca^{2+}]_{ext}$. L'utilisation d'un agoniste allostérique, le Cinacalcet®, augmente cette accumulation de CSH dans la niche osseuse (Adams *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2011). Le CaSR est impliqué dans la prolifération des ostéoblastes induite par le strontium (Sr^{2+}). En effet, le Sr^{2+} est un ion qui ressemble au Ca^{2+} , en terme de propriétés ioniques et atomiques, il est

un agoniste exogène du CaSR utilisé en clinique pour lutter contre l'ostéoporose (Chattopadhyay *et al.*, 2007). Enfin, il joue un rôle important dans la migration des cellules progénitrices d'ostéoclastes de la lignée RAW 264.7 *in vitro*. En effet, le Ca^{2+} extracellulaire voit sa concentration augmenter en approchant de la niche osseuse, ce qui constitue un chimiotactisme médié par le CaSR, et impliquant la voie PI3K/Akt (Boudot *et al.*, 2010). Ainsi, le CaSR a un rôle majeur dans le remodelage osseux décrit précédemment.

Concernant la régulation de la physiologie de la glande mammaire par le CaSR, peu d'études ont été menées. L'équipe de VanHouten et coll. a montré cependant qu'il était exprimé pendant la phase entre l'accouchement, et le début de la lactation, par les cellules épithéliales du sein. De manière intéressante, il est impliqué dans la production de la PTHrP par ces cellules, puisqu'il diminue la sécrétion de ce peptide lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ augmente, et inversement. Ceci permettrait d'ajuster la production de lait à la calcémie des femmes allaitant leurs enfants (VanHouten *et al.*, 2004). En effet, la diminution de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ entraîne une diminution de l'activité du CaSR, avec pour conséquence une augmentation de la production PTHrP. Cette dernière, qui favorise alors l'activation des ostéoclastes, entraîne la libération de Ca^{2+} par digestion de la matrice osseuse, et ce Ca^{2+} fait alors office de rétrocontrôle négatif afin de réajuster la calcémie en diminuant la production de PTHrP par les cellules épithéliales de sein.

Le CaSR régule donc une multitude de mécanismes physiologiques, mais il est également responsable de certaines situations pathologiques, telles que l'hypercalcémie ostéolytique, certains diabètes, des maladies cardiovasculaires ou cérébrales (Ward *et al.*, 2012). Dans notre champ d'étude, il est impliqué dans le développement du cancer du côlon et une consommation alimentaire importante de Ca^{2+} prévient de l'apparition d'un cancer colorectal (Ward *et al.*, 2012). Par ailleurs, il a été décrit une diminution d'expression du CaSR lors du développement du cancer du côlon (Rogers *et al.*, 2012). Ces deux études mettent en lumière une contradiction, et le lien entre augmentation de la consommation alimentaire de Ca^{2+} et la diminution d'expression du CaSR reste à démontrer. De manière intéressante, beaucoup d'études associent l'expression du CaSR au développement d'une tumeur primaire de sein ainsi qu'à l'apparition des métastases osseuses.

c) Implication du CaSR dans le cancer du sein et les métastases osseuses.

Le CaSR est impliqué dans de nombreuses maladies, telles que l'hyperthyroïdisme ou l'ostéoporose. Il existe une centaine de mutations répertoriées dans le gène codant pour le CaSR, retrouvées exprimées chez les patients, conduisant à une perte ou à un gain de fonction, impliqués dans ces maladies (D'Souza-Li, 2006). Dans le cadre du cancer, l'équipe de Cheng et coll. a montré que le CaSR est exprimé sous forme d'homodimères par les cellules épithéliales normales et cancéreuses de sein. L'équipe de Saidak et coll. rapporte également le fait que des cellules cancéreuses expriment le CaSR, en particulier les cellules cancéreuses de sein métastasants dans l'os (Saidak *et al.*, 2009c).

En plus d'être exprimé de manière plus importante par les cellules cancéreuses du sein par rapport aux cellules normales, où il inhibe la production de PTHrP via l'activation de la $G_{\alpha i}$, son expression dans les cellules cancéreuses de ce même tissu entraîne l'activation d'une autre protéine $G_{\alpha s}$, qui elle active l'AC et donc la production de PTHrP (Mamillapalli *et al.*, 2008; Sanders *et al.*, 2000). Il s'agit d'une régulation opposée à celle observée dans les cellules normales où le CaSR diminue la production de PTHrP (Saidak *et al.*, 2009b). Cette régulation opposée permet d'alimenter le cercle vicieux à l'origine de l'établissement de métastases osseuses liées au développement d'un cancer du sein (Figure 9). Des études similaires ont montré le même type de régulation dans les cellules cancéreuses de prostate, or ces cellules métastasent préférentiellement à l'os, ce qui laisse penser que le CaSR pourrait être un médiateur général de la dissémination osseuse (Magno *et al.*, 2011). En effet, il pourrait conférer un avantage aux cellules cancéreuses l'exprimant en favorisant leur colonisation du tissu osseux, de la même manière qu'il permet physiologiquement le « homing » des CSH (Adams *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2011).

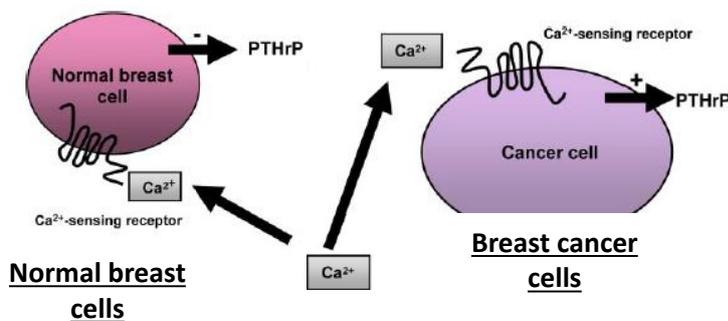


Figure 9. Rôle différentiel du CaSR dans la production de PTHrP par les cellules épithéliales de sein normales et cancéreuses. Les cellules épithéliales normales de sein expriment le CaSR, qui induit une diminution de la PTHrP. A l'inverse, les cellules cancéreuses du sein, en réponse à une élévation de Ca^{2+} extracellulaire favorisent la production et la libération de la PTHrP (Modifié d'après (Saidak *et al.*, 2009c)).

Il faut noter que les effets du CaSR sur la prolifération des cellules cancéreuses de sein sont différents en fonction de la $[Ca^{2+}]_{ext}$. En effet, deux études montrent des effets différents sur les cellules MDA-MB-435s et MCF-7. La première étude montre que les cellules de ces deux types cellulaires prolifèrent moins à concentration physiologique (1,4 mM) qu'à faible concentration (0,2 mM) (Liu *et al.*, 2009). La seconde, elle, montre qu'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ de 1,4 mM à 5 mM entraîne une augmentation de la prolifération des MCF-7 (El Hiani *et al.*, 2009). Ces deux études pourraient laisser penser que le CaSR est à la fois un oncogène et un gène suppresseur de tumeur. Or, la revue de Brennan *et coll.* qui rassemble les chercheurs les plus reconnus dans le domaine d'étude du CaSR, discute de ces effets différents en précisant que les deux études ne sont pas réalisées dans les mêmes conditions de $[Ca^{2+}]_{ext}$ ce qui pourrait entraîner le recrutement de différentes protéines G en fonction de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ (Brennan *et al.*, 2013).

Certains auteurs vont plus loin, en faisant du CaSR un marqueur protéique de prédisposition à la formation de métastases, lorsqu'il est exprimé dans les cellules cancéreuses du sein humaines. Cette étude de Mihai *et coll.*, *in vivo* montre que chez 108 patientes ayant développé un cancer du sein, 15 patientes expriment le CaSR et parmi elles, 13 ont des métastases osseuses. A l'inverse, 23 patientes n'ont pas développé de métastases osseuses, avec seulement 2 patientes présentant une expression du CaSR dans la tumeur primaire (Mihai *et al.*, 2006). Cette étude est quelque peu controversée et doit donc être prise avec précaution, du fait de la sélection d'une majorité de patientes présentant un stade avancé du cancer du sein, et donc une fréquence forcément plus élevée de métastases osseuses (Theman *et al.*, 2009).

Plusieurs auteurs se sont attachés à l'étude de l'implication de ce CaSR dans les métastases osseuses issues d'un cancer du sein. Le microenvironnement osseux riche en Ca^{2+} (40 mM) semble être un terrain fertile pour favoriser la croissance tumorale des métastases osseuses via le CaSR. De plus, le TGF β sécrété dans la niche osseuse lors de l'ostéolyse, et le CaSR exprimé par les cellules cancéreuses présentent une action synergique sur la libération de la PTHrP par ces cellules cancéreuses de sein (Manning *et al.*, 2006). Ceci explique que le niveau de production de PTHrP est plus important dans les métastases osseuses qu'au niveau de la tumeur primaire du sein (Mihai *et al.*, 2006), et cela va dans le sens d'un cercle vicieux accentuant la colonisation osseuse par les métastases (Figure 10). Il

y aurait donc une voie PTHrP/CaSR/TGFβ qui serait cruciale dans le développement métastatique osseux (Brennan *et al.*, 2013).

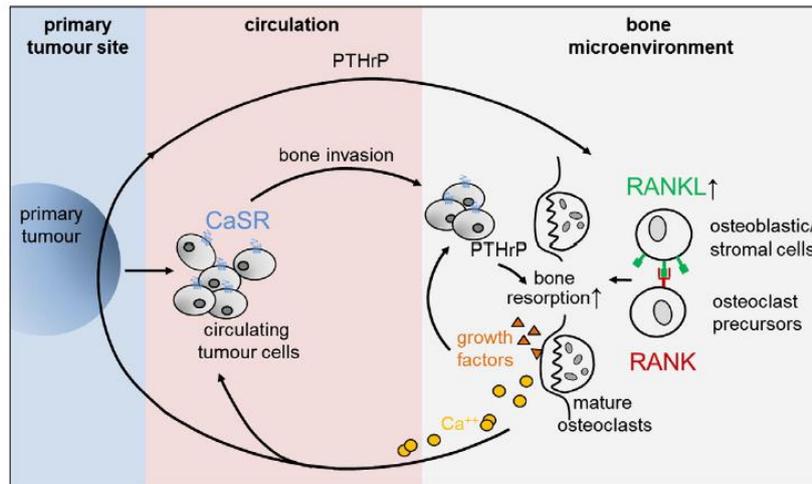


Figure 10. Implication du CaSR dans le cercle vicieux métastatique entre les cellules cancéreuses du sein, et le microenvironnement osseux. La tumeur primaire sécrète la PTHrP dans le sang, qui entraîne la libération de RANKL par les ostéoblastes. Ce ligand va aller activer son récepteur RANK à la surface des cellules progénitrices d'ostéoclastes, et activer leur maturation. Ces ostéoclastes vont ensuite résorber l'os, et libérer des facteurs de croissance (TGFβ) et du Ca²⁺ dans la matrice osseuse. Ces derniers iront activer à nouveau les cellules de la tumeur primaires, ainsi que les cellules cancéreuses du sein métastatiques présentes dans le sang, via le CaSR. Ce récepteur va accentuer la colonisation osseuse, et ainsi alimenter le cercle vicieux des métastases osseuses associées à un cancer du sein (D'après (Brennan *et al.*, 2013)).

1.2. Rôle des canaux potassiques de petite conductance activés par le Ca²⁺ (SKCa) dans le développement tumoral et métastatique

Le Ca²⁺_{ext} est un facteur du microenvironnement important dans la niche osseuse métastatique, comme nous avons pu le décrire précédemment. Nous émettons l'hypothèse que ce Ca²⁺_{ext} soit capable de réguler des processus impliqués dans la colonisation du tissu osseux par les cellules cancéreuses du sein. En effet, certaines cellules cancéreuses du sein expriment des canaux potassiques sensibles au Ca²⁺ intracellulaire. La concentration de ce dernier pourrait être augmentée au sein de ces cellules, consécutivement à l'augmentation de la [Ca²⁺]_{ext} détectée par le CaSR lors de leur arrivée dans la niche osseuse pré-métastatique.

1.2.1. Généralités sur les SK_{Ca}

a) Phylogénie et nomenclature des SK_{Ca}

Il existe plus de 80 gènes codant pour des protéines constituant les canaux K⁺ (Wickenden, 2002). Les K⁺ activés par le Ca²⁺ intracellulaire, ou K_{Ca}, ont été décrits pour la première fois par Gardos et al. en 1958, comme étant des canaux K⁺ régulant le volume cellulaire des érythrocytes, et dont l'activité dépend du Ca²⁺ intracellulaire (Gardos, 1958). Les canaux K_{Ca} ont été classés en 3 sous familles selon la valeur de leur conductance unitaire (par ordre décroissant) : BK_{Ca} (Big-conductance K_{Ca}); IK_{Ca} (Intermediate-conductance- K_{Ca}) et SK_{Ca} (Small-conductance-K_{Ca}) (Tableau 1). Les SK_{Ca}, n'ont été clonés que récemment, en 1996, et caractérisés comme étant impliqués dans l'hyperpolarisation faisant suite à la survenue d'un potentiel d'action (PA), ou AHP (afterhyperpolarisation), au sein des neurones centraux (Kohler *et al.*, 1996). Ces SK_{Ca} sont plus sensibles à la [Ca²⁺]_{int} que les BK_{Ca}.

IUPHAR	Nom du gène (HGHC)	Autres noms	Activés par / Valeur de la conductance/ voltage dépendance
K _{Ca} 1.1	<i>KCNMA1</i>	BK _{Ca} , Slo, Slo1	Ca ²⁺ /grande/oui
K _{Ca} 2.1	<i>KCNN1</i>	SK _{Ca} 1, SK1	Ca ²⁺ /faible /non
K _{Ca} 2.2	<i>KCNN2</i>	SK _{Ca} 2, SK2	Ca ²⁺ /faible /non
K _{Ca} 2.3	<i>KCNN3</i>	SK _{Ca} 3, SK3	Ca ²⁺ /faible /non
K _{Ca} 3.1	<i>KCNN4</i>	IK _{Ca} 1, SK4, IK1	Ca ²⁺ /intermédiaire/non
K _{Ca} 4.1	<i>KCNT1</i>	Slack, Slo2.2	Na ⁺ /-/oui
K _{Ca} 4.2	<i>KCNT2</i>	Slick, Slo2.1	Na ⁺ /-/oui
K _{Ca} 5.1	<i>KCNU1</i>	Slo3	Sensibles au pH/grande/-

Tableau 1. Nomenclature IUPHAR et HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) des canaux K_{Ca}. Les canaux concernés par mes travaux de thèse sont les canaux appartenant à la sous-famille des SK_{Ca} (Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels). BK_{Ca} : Big-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels ; IK_{Ca} : Intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (d'après (Wei *et al.*, 2005)).

Selon la nomenclature de l'IUPHAR (International Union of Pharmacology), il existe 8 isoformes de K_{Ca} (Tableau 1), et les 3 isoformes des SK_{Ca} sont les canaux appartenant à la famille des K_{Ca}2 ou SK_{Ca}, à savoir : K_{Ca}2.1 ou SK1, K_{Ca}2.2 ou SK2 et K_{Ca}2.3 ou SK3 (Wei *et al.*, 2005). Dans la suite du manuscrit, nous utiliserons les dénominations SK1, SK2 et SK3, pour

décrire aussi bien les protéines, que les canaux et les courants générés par ces canaux. La figure 11 présente l'arbre phylogénétique permettant de situer les SK_{Ca} au sein de la famille des canaux K⁺.

La famille SK_{Ca} est représentée par ces trois sous-familles dont les gènes respectifs sont *KCNN1* à *3*, selon la nomenclature HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee). Ces trois gènes sont situés sur des chromosomes différents chez l'homme : *KCNN1* (gène codant pour SK1) est situé sur le locus : 19p13.1, *KCNN2* (gène codant pour SK2) sur le locus 5q22.3 et enfin *KCNN3* (gène codant pour SK3) sur le locus 1q21.3. Il existe plusieurs épissages alternatifs des 9 et 8 exons contenus dans la partie codante des gènes *KCNN1* et *KCNN2 & 3*, respectivement (Stocker, 2004; Wei *et al.*, 2005). Le canal SK3 a été cloné pour la première fois en 1996 par Köhler et coll., dans le cerveau de rat (Barfod *et al.*, 2001; Kohler *et al.*, 1996).

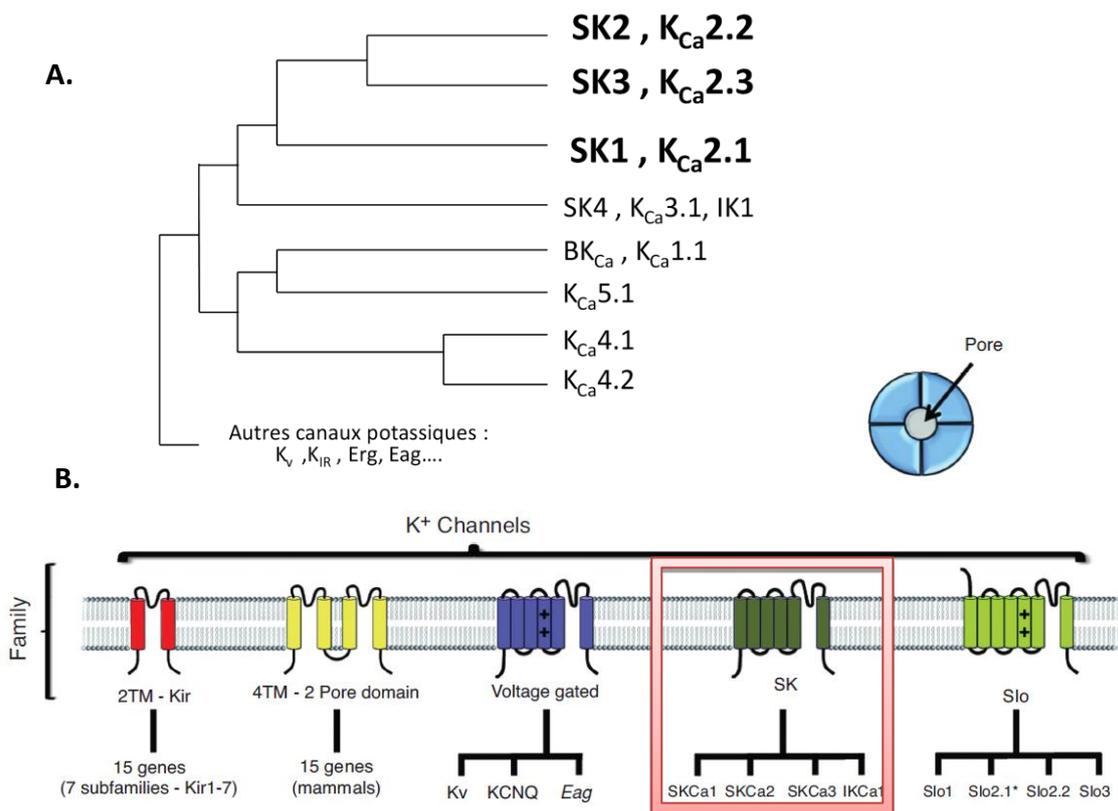


Figure 11. Classification phylogénétique des canaux K⁺. A. Dendrogramme des canaux K⁺, en particulier des canaux K_{Ca}. Les canaux ioniques SK_{Ca} sont représentés en gras (Modifié d'après (Kohler *et al.*, 1996) et (Wei *et al.*, 2005)). B. Canaux K⁺ classés selon la structure bidimensionnelle de leur sous-unités α (d'après (Gonzalez *et al.*, 2012)).

Les trois sous-familles de SK_{Ca} ont des répartitions tissulaires variables. Ainsi, SK1, bien que quasi-exclusivement exprimé dans le tissu neuronal, a été démontré récemment comme exprimé dans le pancréas (Andres *et al.*, 2009) et dans le cœur (Tuteja *et al.*, 2010). SK2 et SK3, quant à eux, bien que fortement exprimés dans le système nerveux central sont exprimés dans les tissus périphériques. De plus, le canal SK3 est la protéine ayant les répartitions les plus diverses parmi les SK_{Ca}, puisqu'on retrouve son ARNm dans de nombreux tissus, en particulier le tissu musculaire lisse (clitoris et corps caverneux) et au sein des endothéliums (Chen *et al.*, 2004).

b) Structure des SK_{Ca}

Les canaux SK_{Ca} sont formés de 4 sous-unités α , constituées chacune de 6 segments transmembranaires (S1 à S6), et de deux extrémités C- et N-term intracellulaires (Figure 12). Les SK_{Ca} possèdent une structure très conservée au cours de l'évolution, ainsi, on retrouve 80 % d'homologie entre les acides aminés qui composent les 6 segments transmembranaires de SK1, SK2 et SK3 (Kohler *et al.*, 1996). Ces sous-unités α ont des longueurs différentes, du fait de la variation du nombre d'acides aminés composant le domaine N-term et dans une moindre mesure ceux composant le domaine C-term de ces sous unités. En effet, les différents canaux sont constitués de 543, 579 et 736 acides aminés pour SK1, SK2 et SK3 respectivement.

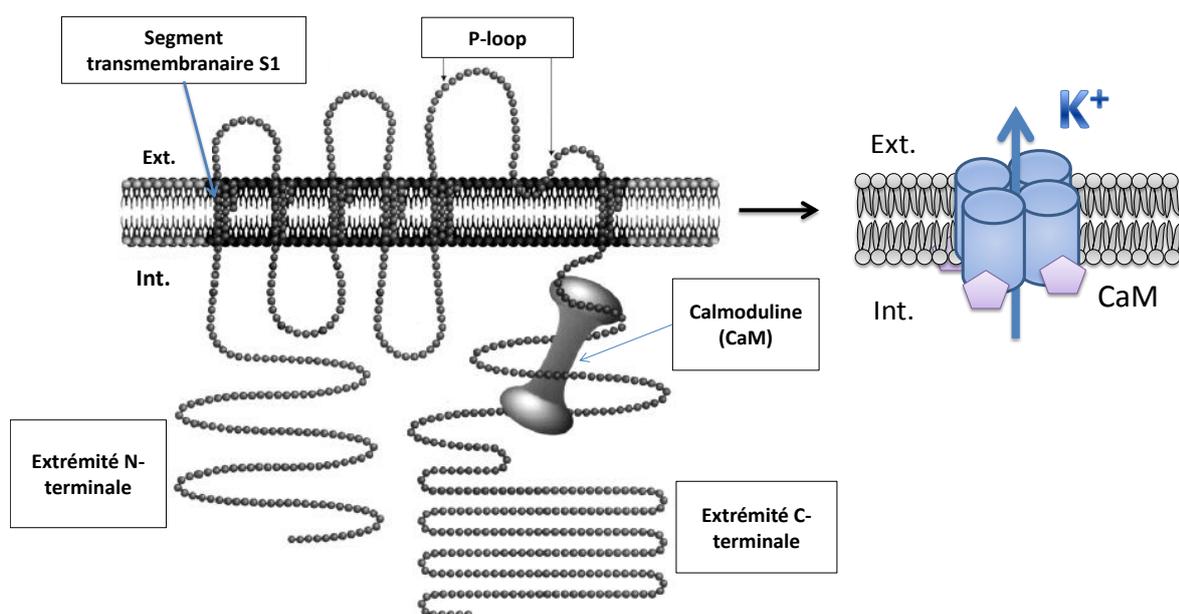


Figure 12. Structure d'un canal SK_{Ca}. A gauche, la structure d'une sous-unité α composant un canal SK_{Ca}. Chaque sous-unité α est constituée de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) et de deux extrémités N- et C-term intracellulaires. La boucle extracellulaire située entre les segments S5 et S6 ou P-loop, constitue le pore du canal, une fois les 4 sous-unités α assemblées. La calmoduline (CaM) confère la sensibilité du canal au Ca²⁺ intracellulaire(modifié d'après (Bond *et al.*, 1999)). A droite, schéma représentant quatre sous-unités α s'associant en homo ou hétérotétramères pour former un canal fonctionnel.

Les sous-unités α s'associent en tétramères afin de former les canaux SKCa (Figures 12 et 13). La présence d'hétérotétramères fonctionnels a été longtemps suggérée par la littérature, entre SK2 et SK3, et n'avait été démontrée que dans des modèles d'expression cellulaires, et non dans des tissus ou culture de cellules primaires (Monaghan *et al.*, 2004; Stocker, 2004). Ce n'est que récemment qu'une étude a clairement démontré, dans des myocytes cardiaques de souris, une association en hétérotétramères des sous-unités α natives de SK1, SK2 et SK3 (Tuteja *et al.*, 2010). De manière intéressante, l'étude de Monaghan et coll. montre que dans les cellules HEK 293, la co-expression d'isoformes de rat de SK2 et SK3 entraîne l'expression de canaux hétérotétramériques fonctionnels. Cependant, la co-expression de SK3 et de SK1 (isoformes humaines et de rat) entraîne la séquestration des canaux dans le RE, et donc une expression non fonctionnelle des hétérotétramères (Monaghan *et al.*, 2004). Les 4 boucles extracellulaires présentes sur chaque sous-unité, entre les segments S5 et S6, s'internalisent dans la membrane pour former le pore du canal, avec son filtre de sélectivité (Weatherall *et al.*, 2010). Ce dernier possède des acides aminés spécifiques, arrangés dans l'espace de manière à ne laisser passer que des ions K⁺. Au sein de ce pore, 4 ions K⁺ peuvent séjourner et diffuser de manière facilitée du fait de l'interaction entre le filtre de sélectivité et les ions K⁺. Bien que la structure des canaux SK_{Ca} n'ait pas été cristallisée à ce jour, les auteurs ont l'extrapolée à partir de la structure du canal KcsA, un canal exprimée par une bactérie procaryote, et dont Roderick MacKinnon a cristallisé la structure en 1998, et pour laquelle il a reçu le Prix Nobel de chimie en 2003, avec Peter Agre, afin de proposer un modèle tridimensionnel de la structure des SK_{Ca} présenté dans la figure 13 (Dilly *et al.*, 2012).

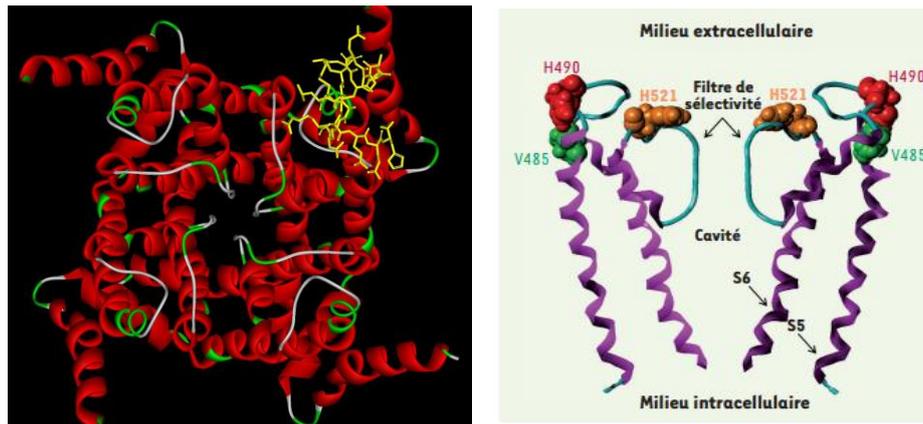


Figure 13. Schémas représentant la structure tridimensionnelle d'un canal SK_{Ca}. A gauche, vue du dessus de la structure tridimensionnelle d'un canal homotétramérique SK2. En jaune, une molécule d'apamine, inhibiteur fonctionnel des SK_{Ca} (modifié d'après (Weatherall *et al.*, 2010)). A droite, vue latérale d'une modélisation du pore de SK3 obtenue par analogie de séquence avec la structure cristallisée du canal KcsA. Les hélices α sont représentées en violet et deux sous unités α ont été retirées pour mieux visualiser la structure du pore (d'après (Dilly *et al.*, 2012)).

L'équipe de Xia et coll. a démontré en 1998 la présence de la calmoduline (CaM) associée à chaque sous-unité α (Xia *et al.*, 1998). Celle-ci est essentielle pour l'activité de ces canaux, et les interactions avec le C-term des sous-unités α sont si fortes que les auteurs décrivent la CaM comme exprimée constitutivement sur les canaux SKCa fonctionnels (Stocker, 2004). Chaque sous-unité α est reliée à la CaM par l'intermédiaire d'un domaine de fixation spécifique de la CaM ou CaMBD (CaM Binding Domaine), situé sur la région intracellulaire C-term faisant suite au sixième TM de la sous-unité α . Ce domaine est donc situé très proche du pore du canal. L'ouverture du canal est permise grâce à la présence de domaines de reconnaissance du Ca²⁺ ayant une forme spécifique et appelés EF-hands. La CaM possède 4 EF-hands : 2 sur la partie C-term (ou Lobe C) et 2 sur la partie N-term (ou Lobe N). Il a été démontré que la liaison de deux ions Ca²⁺ sur les deux sites EF-hands du lobe N de la CaM entraînait un changement de conformation que les auteurs appellent « dimères de dimères » et qui est responsable de l'ouverture des canaux SK_{Ca}. En effet, deux domaines CaMBD appartenant à deux sous-unités α différentes forment un dimère, relié par deux CaM situées à chacune des extrémités. Il y a donc pour chaque canal fonctionnel, deux dimères de dimères de dimères CaM/CaMBD. La fixation des lobes C des CaM sur la sous-unité α est, quant à elle, indépendante du Ca²⁺ présent sur les domaines EF hand de ce lobe (Schumacher *et al.*, 2001). La fixation du Ca²⁺ entraîne donc un changement de conformation de ces dimères de dimères CaMBD, qui se propage aux segments S6 situés à proximité, et entraîne ainsi

l'ouverture du canal. L'ensemble de ces interactions est représenté dans la figure 14. Il y a donc un mécanisme d'ouverture particulier des SK_{Ca}, qui dépend de la $[Ca^{2+}]_{int}$, et qui permet une activation rapide des canaux, en réponse à une augmentation de cette $[Ca^{2+}]_{int}$. Ceci permet à ces canaux de réguler la fréquence des potentiels d'action (PA) en fonction de la $[Ca^{2+}]_{int}$. En effet, suite au déclenchement du PA, la $[Ca^{2+}]_{int}$ augmente via l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants. Celle-ci va activer les SKCa, qui vont alors permettre de rétablir un potentiel membranaire plus négatif que le potentiel de membrane de repos (hyperpolarisation), par extrusion de K^+ (Bond *et al.*, 1999). La présence de cette CaM associée constitutivement à ces canaux SK_{Ca}, leur confère leur sensibilité au Ca^{2+} (Girault *et al.*, 2012).

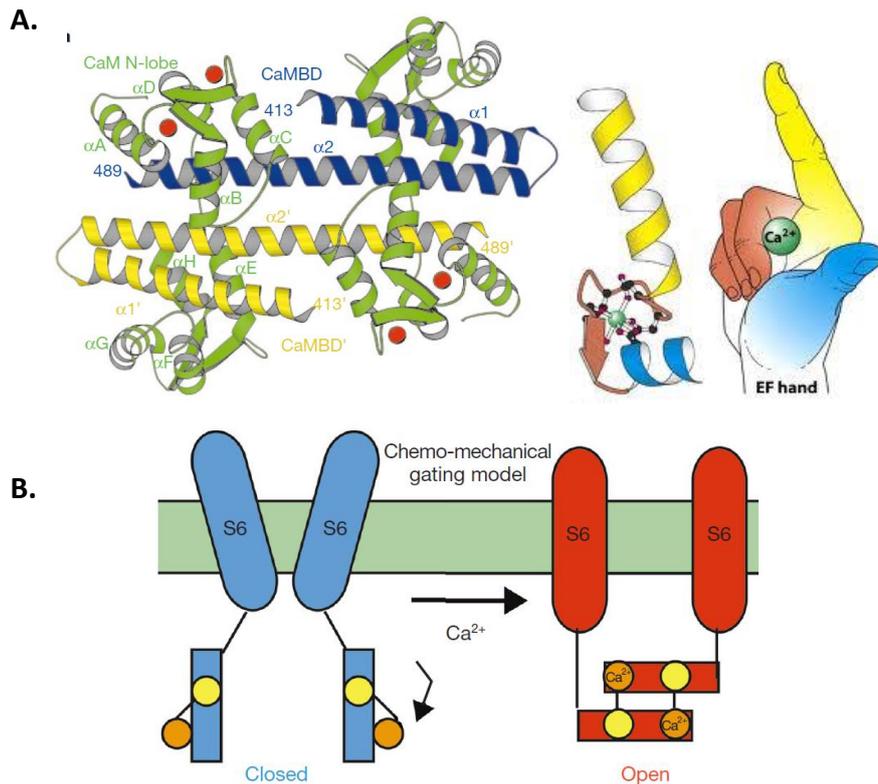


Figure 14. Structure et mécanismes fonctionnels de la calmoduline. A. Schéma représentant l'interaction entre un dimère de CaMBD et un dimère de CaM. Les CaMBD sont constitués de deux hélices α , une longue ($\alpha 1$) et une courte ($\alpha 2$). L'hélice $\alpha 1$ interagit avec le lobe N de la CaM, et l'hélice $\alpha 2$ avec le lobe C. B. Schéma représentant le modèle d'ouverture des canaux SK_{Ca} par un mécanisme dépendant du Ca²⁺. Pour plus de clarté, seules deux segments S6 sont représentés, sur les quatre existants, et le reste du canal n'est pas représenté. De plus les rectangles bleu ou rouge représentent de manière simplifiée les domaines CaMBD. En absence de Ca²⁺, le canal est en conformation fermée (en bleu), et seuls les lobes C des CaM (en jaune) sont associés aux CaMBD. Une fois le Ca²⁺ fixé sur les lobes N des CaM, les CaMBD et les CaM s'associent en dimères de dimères. Ceci entraîne un changement de conformation, qui stabilise l'interaction, et les domaines CaMBD se retrouvent tête bêche. Ce changement de conformation se propage aux segments S6 via le linker (trait noir), et entraîne une rotation de ces segments (exagérée ici), engendrant l'ouverture du canal (D'après (Schumacher *et al.*, 2001; Stocker, 2004)).

Les domaines C et N-term sont essentiels pour l'adressage membranaire et la fonctionnalité des canaux SK_{Ca}. L'étude de Roncarati et coll., a montré qu'une délétion de la partie N-term des sous-unités α entraînait une rétention des protéines SK3 dans le RE, de même que pour une délétion de la partie C-term contenant ces CaMBD. Par ailleurs, la délétion de cette partie C-term contenant les domaines CaMBD empêche également l'oligomérisation des sous-unités α et donc la formation de canaux SK3 membranaires fonctionnels dans des neurones de rat (Roncarati *et al.*, 2005). De même, il a été montré la présence d'une isoforme courte de SK2, issue également d'un épissage alternatif (présence d'un promoteur supplémentaire dans la séquence codante de *KCNN2*), indiquant que la partie N-term est nécessaire pour l'adressage correct et la fonctionnalité de ce canal dans un

modèle de souris KO (Allen *et al.*, 2011). Une autre étude a montré qu'il existait une forme alternative de SK3, appelée SK3_1C, résultant de l'épissage alternatif de l'exon 1 du gène *KCNN3*. Il s'agit d'une forme dominante négative, exprimée de manière native dans de nombreux tissus, qui inhibe l'expression de surface des autres isoformes de SK_{Ca} lorsqu'elle est co-exprimée avec celles-ci, en les retenant dans le cytoplasme (Kolski-Andreaco *et al.*, 2004). Cette étude est complétée par la découverte d'une forme dominante négative de SK3 issue de l'épissage alternatif du gène *KCNN3*, entraînant une perte de l'exon 1 codant pour la partie N-term et le segment S1 du canal SK3. Les auteurs arrivent aux mêmes conclusions, en montrant que la co-expression de la forme dominante négative (appelée SK3_1B) avec de la forme de SK3 contenant le N-term, entraîne une localisation cytoplasmique plutôt que membranaire, et une perte de courant SK3 par rapport aux cellules transfectées avec la forme SK3 contenant la partie N-term (Tomita *et al.*, 2003). Enfin, il existe une forme embryonnaire, découverte par Wittekindt et coll., en 2004, appelée hSK3_ex4, et contenant une insertion de 15 acides aminés dans le domaine entre le S6 et le P-loop. Cette isoforme de SK3 est fonctionnelle, mais insensible à l'apamine (Apa), bloqueur spécifique des SK_{Ca} (Wittekindt *et al.*, 2004). Il existe donc de nombreuses isoformes des SK_{Ca}, qui mettent en évidence l'importance des domaines C- et N-term dans la fonctionnalité de ces canaux.

c) Electrophysiologie et pharmacologie des SK_{Ca}

Electrophysiologie des SK_{Ca}

Les canaux SK_{Ca} sont exprimés dans les cellules excitables ou non excitables, où ils n'exercent pas les mêmes fonctions. En effet, dans les neurones par exemple, ils repolarisent et hyperpolarisent la membrane plasmique conduisant à la fermeture des canaux calciques dépendants du voltage. La conséquence est donc une diminution de la $[Ca^{2+}]_{int}$. Comparativement, dans les cellules non excitables, comme les cellules endothéliales, ils facilitent l'entrée de Ca^{2+} en entraînant une augmentation de la force électromotrice (FEM).

La conductance unitaire de ces canaux est située aux alentours de 10 pS lorsqu'une $[K^+]$ identique est appliquée de part et d'autre de la membrane (Barfod *et al.*, 2001; Kohler *et al.*, 1996). L'allure d'un courant SK_{Ca} enregistré en voltage-clamp et en présence d'une $[K^+]_{int}$ égale à la $[K^+]_{ext}$, est présentée dans la figure 15A.

Ces canaux ont une électrophysiologie propre, ils sont indépendants du voltage ; et leur sensibilité au Ca^{2+} est forte, puisque l' EC_{50} est située entre 400 et 800 nM de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$. Pour comparaison la sensibilité du BK_{Ca} beaucoup plus faible puisqu'il est activé pour des concentrations allant de 0.1 à 100 μM (Latorre *et al.*, 2006). La sous-unité α des SKCa possède un segment S4 présentant trois acides aminés chargés positivement (deux arginines et une histidine) à pH physiologique. Ceci est un vestige de la voltage-dépendance observée pour de nombreux canaux K^+ , mais ne suffit pas à conférer au canal une voltage-dépendance. Ce segment S4 posséderait une composition en acides aminés qui stabiliserait la structure des hétérotétramères, en s'associant avec d'autres segments TM par des ponts salins (Köhler *et al.*, 1996). L'équipe de Jones et coll., a montré que ce segment S4 est impliqué dans l'adressage membranaire des SKCa , puisqu'une Lysine présente dans le linker entre S4 et S5 est indispensable à cet adressage membranaire (Jones *et al.*, 2005).

Comme nous l'avons vu précédemment, ces canaux sont activés par l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$, et l'amplitude du courant augmente avec la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ selon une relation de dose-réponse (Figure 15B). Le coefficient de Hill pour ces canaux est compris entre 3,9 et 4,8, ce qui sous-entend que la fixation de 4 ions Ca^{2+} est nécessaire pour l'ouverture du canal (Strassmaier *et al.*, 2005).

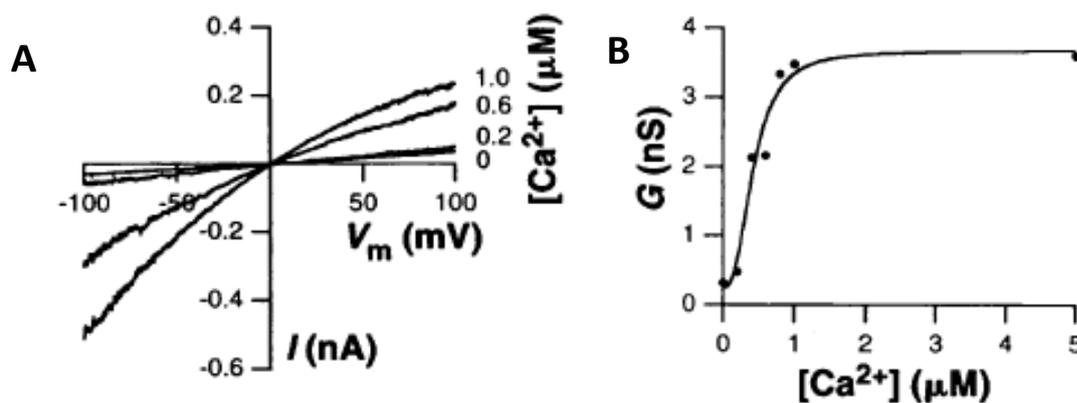
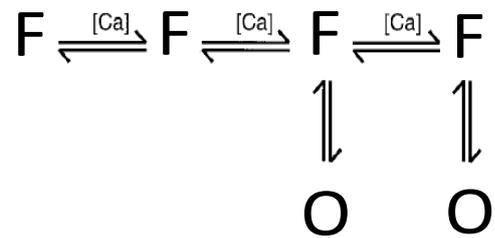


Figure 15. Caractéristiques électrophysiologiques du courant SK2 A. Traces représentatives de courants obtenus en voltage-clamp, en balayant des voltages de -100 à +100 mV sur des ovocytes de Xénope exprimant le canal SK2. Les auteurs ont fait varier la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ afin de mettre en évidence la sensibilité au Ca^{2+} de ce canal. B. La conductance du courant SK2 est proportionnelle à la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ et la conductance maximale est atteinte dès 1 μM (d'après (Barfod *et al.*, 2001) et (Köhler *et al.*, 1996)).

Plusieurs équipes (Bond *et al.*, 1999; Hirschberg *et al.*, 1998) proposent la modélisation des états ouverts et fermés des canaux SK_{Ca} suivante :



Où F désigne les états fermés, et O les états ouverts. Les transitions entre les états fermés sont dépendantes de la fixation du Ca²⁺ sur les CaM (Bond *et al.*, 1999; Hirschberg *et al.*, 1998). Hirschberg et coll. ont étudié les durées d'ouverture et de fermeture des canaux SK2 exprimés dans des ovocytes de Xénope, et ont déterminés deux probabilités d'ouverture (P_o) : une P_o élevée (0,6) et une P_o faible (0,05) en présence d'une [Ca²⁺]_{int} libre de 1 μM. Les canaux peuvent passer d'un comportement à l'autre, de manière spontanée. La P_o faible correspond à un maintien à l'état fermé pendant une durée importante allant de plusieurs millisecondes à quelques secondes (Hirschberg *et al.*, 1998).

Une autre caractéristique de ces courants est la rectification entrante observée pour des potentiels de membrane positifs (> 20 mV) (Figure 16). Les mécanismes à l'origine de cette rectification sont encore mal connus, cependant il s'agirait d'une modulation par les cations intracellulaires (Ca²⁺, Mg²⁺ ...) et impliquerait des domaines situés dans la région formant le pore du canal, ou des domaines situés sur le segment S6, à proximité de ce pore (pour revue (Girault *et al.*, 2012)).

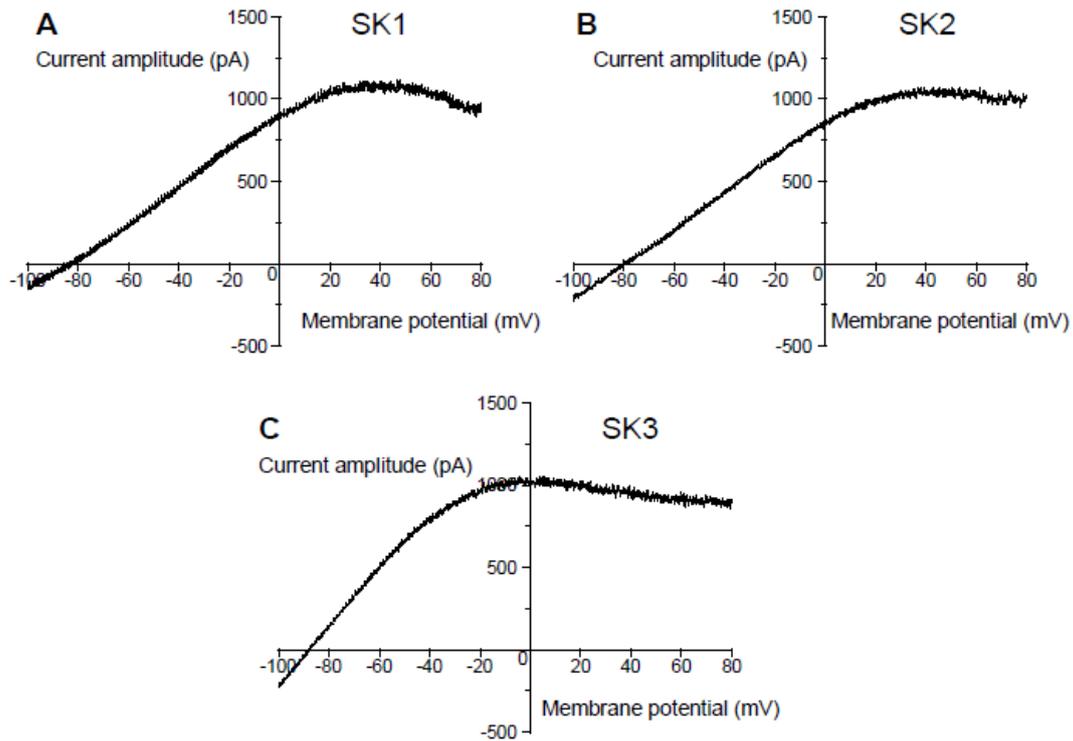


Figure 16. Courants représentatifs de chaque SKCa. (A. SK1, B. SK2, C. SK3). Ces courants ont été enregistrés sur des cellules HEK surexprimant les canaux d'intérêt, en réalisant des rampes balayant des voltages de -100 à +80 mV. La configuration utilisée était la configuration cellule entière en voltage imposé. Ces mesures ont été réalisées en présence de 1 μM de Ca^{2+} libre dans le cytosol. On note une rectification entrante à partir des potentiels positifs (d'après (Girault *et al.*, 2012)).

Pharmacologie des SKCa

Il existe trois classes de modulateurs des canaux SKCa : des peptides tels que l'apamine ou la leuriotoxine, des lipides (Edelfosine, Ohmlin) et des molécules hétérocycliques (NS 8593) (Pour revue Girault et al 2012). A titre indicatif, quelques exemples de modulateurs des canaux SKCa ainsi que leurs IC_{50} ou EC_{50} sont présentés dans le tableau 2 ci-dessous.

Activators (EC ₅₀)	KCa2.1	KCa2.2	KCa2.3
NS309		620 nM	120 nM ⁸
Dichloro-EBIO		27 μM	12 μM ⁸
Riluzole	2 μM	8 μM	3 μM
EBIO		450 μM	87 μM ⁸
Inhibitors (IC ₅₀) ¹	KCa2.1	KCa2.2	KCa2.3
tamapin	42 nM	24 pM	1.7 nM
apamin	8 nM	30-200 pM	10 nM
UCL 1848	1 nM	110 pM	2 nM
leurotoxin I	325 nM	200 pM	1 nM
UCL 1684	800 pM	200 pM	10 nM
PO5		22 nM	25 nM
Lei-Dab7	6 μM	5.5 nM	2.5 μM

Tableau 2. Modulateurs pharmacologiques des SK_{Ca}. Il existe de nombreux activateurs et inhibiteurs des SK_{Ca}. Aucun n'est strictement spécifique de l'une ou l'autre des isoformes de SK_{Ca} (d'après (Wulff *et al.*, 2007)).

Au cours de ce travail de thèse, nous avons utilisé l'apamine exclusivement. Cette toxine de venin d'abeille (*Apis Mellifera*), a été découverte en 1975 par Vincent et coll. (Vincent *et al.*, 1975). Cette découverte précède donc le clonage des SK_{Ca}, mais a permis de différencier les canaux SK_{Ca} du BK_{Ca} et d'IK_{Ca}, qui sont insensibles à l'apamine (Wulff *et al.*, 2007). L'apamine est un peptide de 18 acides aminés, qui constitue un puissant inhibiteur de l'activité des SK_{Ca}, puisqu'elle inhibe la quasi-totalité du courant SK3 lorsque les cellules HEK-SK3 sont traitées avec 100 nM d'apamine (81 % d'inhibition, (Barfod *et al.*, 2001)). L'apamine n'est pas sélective de l'une ou l'autre des isoformes de SK_{Ca}, cependant elle possède une affinité différente pour les trois isoformes (Wulff *et al.*, 2007). En effet, l'IC₅₀ de l'apamine est plus faible pour le courant SK2 (30-200 pM) que pour les courants SK1 et SK3 (1-12 nM et 1-20 nM respectivement) (Girault *et al.*, 2012). Dans la revue de Girault *et al.*, il est question d'un motif RxCQ présent sur les toxines les plus efficaces pour bloquer les SK_{Ca}. En effet, ce motif est retrouvé sur l'apamine, la tapamine (RxCE) et la leuriotoxine. Les auteurs expliquent également la meilleure affinité de l'apamine pour SK2 du fait de la présence d'une Sérine dans la boucle extracellulaire entre les S3 et S4 de SK2, absente des deux autres isoformes et qui serait impliquée dans cette interaction particulière entre SK2 et l'apamine (Weatherall *et al.*, 2011). La forme embryonnaire découverte par Wittekindt, dont nous avons parlé précédemment, est insensible à l'apamine du fait de la présence de 15 acides aminés supplémentaire dans cette boucle entre S3 et S4, ce qui confirme l'importance de cette boucle pour l'interaction avec l'apamine (Wittekindt *et al.*, 2004).

Au sein des deux parties suivantes, nous nous attacherons à donner plus de détails sur le canal SK3, qui est le canal sur lequel je me suis focalisée au cours de ce travail de thèse.

1.2.2. Rôles physiologiques et pathologiques des canaux SK3

a) Rôles physiologiques de SK3

Les canaux SK_{Ca} sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques des cellules excitables (musculaires et neuronales) mais aussi celles des cellules non excitables. L'implication des SK_{Ca} dans la régulation des fonctions physiologiques des cellules excitables a été la première fonction décrite de ces canaux, comme régulateurs de l'AHP au niveau des neurones (Kohler *et al.*, 1996). Depuis une vingtaine d'années, les auteurs décrivent de nombreux rôles du canal SK3 dans la physiologie des neurones. En effet, SK3 est impliqué dans la mémorisation à long terme, puisqu'il est exprimé dans les neurones de l'hippocampe et que l'augmentation de son expression est corrélée à une diminution de l'apprentissage chez des souris âgées (Blank *et al.*, 2003; Kuiper *et al.*, 2012). Enfin, SK3 est impliqué dans la neurogenèse, puisque son activité serait associée au réarrangement du cytosquelette d'actine indispensable à la différenciation des neurones (Liebau *et al.*, 2011). Le canal SK3 est également exprimé dans le tractus gastro-intestinal, puisque les travaux de Ro *et al.* (2001) montrent une expression de ce canal dans les myocytes du colon de souris (Ro *et al.*, 2001). Fujita *et coll.* quant à eux, montrent une expression de SK3 au sein des cellules pacemaker du tractus digestif de rat, les cellules de Cajal (Fujita *et al.*, 2001). Cette même équipe a montré une expression de SK3 dans les fibroblastes présents dans la couche musculaire entourant l'intestin chez la souris, et transmettant via des jonctions communicantes les signaux aux cellules de Cajal (Fujita *et al.*, 2003). Le courant SK3 serait le courant pacemaker permettant le péristaltisme intestinal nécessaire à la digestion. De nombreuses études décrivent également l'implication de SK3 dans la régulation de l'activité musculaire. En effet, Pribnow *et coll.* montrent que des cellules musculaires squelettiques dénervées présentent une hyperexcitabilité, réduite par un traitement à l'aide d'apamine. Le canal SK3 n'est pas exprimé par les cellules musculaires squelettiques normales (innervées) du muscle de rat, qui ne présentent pas d'AHP, alors qu'il l'est par ces fibres musculaires ayant été dénervées. Ceci indique que la présence de SK3 dans le muscle squelettique dénervé entraîne la

production d'une AHP pathologique, et favorise ainsi l'excitabilité musculaire (Pribnow *et al.*, 1999). Ce résultat est étonnant puisque la fonction de SK3 est d'induire une hyperpolarisation, et devrait donc, s'il est exprimé, réduire l'excitabilité musculaire. La forme dominante négative SK3_1B a été utilisée par l'équipe de Villalobos et coll. pour démontrer que SK3 était impliquée dans l'AHP de moyenne durée et non l'AHP lente comme cela avait été décrit précédemment par Köhler en 1996, dans les neurones corticaux (Villalobos *et al.*, 2004). Plus récemment, il a été montré que les canaux SKCa, dont SK3, étaient impliqués dans la différenciation des cellules pacemaker du cœur, leur activation conduisant à un remodelage rapide du cytosquelette d'actine, une inhibition de la prolifération permettant cette différenciation de cellules pluripotentes en cellules cardiaques (Kleger *et al.*, 2010). Le canal SK3 est exprimé dans les muscles lisses utérins et de la vessie. Il contrôle, en les réduisant, les contractions phasiques de ce muscle *via* l'hyperpolarisation et la diminution d'entrée de Ca²⁺ qu'il induit (Herrera *et al.*, 2003; Pierce *et al.*, 2010).

Le canal SK3 n'est pas seulement exprimé par les cellules excitables dont il régule le potentiel de membrane. Il est également exprimé par certaines cellules non excitables, tels que les cellules endothéliales constituant la paroi des artères, où il influence la régulation de la pression artérielle de par l'hyperpolarisation qu'il induit dans les cellules endothéliales et qui dépendrait de l'EDHF (facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium). En effet, en s'activant dans ces cellules endothéliales, il activerait la sécrétion de cet EDHF qui entrainerait la relaxation des cellules musculaires lisses constituant les artères, réduisant ainsi la pression artérielle (Taylor *et al.*, 2003). Le canal SK3 est exprimé dans d'autres types cellulaires et l'équipe de Fay et coll., a montré une implication de ce canal dans l'apoptose des granulocytes et des neutrophiles, et dans la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En effet, une activation de SK3 favorise la production de ROS ainsi que l'apoptose de ces cellules (Fay *et al.*, 2006).

b) Rôles pathologiques de SK3

Le canal SK3 est décrit comme étant impliqué dans de nombreuses pathologies psychiatriques. En effet, SK3 régule l'excitabilité neuronale et la libération de neurotransmetteurs dans les neurones dopaminergiques, et a un rôle dans la dépression (Jacobsen *et al.*, 2008). De plus, l'équipe de Tomita et al., a montré que l'expression d'une forme tronquée de SK3 (SK3_1B, issue de l'épissage alternatif de l'exon 1 du gène *KCNN3*,

pour laquelle il manque le N-term et le début du S1 était retrouvée dans le cerveau humain et serait impliquée dans la schizophrénie (Tomita *et al.*, 2003). L'étude de Wolfart a appuyé cette implication de SK3 dans cette maladie en montrant une expression préférentielle de SK3 dans les neurones dopaminergiques de cerveau de rat (Wolfart *et al.*, 2001). Enfin, le canal SK3 serait également impliqué dans les pathologies associées à une hyperexcitabilité neuronale, telle que la maladie de Parkinson (Liegeois *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010).

Le canal SK3 est également connu pour être impliqué dans la régulation de la respiration et des contractions utérines lors de l'accouchement. En effet, l'équipe de Bond *et coll.* a montré dans un modèle murin permettant l'expression conditionnelle *in vivo* du canal SK3, que la surexpression de SK3 entraînait des réponses anormales à l'hypoxie lors de mesure des capacités respiratoires chez la souris ainsi qu'une diminution des contractions utérines, compromettant l'accouchement chez ces souris gestantes (Bond *et al.*, 2000). Cette étude a été complétée en 2007 par cette même équipe qui montre qu'une inhibition de l'activité de SK3 rétablit un rythme de contractions utérines phasiques favorables à l'accouchement. SK3 serait donc responsable du couplage excitation-contraction des fibres musculaires utérines, en limitant l'influx calcique via les canaux calciques de type L (Brown *et al.*, 2007). L'expression et l'activité du canal SK3 par les souris gestantes en fin de grossesse n'est donc pas bénéfique, puisqu'il empêche les contractions utérines indispensables lors de la mise-bas. Enfin, le canal SK3 est impliqué dans certaines pathologies de l'excitabilité cardiaque puisque l'expression d'une protéine SK3 présentant un SNP particulier est retrouvée chez 209 patients atteints de fibrillations atriales (Olesen *et al.*, 2011).

1.2.3. Régulation du canal SK3

Peu de données existent quant à la régulation de l'expression et de l'activité du canal SK3. Concernant l'activité du canal SK3, il est connu que certains résidus présents dans la partie externe du pore, des histidines, peuvent être protonés et entraîner une inhibition de la fonctionnalité du canal. L'application d'une solution extracellulaire acide entraîne une inhibition de SK3 avec un pH donnant un IC_{50} de 6.8. Cette inhibition serait aussi dépendante du voltage et le mécanisme proposé concerne un déplacement de l'affinité des cations divalents impliqués dans la rectification, à l'entrée du pore de sélectivité du canal (Goodchild *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'utilisation d'une solution intracellulaire acide (pH= 6.4) inhibe le

courant SK3 dans les cellules HEK-293T (Peitersen *et al.*, 2006). Cette inhibition est dépendante de la $[Ca^{2+}]_{int}$ et du voltage. Il est probable que ces deux effets inhibiteurs par à la fois le pH acide du milieu extracellulaire et celui du milieu intracellulaire impliquent un même mécanisme, car il est difficile de diminuer l'un, sans affecter l'autre.

Du point de vue de la régulation de l'expression du canal SK3, deux modulateurs ont été décrits jusqu'ici : les œstrogènes ; et les inhibiteurs de la NOS (Nitric Oxyde Synthase). L'équipe de Bosch et coll., a montré que dans les neurones de l'hypothalamus de cobaye, les œstrogènes sont capables d'augmenter le taux d'ARNm codant pour SK3 (Bosch *et al.*, 2002). Ceci permettrait la régulation de l'excitabilité neuronale par les œstrogènes, par rétrocontrôle négatif, dans ce modèle. Pour aller plus loin, d'autres équipes se sont intéressées aux mécanismes induisant cette régulation de l'expression de SK3 par les œstrogènes. Ainsi, Jacobson et al ont montré que le 17β œstradiol (E2) en se fixant sur son récepteur ER α activait la transcription de SK3 induite par le facteur de transcription Sp1 (Specificity protein 1) *in vitro* dans les cellules COS7 (Jacobson *et al.*, 2003). Cette étude a été réalisée dans un modèle cellulaire n'exprimant pas nativement ni le canal, ni le récepteur ER α . Cependant, une étude *in vivo* chez la souris a confirmé ces résultats, en précisant que lors de la grossesse deux facteurs de transcriptions induits par les œstrogènes agissaient en compétition pour réguler la transcription du canal SK3. Il s'agit de Sp1 et Sp3, le premier est un activateur de transcription et le second un répresseur de transcription, ils sont tous les deux activés par les œstrogènes, et se fixent sur le même élément de réponse contenu dans le promoteur du gène *KCNN3*. Ces deux facteurs agissent donc sur l'expression de SK3 en réponse aux œstrogènes, ce qui permet une régulation de la fréquence des contractions utérines pendant la grossesse. Dans cette même étude, il est montré que les transcrits et les protéines SK3 sont réduits dans le myomètre à la fin de la grossesse (Pierce *et al.*, 2010). Une autre étude a montré une modulation de l'expression de SK3 par les inhibiteurs de la NOS, exprimée à la surface des cellules endothéliales exprimant ce canal. Cette étude montre que l'expression de la protéine SK3 est réduite en inhibant l'activité de la NOS endothéliale, que ce soit *in vivo* (aorte de souris transgéniques) ou *in vitro* (cellules endothéliales de la lignée HUVEC : cellules humaines de cordon ombilical) (Zhou *et al.*, 2007). De manière intéressante, l'endothélium libère des substances vasoactives, telles que l'EDHF, et SK3 interviendrait dans la relaxation induite par dans sa libération par les cellules endothéliales (Zhou *et al.*, 2007). Il

faut noter que le promoteur du gène *KCNN3* (codant pour SK3) présente de nombreux sites de fixation putatifs pour certains facteurs de transcription tels que NF κ B (Nuclear Factor of activated T cells), ceux de la famille CREB (demi-site CRE : cAMP Response Element) ou encore NFAT (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=home>).

Après avoir effectué la revue de la littérature concernant l'état des connaissances sur la structure, l'électrophysiologie et la régulation des SK_{Ca}, en insistant sur le canal SK3, il convient de présenter l'implication de ces canaux dans la physiopathologie, en particulier dans le cancer.

1.2.4. Rôle du canal SK3 dans la biologie de la cellule cancéreuse

a) Canaux potassiques et cancer

Le début du XXI^{ème} siècle est marqué par un essor des publications concernant l'implication des canaux ioniques dans la biologie de la cellule cancéreuse. Ainsi, plusieurs types de canaux ioniques seraient impliqués dans la prolifération et la migration cellulaires, deux phénomènes essentiels pour le développement tumoral et l'établissement de métastases. Les canaux K⁺, en particulier, sont impliqués dans la prolifération de nombreux types de cellules cancéreuses ((sein) (Wang *et al.*, 1998) (Ouadid-Ahidouch *et al.*, 2000) (Pardo *et al.*, 1999)) ((prostate)(Parihar *et al.*, 2003; Prevarskaya *et al.*, 2007)). Ces canaux K⁺ régulent le potentiel de membrane de repos (effet lié à la charge) et le volume cellulaire (en régulant la [K⁺]_{int}). Or, le gonflement cellulaire, ou au contraire le rétrécissement cellulaire sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et l'apoptose, respectivement (Kunzelmann, 2005). Wang et coll. décrivent ainsi l'implication des canaux K⁺ dans la balance existant entre les phénomènes d'apoptose et de prolifération cellulaire (Wang, 2004). Certains auteurs proposent que les canaux K⁺ soient une cible dans la thérapie de lutte contre le cancer, puisque leur expression augmente dans de nombreux types de cellules cancéreuses (Schonherr, 2005). La prolifération n'est pas la seule fonction biologique régulée par les canaux K⁺, ils génèrent également une angiogenèse désorganisée, une migration et une invasion cellulaires qui conduisent au processus métastatique (Prevarskaya *et al.*, 2010) (Cuddapah *et al.*, 2011).

b) SKCa et cancer

De nombreuses cellules cancéreuses expriment les canaux K_{Ca} : cellules de gliome, de mélanome, du cancer de l'estomac, du pancréas, du colon, du sein, de l'utérus, et de la prostate (Kunzelmann, 2005). Dans la majorité des cas, ces canaux sont faiblement exprimés par les cellules normales du tissu concerné (Potier *et al.*, 2009). Ceci en fait des cibles diagnostiques et thérapeutiques intéressantes.

Parmi ces canaux K_{Ca} , les SK_{Ca} sont largement impliqués dans le cancer, ainsi, SK2 est exprimé par les cellules de mélanome où son expression est favorisée par l'hypoxie (Tajima *et al.*, 2006), et par les cellules de Jurkat, qui sont des cellules leucémiques (Jager *et al.*, 2000). Il régule la prolifération de ces types cellulaires.

Le canal SK3, lui, ne régule pas la prolifération cellulaire mais une autre fonction biologique importante dans le développement métastatique : la migration cellulaire. En effet, il est impliqué dans la migration de nombreuses cellules cancéreuses comme l'a démontré l'équipe de recherche que j'ai intégrée. Il régule ainsi la migration des cellules cancéreuses de sein (Potier *et al.*, 2006), de mélanome (Chantôme *et al.*, 2009), et de cancer du côlon (Potier *et al.*, 2010). Dans les cellules cancéreuses de sein, il a été démontré que le canal SK3 modulait 60 % de la migration totale de ces cellules, on parle de migration dépendante du canal SK3, notion qui sera utilisée ici pour décrire cette part de migration dépendante du canal d'intérêt. Il faut préciser que lorsque nous citons le canal SK3, il s'agit soit d'un hétéro-tétramère de SK2/SK3 ou d'un homo-tétramère de SK3, car les cellules cancéreuses, dans lesquelles il a été démontré une implication du canal SK3, les deux transcrits *KCNN2/KCNN3* ont été retrouvés (Potier *et al.*, 2006).

Le phénomène de migration cellulaire est décrit par Schwab et coll., qui s'intéressent particulièrement au rôle des canaux ioniques dans la migration amiboïde, dans de nombreuses publications (Schwab *et al.*, 2012). Les cellules qui vont se déplacer présentent un phénotype particulier, détaillé dans la figure 17A. Ces cellules sont polarisées, d'un côté le front de migration présentant des lamellipodes, sortes de protrusions cytoplasmiques, de l'autre l'arrière de la cellule présentant des points d'adhérence cellulaires. Les différentes protéines impliquées dans la migration sont situées d'un côté ou de l'autre de la cellule, en fonction de là où la cellule en a besoin, afin de permettre le déplacement cellulaire (Ridley *et al.*, 2003; Schwab, 2001; Schwab *et al.*, 2007).

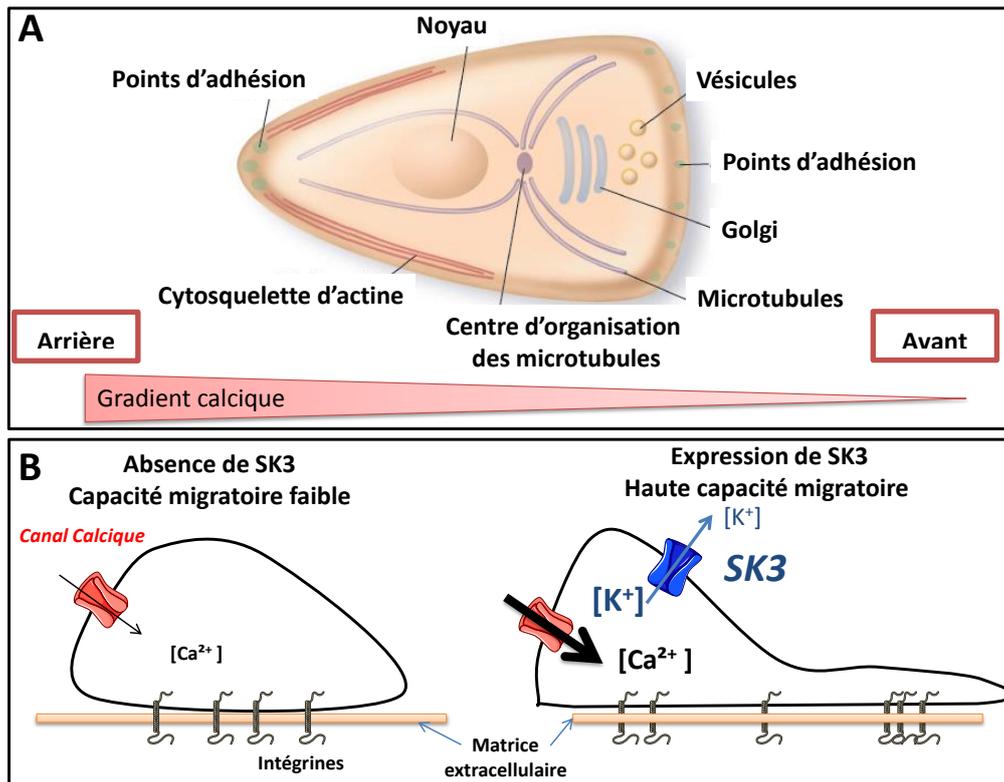


Figure 17. Implication de SK3 dans la migration cellulaire. A. Anatomie d'une cellule migrante. La cellule est polarisée avec un front de migration caractérisé par la présence de protrusions cytoplasmiques permises par une organisation spécifiques des microtubules et un sens de polymérisation d'actine favorisé par une faible $[Ca^{2+}]_{int}$; et l'arrière de la cellule présentant de nombreuses adhérences à la matrice liée à une forte $[Ca^{2+}]_{int}$ (modifié d'après (Ridley *et al.*, 2003)). B. Implication du canal SK3 dans la migration des cellules cancéreuses, modèle proposé. L'absence de SK3 (à gauche) confère à la cellule des capacités migratoires faibles. L'expression du canal SK3 (à gauche) favorise l'entrée de Ca^{2+} via l'hyperpolarisation de la membrane plasmique, cette entrée de Ca^{2+} induit alors un phénotype cellulaire pro-migratoire (modifié d'après (Potier *et al.*, 2006)).

Le cytosquelette d'actine est essentiel lors de la migration, son cycle de polymérisation/dépolymérisation est dépendant de la $[Ca^{2+}]_{int}$, dont on observe un gradient de concentration en fonction de la polarité cellulaire. En effet, la $[Ca^{2+}]_{int}$ est plus importante à l'arrière de la cellule, et décroît plus on s'approche du front de migration. Les SK_{Ca} , s'ils étaient exprimés à l'arrière de la cellule, permettraient d'augmenter l'entrée de Ca^{2+} en hyperpolarisant la membrane cellulaire, et donc favoriseraient la dépolymérisation de l'actine et le turn-over des intégrines, facilitant ainsi la rétraction de l'arrière de la cellule et donc, la migration (Potier *et al.*, 2006). Les travaux de notre équipe de recherche montrent que l'hyperpolarisation induite par SK3 serait responsable de la migration des cellules cancéreuses, en entraînant une entrée calcique via des canaux calciques voltages indépendants (figure 17B). Or, il a été démontré que le canal SK3 était exprimé à l'avant des cellules neuronales progénitrices (Liebau *et al.*, 2007), ce qui semble contradictoire avec le

gradient de Ca^{2+} . Il serait intéressant d'étudier la localisation précise de ce canal dans les cellules cancéreuses.

1.2.5. Rôle de SK3 dans le développement de métastases osseuses

Le rôle des canaux K^+ dans le développement de métastases osseuses n'est pas connu. Suite aux travaux ayant démontré une implication du canal SK3 dans la migration des cellules cancéreuses, l'équipe a entrepris d'étudier le rôle de SK3 dans le développement de métastases en développant un modèle murin de cancer du sein métastatique. Ainsi, des xénogreffes de cellules cancéreuses humaines du sein (MDA-MB-435s) ont été réalisées dans le bourgeon mammaire excisé de souris nudes NMRI. Ces souris athymiques ont un système immunitaire très pauvre en lymphocytes T, ce qui permet de s'affranchir d'une réponse immunitaire de l'hôte qui pourrait perturber la prise de la greffe de cellules humaines. Cette greffe donne par la suite une tumeur primaire, puis des métastases qui sont observables après plusieurs semaines d'expérimentation. Les cellules greffées possèdent ou non le canal SK3 et seront donc nommées SK3+ et SK3- dans notre exposé. L'expérimentation a été réalisée au laboratoire Inserm U892 de Nantes, par le Dr Séverine Marionneau-Lambot et Thibault Ouiller. Dans ce cadre, j'ai pu participer à la détection des métastases par bioluminescence *post-mortem*. Les résultats que nous allons présenter ici sont publiés dans l'article suivant : **Pivotal role of the lipid raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases.** Aurélie Chantôme, Marie Potier-Cartereau, **Lucie Clarysse**, *et al*, 2013.

Cette étude montre que l'expression de SK3 n'a pas d'effet ni sur la prolifération des cellules MDA-MB-435s (*in vitro*) ni sur la croissance de la tumeur primaire (Figure 18). Les souris greffées avec les cellules SK3+ forment plus de métastases osseuses, que les souris greffées avec les cellules SK3- (Figure 18). Ceci indique une implication du canal dans la formation de métastases osseuses. Une différence non significative est observée dans l'établissement de métastases pulmonaires (non présentées ici).

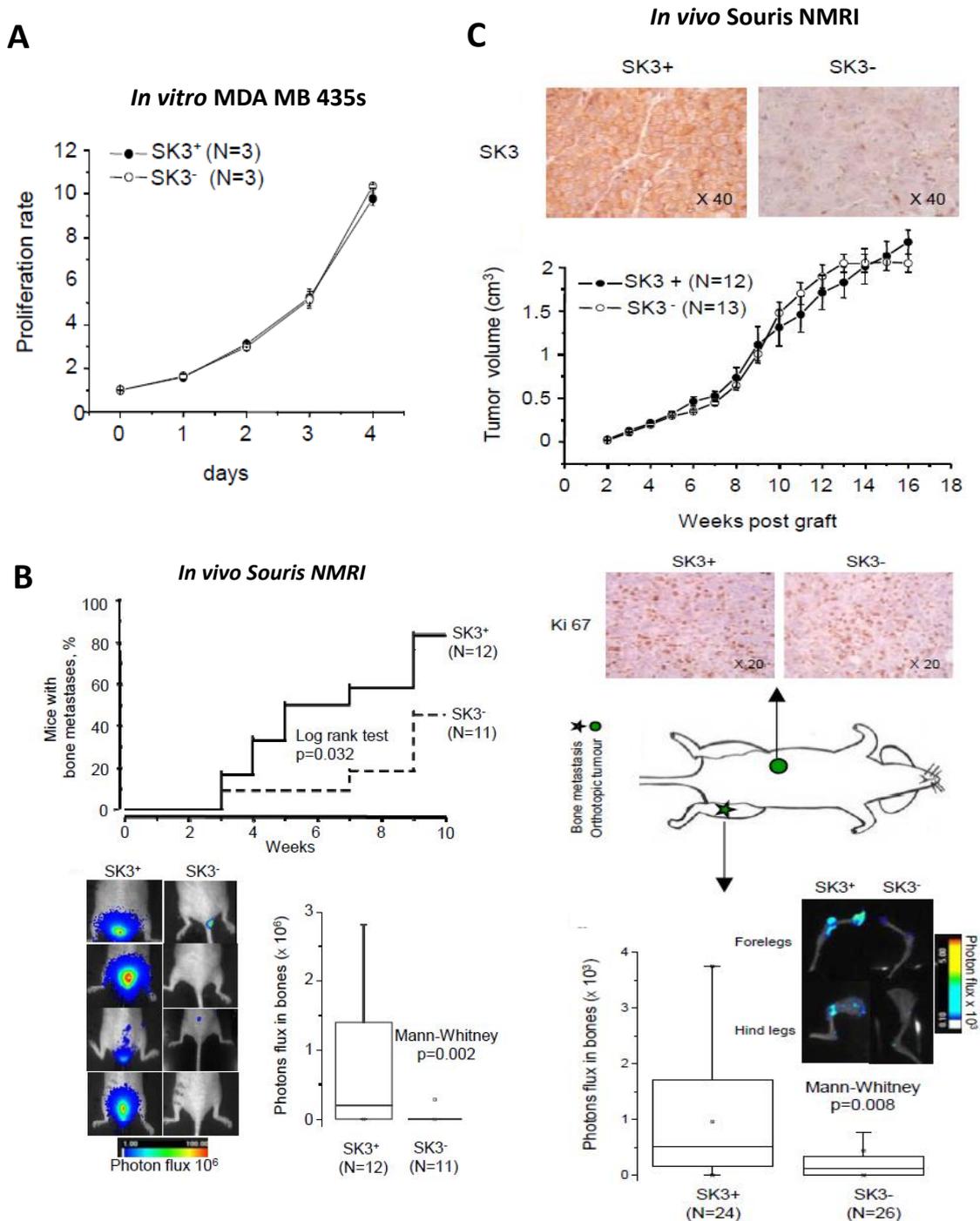


Figure 18. Le développement de métastases osseuses est dépendant du canal SK3. A. L'expression ou non de SK3 n'a pas d'effet sur la prolifération (*in vitro*, cellules MDA-MB-435s, à gauche) ni sur la croissance de la tumeur primaire (C., *in vivo*, souris NMRI). B. les cellules injectées dans la veine caudale (modèle IV) possédant le canal SK3 forment des métastases osseuses, ce qui réduit dans le cas des cellules SK3-. C. Les souris xéno greffées avec des cellules SK3+ présentent des métastases osseuses, ce qui est réduit chez les souris xéno greffées avec les cellules SK3- (Chantôme *et al.*, 2013).

Les métastases osseuses observées chez l'homme dans le cadre d'un cancer du sein sont généralement ostéolytiques, comme nous avons pu le voir précédemment (partie 1. **Généralités sur les métastases**). C'est le cas également chez la souris, dans ce modèle de

métastases expérimentales, puisqu'une analyse des os *ex vivo* montre une lyse osseuse chez les souris ayant été greffées avec les cellules SK3+ (figure 19A.).

Ces métastases osseuses ostéolytiques libèrent des facteurs du microenvironnement osseux, tels que du Ca^{2+} . Ce Ca^{2+} va favoriser l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ soit indirectement en stimulant le CaSR, soit en favorisant l'entrée de Ca^{2+} *via* les canaux Ca^{2+} . Ici, il a été question d'étudier cette voie impliquant les canaux Ca^{2+} . Nous avons voulu savoir si l'entrée calcique était perturbée en l'absence du canal SK3 *in vitro*. Les résultats sont présentés sur la figure 19B. On observe une diminution de l'entrée calcique en absence du canal SK3. Ce dernier, en hyperpolarisant la membrane plasmique, entraîne une augmentation de la FEM en faveur de l'entrée calcique.

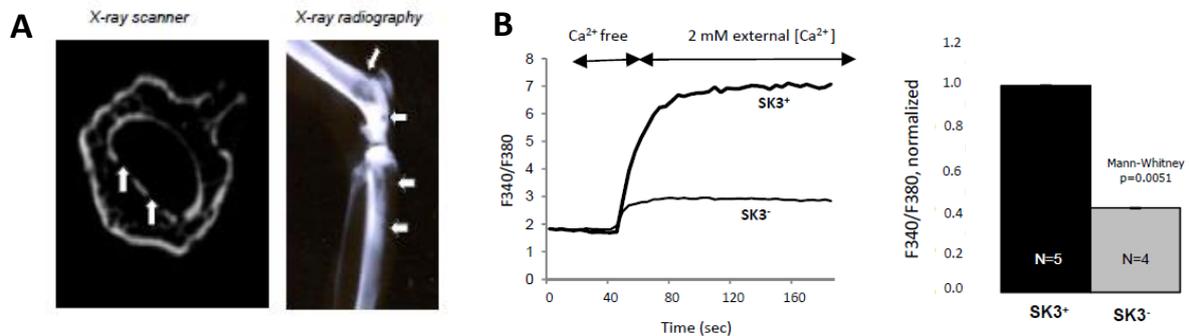


Figure 19. Métastases ostéolytiques et implication du canal SK3 dans l'entrée calcique. A. Clichés obtenus par scanner et radiologie des os de souris, présentant une lyse osseuse au niveau des os longs (droite) et des vertèbres (gauche). B. La suppression de SK3 réduit de 60 % l'entrée de Ca^{2+} constitutive (Chantôme *et al.*, 2013).

Afin d'identifier les canaux calciques impliqués dans cette entrée de Ca^{2+} , nous avons eu recours à des techniques de biologie moléculaire. Nous avons étudié l'implication du canal Orai 1, qui est impliqué dans la migration d'autres cellules cancéreuses de sein *in vitro*, les cellules MDA-MB-231 et le développement de métastases pulmonaires (Yang *et al.*, 2009). Le canal Orai 1 est un canal formé d'un tétramère de sous-unités α , composées chacune de 6 segments transmembranaires. C'est un canal indépendant du voltage dont l'activité la plus connue est l'entrée de Ca^{2+} dépendante de la vidange du RE pour laquelle Orai 1 est associé à la protéine réticulaire STIM1. L'extinction de la protéine Orai 1 par siRNA a permis de montrer que ce canal calcique était impliqué dans : i) la migration dépendante de SK3 (figure 20A) et ii) dans l'entrée de Ca^{2+} dépendante de SK3 (figure 20B). Orai 1 est donc un partenaire fonctionnel de SK3, et ce complexe Orai1-SK3 régule la migration de cellules cancéreuses de sein. En effet, ces deux protéines sont colocalisées dans des portions

de membranes riches en cholestérol, appelées rafts ou radeaux lipidiques, *in vitro* (images non présentées ici). Cette colocalisation est retrouvée dans les tissus humains de cancer du sein et de prostate ce qui permet de penser que ces deux protéines interagissent également *in vivo* et participent ainsi au développement métastatique (Chantôme *et al.*, 2013). L'utilisation d'un siSTIM1 montre que ce senseur calcique transmembranaire n'est pas impliqué dans le mécanisme que nous étudions ici, contrairement à ce qui a été montré pour les métastases pulmonaires issues d'un cancer du sein (Yang *et al.*, 2009). Il s'agit donc ici d'une entrée constitutive de Ca^{2+} .

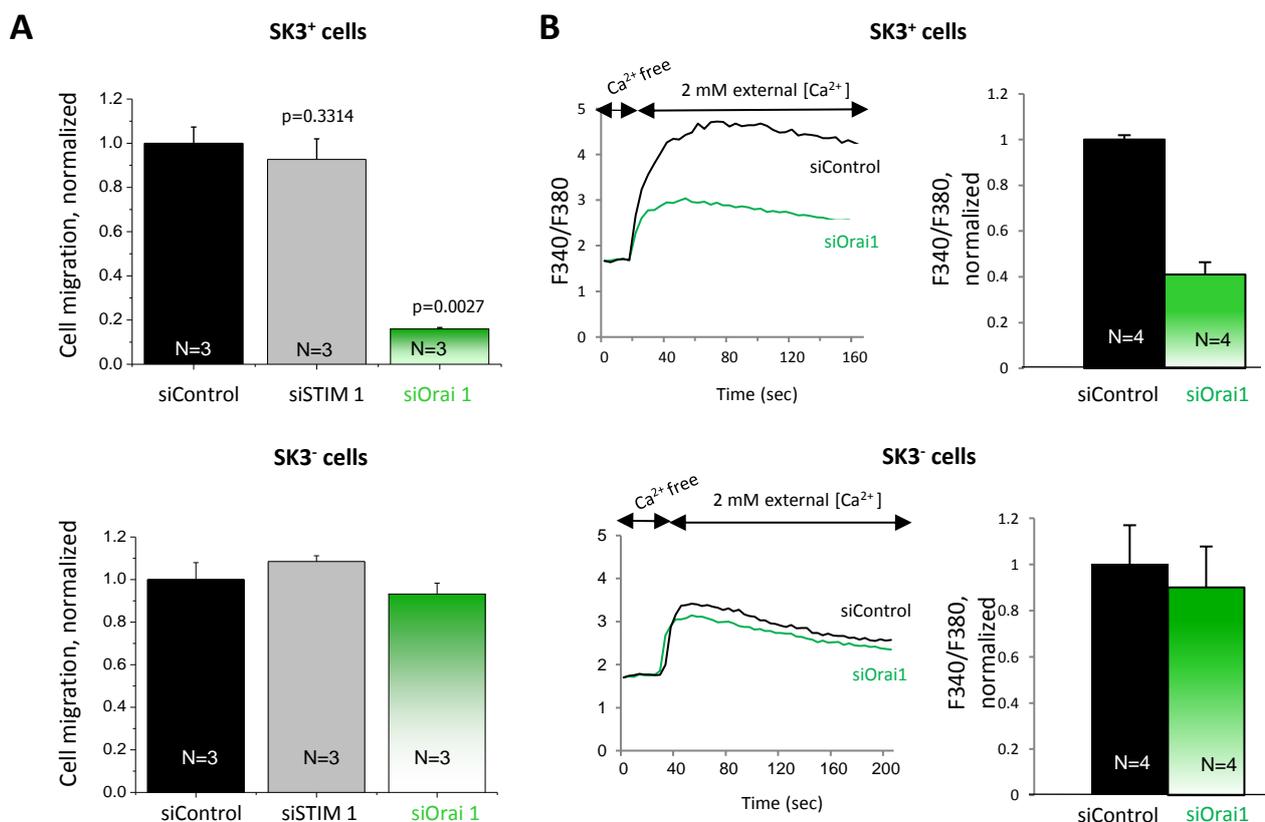


Figure 20. Coopération fonctionnelle d'Orai 1 et de SK3 dans la migration et l'entrée calcique dépendantes du canal SK3. A. L'extinction d'Orai 1 entraîne une diminution de 80 % de la migration dans les cellules SK3+, et n'a pas d'effet sur la migration des cellules SK3-. B. De même, l'inhibition d'Orai 1 entraîne une diminution de l'entrée calcique de 60 % dans les cellules SK3+ exclusivement (Chantôme *et al.*, 2013). Le siSTIM1 n'a pas d'effet sur la migration cellulaire des cellules MDA-MB-435s.

Les canaux Orai 1 et SK3 sont donc intimement liés (Figure 21). De manière intéressante, lorsque l'on compare les cellules SK3+ et SK3-, on observe qu'Orai 1 est localisé dans les radeaux lipidiques, qui sont des zones de la membrane plasmique riches en cholestérol et en cavéoline 1, seulement dans les cellules possédant SK3. Ceci sous-entend que c'est l'expression du canal SK3 qui déplace Orai1 vers les radeaux. Ainsi, l'absence de

SK3 est associée à une expression d'Orai 1 hors des radeaux lipidiques et une absence de migration cellulaire dépendante d'Orai 1. L'expression de SK3 lors des stades avancés du cancer mènerait à la colocalisation des deux canaux au sein des radeaux lipidiques, et l'entrée de Ca^{2+} favoriserait l'activité de SK3, qui à son tour, en hyperpolarisant la membrane, activerait l'entrée calcique *via* Orai 1. Dans le cadre des métastases osseuses, la libération de Ca^{2+} extracellulaire par l'ostéolyse viendrait alors alimenter le système et favoriser la coopération du complexe Orai1/SK3.

Toutes ces études montrent l'importance de SK3 dans l'établissement de métastases osseuses. Il est donc nécessaire d'étudier les mécanismes à l'origine de l'expression de SK3 et favorisant l'activité de ce canal par les cellules cancéreuses de sein, lors de l'arrivée des cellules dans le microenvironnement osseux. Nous émettons l'hypothèse que SK3 puisse constituer l'un des gènes de la virulence métastatique décrits par l'équipe de Massagué et coll, puisqu'il serait impliqué dans la colonisation spécifique d'un tissu, en l'occurrence l'os, par les métastases (Kang *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2007).

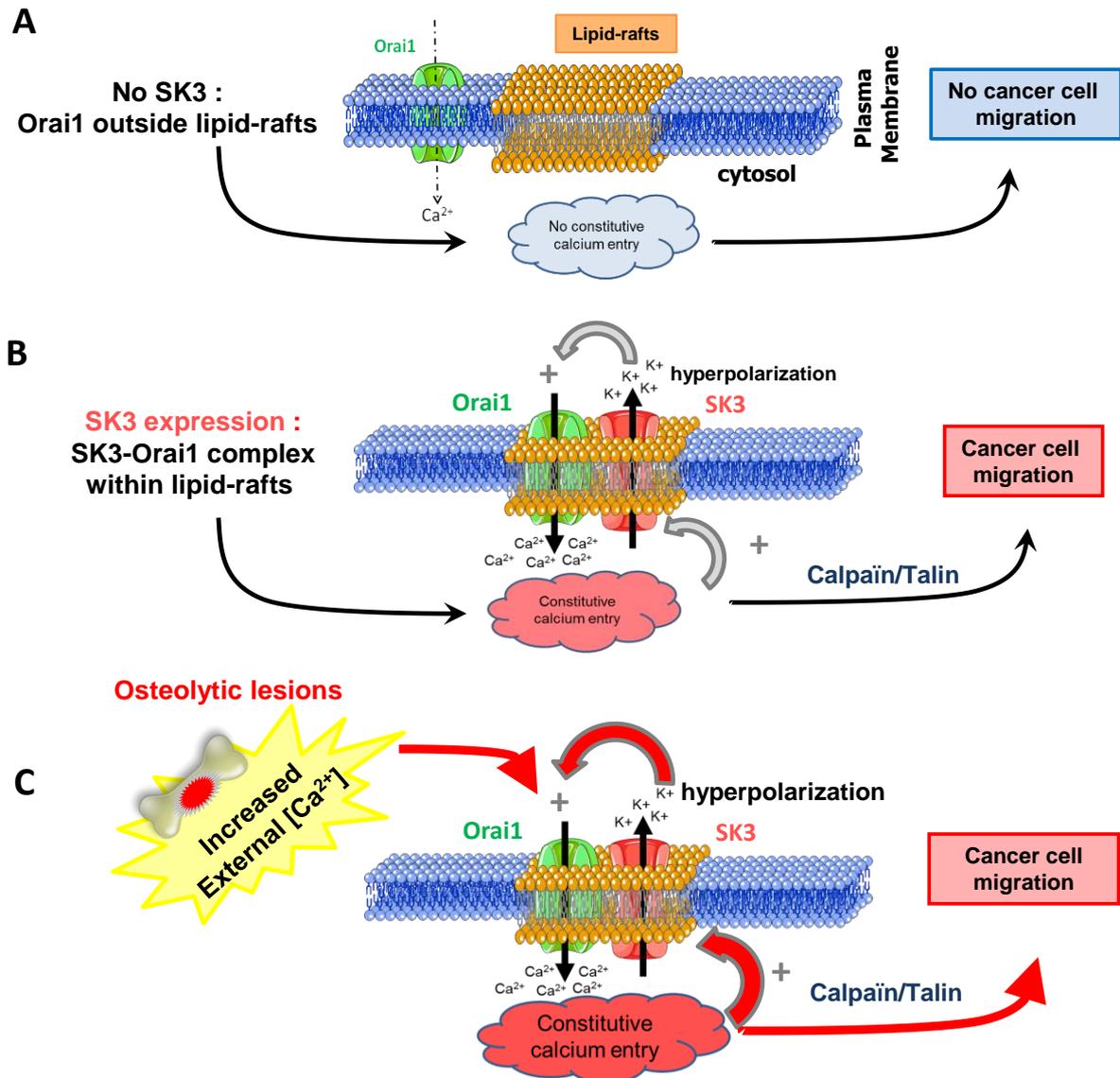


Figure 21. Modèle hypothétique de l'implication du complexe Orai 1/ SK3 dans la migration cellulaire et la colonisation du tissu osseux. A. Orai 1 est exprimé à la membrane hors des radeaux lipidiques en absence de SK3, ce qui entraîne une absence de migration cellulaire dépendante d'Orai1. B. Les cellules cancéreuses de sein expriment le canal SK3 et Orai 1 au niveau des radeaux lipidiques ce qui favorise l'entrée constitutive de Ca²⁺ et la migration cellulaire. C. Lorsque les cellules cancéreuses de sein se retrouvent dans la niche osseuse ostéolytique, la [Ca²⁺]_{ext} augmente, ce qui alimente cette coopération fonctionnelle d'Orai 1 et SK3, et accentue la migration cellulaire et l'entrée de Ca²⁺, conduisant à la colonisation du tissu osseux par les métastases (Chantôme *et al.*, 2013).

1.3. Rôle de l'AMPC dans le développement métastatique

1.3.1. Généralités

Dans cette partie, nous allons décrire les acteurs impliqués dans la voie AMPc. Les rôles de ces acteurs dans le cancer et la régulation des canaux K_{Ca} seront abordés plus tard, dans les **parties 1.3.2 et 1.3.3**). Nous avons vu dans la **partie 1.1.3**. (Implication du CaSR dans le développement métastatique) que le CaSR était capable de diminuer la $[AMPc]_{int}$ en réduisant l'activité de l'adénylate cyclase (AC) suite à l'activation de la protéine $G_{\alpha i}$. Il est donc nécessaire de décrire la cascade de signalisation impliquant l'AMPc dans son ensemble, en permettant une meilleure compréhension des résultats obtenus lors de ce travail de thèse. L'AMPc a été découvert par Donald Sutherland, ce qui lui a valu le prix Nobel de médecine en 1971. Ce médiateur est impliqué dans de nombreux processus physiologiques, au titre de second messenger (Hofer *et al.*, 2007).

a) Régulation de la $[AMPc]_{int}$: balance entre les activités de l'adénylate cyclase et des phosphodiésterases

Il existe un équilibre de la $[AMPc]_{int}$ grâce à la présence de l'activité de deux enzymes dont les effets sont opposés. L'AC produit l'AMPc en réponse à l'activation par les protéines G hétérotrimériques, et les phosphodiésterases (PDEs) hydrolysent l'AMPc en 5' AMP ce qui entraîne sa dégradation. Il existe un équilibre entre les activités de ces deux enzymes, qui est en faveur de celle des PDEs, ce qui permet de maintenir un niveau d'AMPc relativement bas dans les cellules (Hofer, 2012).

L'AC est une enzyme permettant de produire de l'AMPc à partir d'ATP, en libérant également du pyrophosphate (PPi), on parle d'une pyrophosphate lyase. Il existe dix isoformes d'AC décrites, parmi lesquels neuf sont transmembranaires (appelées tmAC1 à tmAC9), et l'AC10, elle, est considérée comme soluble (appelée sAC) (Sadana *et al.*, 2009). Nous allons nous focaliser sur les formes transmembranaires, qui nous intéressent ici. Elles sont constituées d'un segment N terminal intracellulaire, suivi de deux domaines transmembranaires appelés TM1 et TM2, eux-mêmes constitués de six hélices α , puis de

deux domaines C intracytoplasmiques (C1 reliant TM1 à TM2 et C2 (C-term)). Ces domaines C sont constitués de deux sous-domaines chacun : C1a, C1b, C2a et C2b (Figure 22A). Cette structure est proche de celle des transporteurs de la famille ABC (ATP Binding Cassette), qui permettent le transport de nombreuses molécules en utilisant l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP (Sadana *et al.*, 2009). L'AC est une molécule pseudo-symétrique, du fait que les domaines C1a et C2a aient une structure tertiaire identique, qui vont s'associer l'un en face de l'autre afin de former une sorte de couronne ou de poche, au sein de laquelle on retrouve le site catalytique de l'enzyme (Figure 22B). La moindre perturbation de cette interaction entre les deux domaines C de l'AC entraîne une perte d'activité, en changeant la structure du site actif et en diminuant ainsi l'affinité de l'ATP pour l'AC (Hurley, 1999).

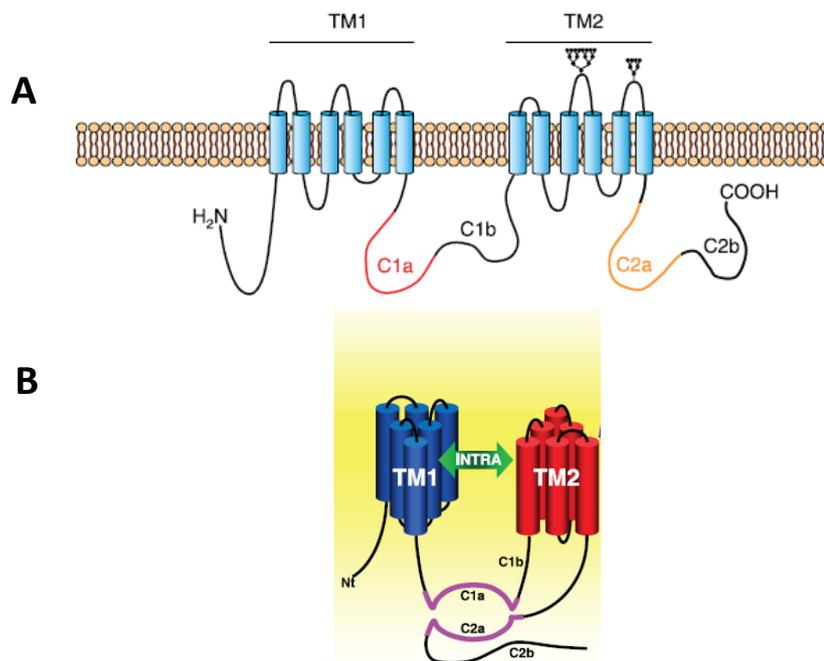


Figure 22. Structure générale des ACs transmembranaires. A. Les deux domaines transmembranaires TM1 et TM2 permettent l'ancrage membranaire de l'enzyme alors que les domaines C1 et C2 forment la sous-unité catalytique de l'enzyme. B. Les deux domaines TM1 et TM2 s'associent par interaction intramoléculaire entre le domaine C1a et le domaine C2a pour former l'enzyme active grâce à ce changement conformationnel. Une dimérisation entre les deux domaines TM2 d'AC différentes est également possible (Intermoléculaire) (Modifié d'après (Willoughby *et al.*, 2007)).

Il existe 4 groupes fonctionnels d'AC, qui sont exprimées dans des tissus différents et sont régulées principalement par les protéines $G_{\alpha s}$ et $G_{\alpha i}$. Néanmoins, elles peuvent aussi être régulées par le complexe Ca^{2+}/CaM (cas des AC1 ; 8 et 3), ou la PKC et la PKA (AC5 et 6). Elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques. Par exemple, l'AC1 et l'AC8 sont impliquées dans la mémoire et l'apprentissage au niveau de l'hippocampe, l'AC3 est impliquée dans l'olfaction au niveau de l'épithélium olfactif, et les AC5 et 6 sont exprimées dans les cellules cardiaques où elles régulent la contractilité cardiaque (Sadana *et al.*, 2009). Toutes les isoformes de tmAC, exceptée l'AC9, sont activées par une molécule de synthèse, la forskoline, qui se fixe dans la poche entre C1 et C2, face au site actif, et entraîne une production d'AMPc importante. Elle favorise l'interaction de ces deux domaines C1 et C2, du fait de sa composition hydrophobe, et entraîne ainsi une activation de l'AC (Hurley, 1999).

Le maintien d'une $[AMPc]_{int}$ faible dans la cellule suite à la synthèse d'AMPc par l'AC est permis grâce à l'activité des PDEs. Ces enzymes permettent en effet l'hydrolyse de l'AMPc en 5'AMP, et donc sa dégradation, qui est très rapide, parfois plus rapide que la synthèse d'AMPc par les AC (Figure 23 ; (Hofer, 2012)). Il existe de nombreuses isoformes de ces PDEs puisque 21 gènes sont connus dans le génome humain comme codant pour ces PDEs (Conti *et al.*, 2007). Les PDE de classe I, sont divisées en 11 familles, appelées PDE1 à PDE 11, et parmi chacune de ces familles, on retrouve plusieurs isoformes (ex : PDE4A, PDE4B...) (Figure 23). Il existe également des PDE de classe II, qui sont moins caractérisées et peu étudiées (Bender *et al.*, 2006). Parmi les familles de PDEs, les PDEs 4 ; 7 et 8 sont spécifiques de l'AMPc, et les autres sont soit spécifiques du GMPc (Guanine MonoPhosphate cyclique) (PDE 5 ; 6 et 9) ou de l'AMPc et du GMPc (PDE 1 ; 2 ; 3 ; 10 et 11). Ces isoformes ont des structures variées mais possèdent une architecture commune (Figure 23). La première PDE dont la structure a été identifiée est la PDE4B, et elles sont toutes composées de deux domaines : un domaine catalytique constitué de 16 hélices α qui s'arrangent en 3 sous-domaines formant la poche contenant le site actif de l'enzyme, et un domaine régulateur permettant la dimérisation de l'enzyme. Cette dimérisation n'a pas encore été démontrée clairement mais de nombreuses équipes supposent son existence, ainsi qu'une oligomérisation possible (Conti *et al.*, 2007). La reconnaissance de l'AMPc se fait via une glutamine invariable dans toutes les isoformes spécifiques de l'AMPc, qui est située dans le

site actif, et qui possède une orientation spécifique permettant cette liaison. La moindre perturbation de cette orientation entrainerait une perte de reconnaissance de ce substrat par les PDEs. L'AMPC interagit avec les 16 hélices α composant le domaine catalytique, par des liaisons hydrogènes entre le ribose et le phosphate cyclique de l'AMPC (Conti *et al.*, 2007).

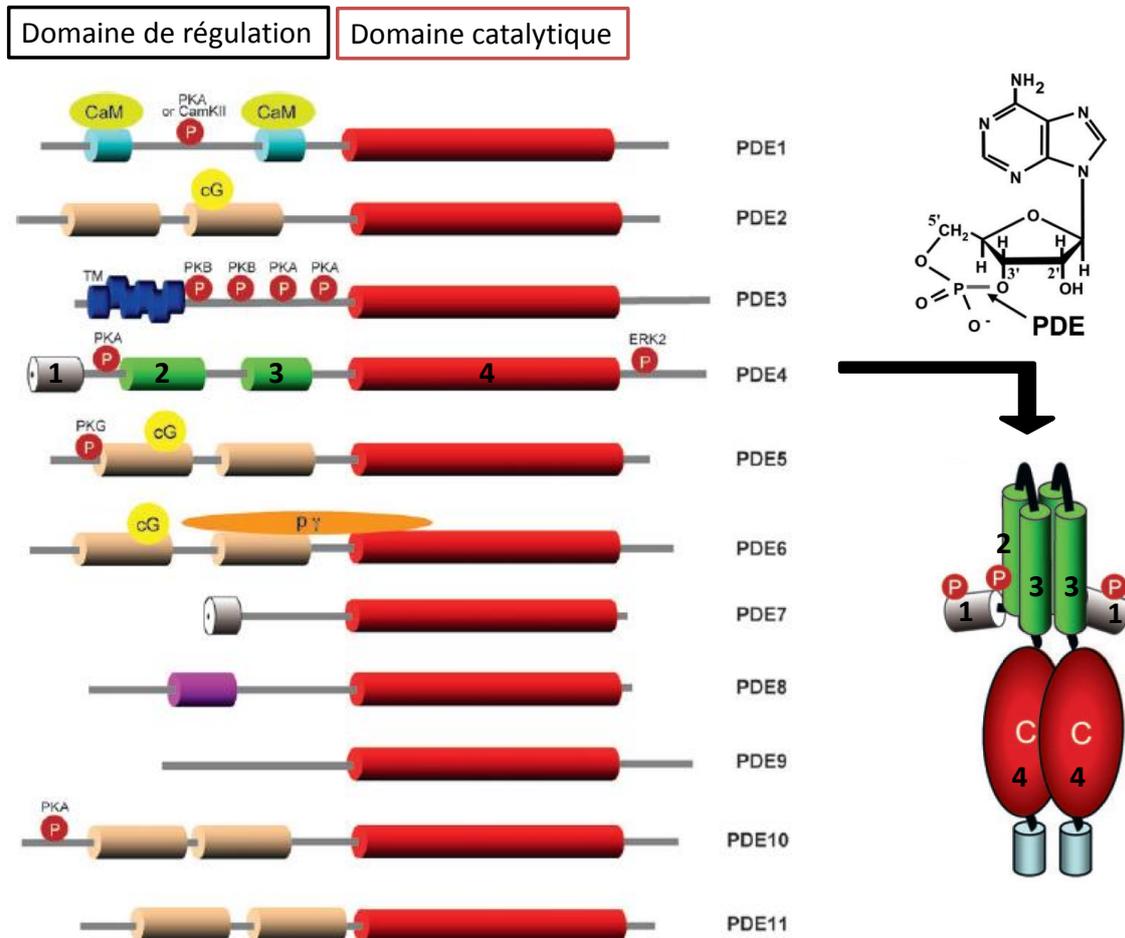


Figure 23. Structure des différentes familles de PDEs. A gauche, les différences et similarités de structures des 11 familles de PDEs de classe I. Les domaines de régulation (situés sur la gauche du schéma) sont très variables (sites de dimérisation, de phosphorylation par les kinases etc...) alors que le domaine catalytique est identique (en rouge). A droite, schéma représentant un dimère de PDE4B (modifié d'après (Conti *et al.*, 2007)). Le site d'hydrolyse de l'AMPC en 5'-AMP par les PDEs est présenté en haut à droite (D'après (Bender *et al.*, 2006)).

Il y a donc un maintien d'une $[AMPC]_{int}$ faible dans les cellules, résultant d'un équilibre entre la production d'AMPC par les AC, et sa dégradation par les PDEs, en faveur de cette dernière. Les types cellulaires expriment différentes isoformes ou familles de ces deux enzymes, ce qui contribue à engendrer des voies de signalisation différentielles, spécifiques d'un type cellulaire donné. Le niveau d'AMPC intracellulaire contrôle ensuite différents effecteurs, en particulier la protéine kinase dépendante de l'AMPC, la PKA.

b) La protéine kinase dépendante de l'AMPc : la PKA

La PKA est une des kinases les plus étudiée et les plus connues du fait de son implication dans de nombreuses voies de signalisation clés pour la physiologie humaine, telles que les voies responsables du couplage excitation-contraction cardiaque. Elle représente l'effecteur classique de l'AMPc, et on dénombre plus de 150 protéines connues pour être la cible d'une phosphorylation par la PKA. Si l'on se réfère à la séquence correspondant au site de phosphorylation par cette enzyme, il pourrait y avoir quelques milliers de cibles potentielles de la PKA (Hofer, 2012). Cette enzyme est constituée d'un tétramère de deux sous-unités catalytiques (C) et de deux sous-unités régulatrices (R). Il existe deux types d'enzymes (PKA I et PKA II) constituées de deux sous-unités C identiques (au choix parmi C α , C β ou C γ), et de deux sous-unités R différentes (RI (α ou β) ou RII (α ou β) respectivement) (Neary *et al.*, 2004). A l'état inactif, les sous-unités R et C sont associées. En présence de 4 molécules d'AMPc qui se fixent à raison de 2 AMPc par sous-unité R, les sous-unités C se dissocient des sous-unités R. Plus précisément, en se fixant, l'AMPc entraîne un changement conformationnel des sous-unités régulatrices, à l'origine de cette dissociation. Les deux sous-unités catalytiques vont ensuite fixer l'ATP, et devenir actives (Naviglio *et al.*, 2010) (Figure 24).

Elles vont phosphoryler des sérines et thréonines présentes sur les protéines cibles en utilisant l'hydrolyse de l'ATP auquel elles sont associées. La PKA est associée à des protéines d'ancrage spécifiques, appelées AKAP (A-Kinase Anchorage Protein), qui permettent son ancrage à la membrane plasmique ou à celle des organites, en fonction du lieu de recrutement nécessaire de cette kinase. Par ailleurs, la PKA peut phosphoryler les PDEs, les rendant actives, et ainsi entraîner un rétrocontrôle négatif permettant d'éteindre le signal AMPc intracellulaire (Rochais *et al.*, 2004).

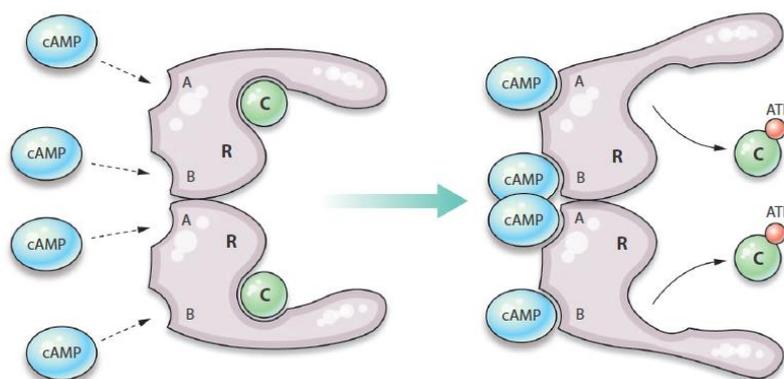


Figure 24. Schéma représentant l'activation de la PKA par l'AMPc. Le tétramère constituant la PKA est à l'état inactif en absence d'AMPc (à gauche). La fixation de deux AMPc (en bleu) sur les sites A et B de la sous-unité régulatrice (en violet) entraîne un changement de conformation de l'enzyme, entraînant une libération des sous-unités catalytiques (en vert), qui se lient alors à l'ATP et vont phosphoryler les protéines cibles (d'après (Murray, 2008)).

La PKA n'est pas le seul effecteur de l'AMPc, il peut également activer une autre kinase, l'AMPK (AMP activated Protein Kinase), le facteur d'échange dépendant de l'AMPc (ou Epac : Exchange protein activated directly by cAMP) ou encore certains canaux ioniques directement activés par les nucléotides (CNG : Cyclic Nucleotides Gated channels).

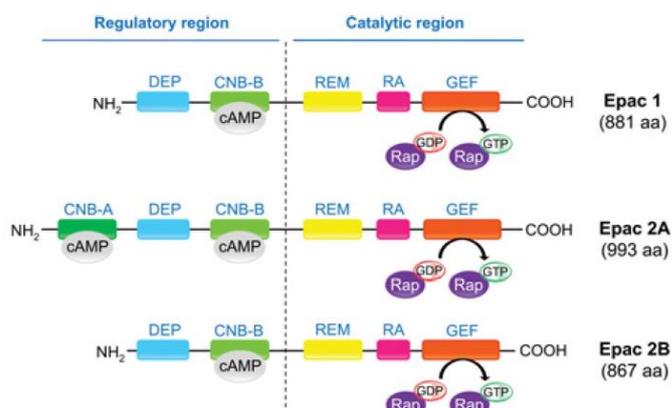
c) Autres effecteurs de l'AMPc :

Un des effecteurs important de l'AMPc est l'Epac, un facteur d'échange découvert plus récemment que la PKA, en 2003 par l'équipe de Bos et coll. (Holz *et al.*, 2006). L'Epac appartient à la famille des facteurs d'échange de guanine régulés par l'AMPc. Il existe trois variants de cette protéine d'échange, Epac1, Epac2A et Epac2B. Cette protéine permet de coupler l'AMPc à l'activité d'une petite protéine G soluble, la GTPase de la famille Rap (Holz *et al.*, 2006).

Epac est constitué d'un domaine régulateur N term et d'une région catalytique C term (Figure 25). Le premier permet la reconnaissance ainsi que la liaison à l'AMPc et la seconde est le siège de l'activité d'échange guanidique proprement dit. Cette région catalytique permet d'échanger un GDP contre un GTP sur Rap, et de rendre cette GTPase active. Le domaine régulateur possède un domaine DEP (Dishevelled, Egl 10 et Pleckstrin) permettant son ancrage membranaire ainsi qu'un domaine de reconnaissance de l'AMPc également impliqué dans la localisation d'Epac sur la membrane plasmique. La région catalytique est constituée de trois domaines : un domaine GEF constitué du site d'échange du GDP en GTP, un domaine de fixation de Ras (RA ou Ras Association) ainsi qu'un domaine appelé REM (Ras exchange motif) et permettant de stabiliser la liaison entre Epac et Ras

(Holz *et al.*, 2006). Epac est impliqué dans de nombreuses voies de régulation physiologiques. En effet, il régule l'adhésion cellulaire (via les intégrines), l'exocytose neuronale, la modulation de plusieurs canaux ioniques tels que le K_{ATP} , le remodelage du cytosquelette, la migration, la prolifération et la différenciation cellulaires ou encore la contraction musculaire (Grandoch *et al.*, 2010; Roscioni *et al.*, 2008). Les trois variants d'Epac ont des localisations tissulaires et des fonctions cellulaires différentes. Ainsi, Epac1 est exprimé dans le cerveau, le cœur, le rein et le pancréas ; alors que Epac2A et 2B sont moins ubiquitaires et exprimés dans le cerveau et le foie principalement (Holz *et al.*, 2006). Ces trois variants ont des affinités différentes pour l'AMPc : Epac1 et 2B possèdent un seul site de fixation de l'AMPc dont la constante de dissociation (K_d) est d'environ 3 μ M tandis qu'Epac2B possède deux sites, un dont le K_d est de 87 μ M (faible affinité) et l'autre dont le K_d est de 1.2 μ M (affinité forte) (Holz *et al.*, 2006) (Figure 25).

Figure 25. Schéma représentant la structure des isoformes d'Epac. Epac est constitué de deux domaines : un domaine catalytique permettant le transfert d'un GTP en échange d'un GDP sur la protéine G soluble Rap (à droite) et un domaine régulateur permettant la fixation de l'AMPc (à gauche) (D'après (Laurent *et al.*, 2012)).



En absence d'AMPc, la fonction d'échange de guanine est inhibée dans la région catalytique. Lorsque l'AMPc se fixe sur le motif Pro-Arg-Ala-Ala (ou PRAA) de la région régulatrice, Epac change de conformation et on observe une levée d'inhibition d'Epac qui peut alors exercer son activité de facteur d'échange. En effet, l'AMPc permet le détachement du domaine d'autoinhibition situé dans la région régulatrice, et entraîne une translocation d'Epac du cytoplasme à la membrane (Grandoch *et al.*, 2010).

Il existe également des effecteurs indirects de l'AMPc qui sont les canaux ioniques modulés par l'AMPc, et l'AMPK. Ces effecteurs n'ayant pas été étudiés dans ce travail de

thèse, nous nous sommes contentés de décrire succinctement leur structure ainsi que leur importance physiologique ici.

L'AMPK est une kinase très importante dans la régulation de la balance énergétique cellulaire. En effet, elle permet la phosphorylation de nombreuses cibles permettant de diminuer l'anabolisme de l'ATP et d'augmenter le catabolisme de ce dernier. Elle est constituée d'un hétérotrimère d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ . Il existe 12 hétérotétramères décrits chez les mammifères puisqu'on dénombre deux isoformes de sous-unités α et β et trois isoformes de sous-unité γ (Bijland *et al.*, 2013). Cette kinase ne reconnaît pas l'AMP sous sa forme cyclique telle que nous l'avons étudié ici, mais la forme non cyclisée ou 5' AMP, après action des PDEs. L'équipe de Xiao *et coll.* a cristallisé l'interaction entre l'AMP et l'AMPK et ont mis en évidence une compétition entre la fixation de l'ATP et de l'AMP sur le fragment régulateur de la sous-unité γ de cette kinase (Xiao *et al.*, 2007). Cette kinase dépendante de l'AMP représente donc une jauge d'énergie cellulaire.

L'autre cible de l'AMPc qui pourrait avoir son importance dans notre étude est représentée par les canaux ioniques modulés directement par l'AMPc. Il existe deux classes majeures de canaux modulés par l'AMPc, les canaux directement activés par les nucléotides cycliques ou CNG (Cyclic Nucleotides gated Channels) et les canaux activés par l'hyperpolarisation et modulés par les nucléotides cycliques (HCN) (Hofmann *et al.*, 2005). Les canaux CNG sont activés par les nucléotides et ont des conductances ioniques variables et ne sont pas sélectifs d'une espèce ionique donnée. Ils sont constitués de tétramères de sous-unités α formant le pore et de sous-unités β régulatrices. L'activité de ces canaux, est proportionnelle à la $[AMPc]_{int}$, ce qui en fait de bons outils, en particulier les canaux CNG, pour étudier *in vitro* les variations de cette $[AMPc]_{int}$ (Rochais *et al.*, 2004). Ces canaux sont plus sensibles au GMPc qu'à l'AMPc et sont inactivés par l'élévation de $[Ca^{2+}]_{int}$. En effet, le Ca^{2+} se fixe sur la CaM présente sur le domaine C term intracellulaire des sous-unités α de ce canal et inactive ainsi ces canaux. Ces canaux sont activés par la dépolarisation membranaire, *via* leur sensibilité au voltage conféré par le segment S4 chargé positivement.

De même, les canaux HCN sont également constitués de 6 segments TM et sont également sensibles au voltage, mais contrairement aux CNG, ils sont activés pour des potentiels très négatifs, et s'inactivent aux potentiels positifs (Hofmann *et al.*, 2005). Les

nucléotides cycliques activent directement les canaux HCN en déplaçant leur courbe d'activation vers les potentiels négatifs. Les canaux HCN et CNG ont donc des fonctions et des structures proches (Figure 26) mais une sensibilité au voltage différente. Ils sont exprimés principalement dans les tissus cardiaques et nerveux, où ils permettent de réguler l'excitabilité cellulaire (Benarroch, 2013). A ma connaissance, ces canaux ne sont pas exprimés par les cellules épithéliales du sein, ni par les cellules osseuses qui nous intéressent ici, c'est pourquoi nous ne nous sommes pas intéressés plus en détail à ces canaux.

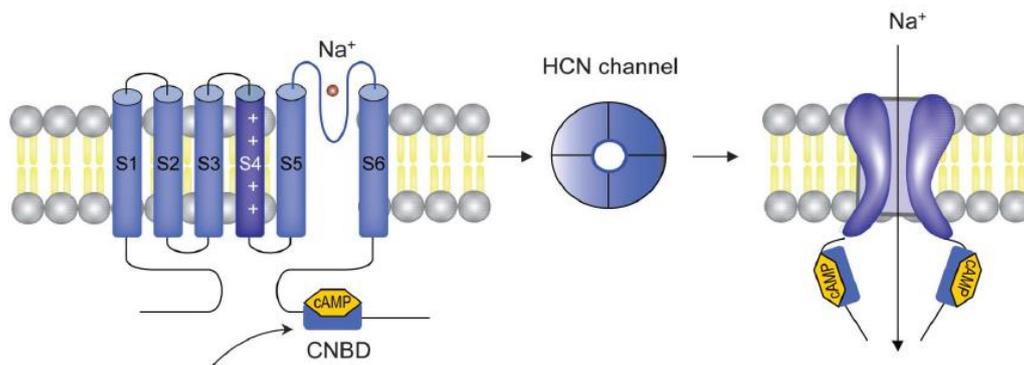


Figure 26. Schéma représentant la structure d'un canal HCN. La structure de ce canal est proche de celle des canaux CNG, avec 6 segments TM, qui forment une sous-unité α , qui en s'associant avec trois autres sous-unités α forme le canal fonctionnel assurant la sortie de K^+ et l'entrée de Na^+ (d'après (Benarroch, 2013)).

d) Régulation transcriptionnelle dépendante de l'AMPC

Nous avons vu que l'un des effecteurs principaux de l'AMPC est la PKA, et que cette protéine possède plusieurs cibles. Les cibles qui nous intéressent ici, sont des facteurs de transcription (FT) et plus précisément, les FT impliqués dans la régulation transcriptionnelle dépendante de la voie AMPC/PKA. Il existe une famille de FT regroupant les FT régulés par l'AMPC et la PKA, il s'agit de la famille CREB pour cAMP Response Element Binding protein. Ces FT de la famille CREB reconnaissent et se fixent sur l'élément de réponse CRE (cAMP Response Element) présent sur les promoteurs des protéines cibles (Macho *et al.*, 2003).

Parmi cette famille CREB, on compte 3 sous familles : CREB, CREM (CRE Modulator) et ATF 1 (Activating Transcription Factor 1) (Figure 27). Ces FT sont constitués de deux domaines : un domaine d'activation (DA) et un domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation (bZip). On observe une grande homologie de séquence de ces trois sous-familles, dans le domaine d'activation de ces FT. Les FT de la famille CREB appartiennent à la superfamille des FT bZip ou « basic leucine zipper ». En effet, leur structure permet l'interaction avec l'ADN du promoteur ciblé, via une région basique à pH neutre (riche en Arg, Lys et His). De plus, la

présence d'un domaine riche en leucine permet la dimérisation de ces FT, qui s'associent en Leucine-zipper, ou fermeture éclair de Leucines. Ce domaine bZip est donc indispensable à la fonction et la reconnaissance de l'ADN de ces FT (Macho *et al.*, 2003). Le domaine d'activation est constitué de trois domaines : deux domaines riches en glutamine (Q1 et Q2) et un domaine P-box, présentant une sérine reconnue et phosphorylable par la PKA (xRRxSx ou RxS ou RxxS). La P-box est également appelée domaine KID (Kinase Inducible domain), ou domaine inductible par la PKA (Figure 27) et c'est la domination que nous avons choisi ici pour parler ce domaine phosphorylable. Ainsi, les sérines Ser 133, Ser 117 et Ser 63 sont celles ciblées par la PKA pour CREB, CREM et ATF, respectivement.

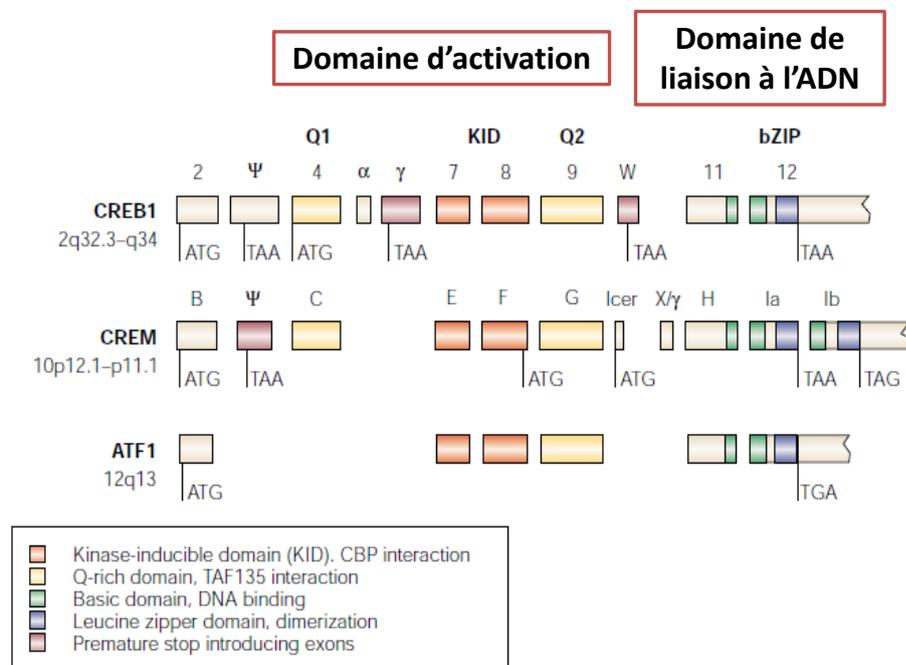


Figure 27. Schéma représentant la structure des FT appartenant à la famille CREB. Ces FT sont constitués de deux domaines, un domaine d'activation (à gauche) permettant la phosphorylation de ces FT sur le domaine KID contenant la sérine cible de la PKA, ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN (à droite) commun à tous les FT de la famille bZip (modifié d'après (Mayr *et al.*, 2001) et (Macho *et al.*, 2003)).

CREB et ATF sont des FT activateurs ubiquitaires permettent l'induction de la transcription des gènes qui sont sous leur dépendance. CREM, quant à lui est exprimé dans le tissu neuroendocrine principalement et peut être soit répresseur, soit activateur (Mayr *et al.*, 2001). La phosphorylation de CREB par la PKA entraîne une dimérisation de ce FT, son internalisation dans le noyau ainsi qu'un recrutement du complexe de pré-initiation de la transcription, représenté par des co-activateurs : la protéine CBP (CREB Binding protein), les

protéines TORC (Transducer Of Regulated CREB activity) et la protéine p300. On parle alors de transactivation par ce FT CREB (Bailey *et al.*, 2005; Siu *et al.*, 2007).

Il existe 7 isoformes de CREB décrites, issues de l'épissage alternatif, et de plus en plus d'isoformes de CREM sont identifiées. Ainsi, il existe des répresseurs (CREM α , CREM β et CREM γ) et des activateurs (CREM τ), et la différence entre l'activité de ces FT réside dans la présence ou non des domaines riches en glutamine (seul CREM τ le possède) (Molina *et al.*, 1993). Plus récemment, il a été décrit un nouveau FT, issu de la transcription du gène *CREM* mais faisant intervenir l'utilisation d'un promoteur alternatif intronique (Bailey 2005). Il s'agit d'un FT répresseur dont l'expression est inductible par l'AMPc : ICER (Inducible cAMP Early Repressor), qui a été découvert par Molina et coll. en 1993 (Molina *et al.*, 1993) (Figure 28). Les répresseurs CREM et ICER ont donc la même fonction de répression de la transcription, mais ces fonctions passent par des mécanismes différents. En effet, CREM est activé par la PKA via son DA, puis interagit avec l'ADN via son domaine bZip, alors que ICER contient seulement le domaine de fixation à l'ADN (DND : DNA Binding Domain) et va seulement se lier à l'ADN, sans activation préalable par la PKA. En effet, ICER ne contient pas le domaine KID et son activité est donc indépendante de la PKA.

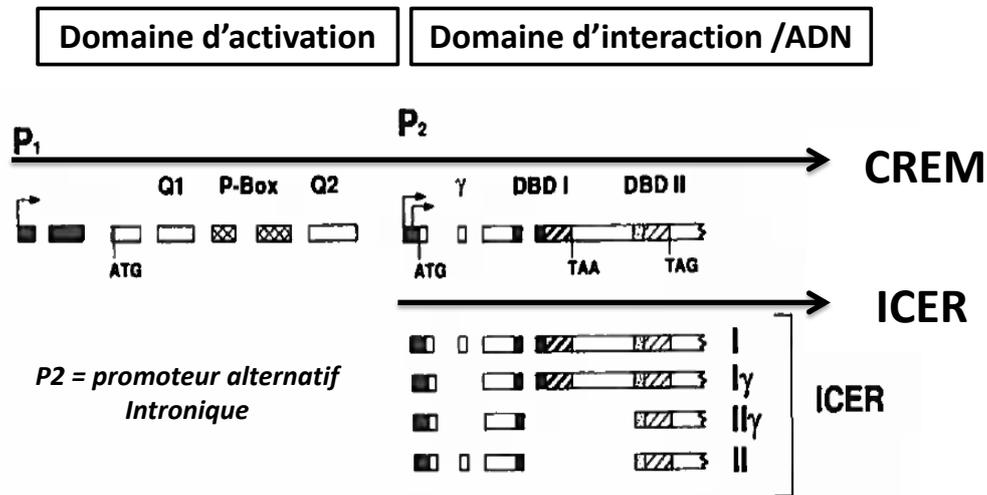


Figure 28. Représentation schématique des transcrits ICER en relation avec le gène codant pour CREM. ICER est issu de l'utilisation d'un promoteur intronique alternatif (P2), le différenciant des autres FT de la famille CREM. ICER est constitué seulement du domaine de liaison à l'ADN ou DBD contrairement à CREM qui contient en plus le domaine d'activation (KID et domaines riches en glutamines Q1 et Q2) (modifié d'après (Molina *et al.*, 1993)).

ICER est un FT répresseur qui est directement inductible par l'AMPc, c'est-à-dire que sa propre expression ne nécessite aucune synthèse d'une tierce protéine. Contrairement à CREM, qui est activé par la PKA, seule l'expression d'ICER est dépendante de la PKA, qui une

fois activée par l'AMPC, va se fixer sur le promoteur d'ICER (P2, promoteur alternatif) constitué d'une succession d'éléments de réponse CRE (4 CRE répétés en tandem, séquence appelée CARE : cAMP Autoregulatory Element). On parle de répresseur précoce (« early repressor ») du fait de cette expression rapide, induite directement par l'AMPC et la PKA. ICER inhibe la transcription dépendante de l'AMPC en se fixant sur les sites CRE de manière compétitive avec les autres FT de la famille CREB et simplement en fonction de sa concentration intracellulaire, en inhibant ainsi leur fixation sur les sites CRE. Il agit donc sans phosphorylation préalable par la PKA, à la différence de tous les autres FT de sa famille et peut dimériser avec n'importe lequel des autres FT de la famille CREB (Molina *et al.*, 1993) (Mayr *et al.*, 2001). L'ensemble des FT dépendants de l'AMPC sont présentés dans la figure 29.

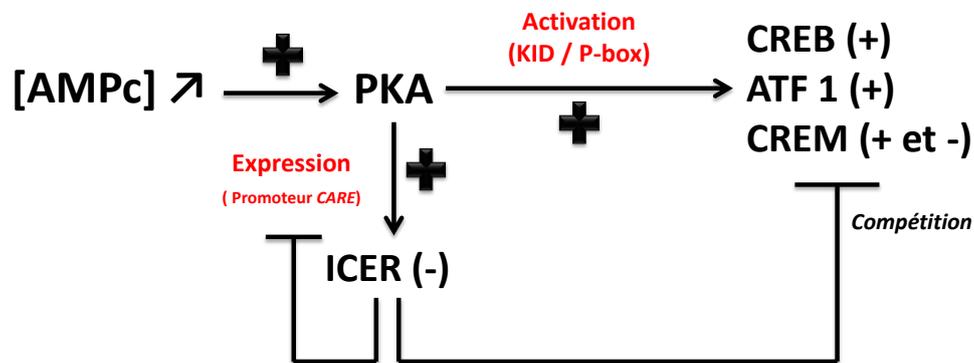


Figure 29. Résumé des différents FT impliqués dans la voie AMPC/PKA. L'élévation d'AMPC active la PKA, qui à son tour active les FT de la famille CREB (CREB, ATF1 et CREM), qui possèdent le domaine KID ou P-box, phosphorylable par la PKA. Cette kinase peut aussi induire l'expression d'un FT répresseur via son promoteur riche en éléments CRE (ou CARE), ICER, dont l'activité, elle, ne dépend pas de la PKA. ICER réprime sa propre expression, et inhibe la transcription dépendante de CREB par compétition avec les autres FT membres de cette famille CREB.

La présence d'éléments CRE dans le promoteur d'ICER permet d'avoir une boucle de rétroaction négative d'ICER sur sa propre expression. En effet, lorsque la $[AMPC]_{int}$ augmente fortement et active la PKA, ICER s'auto-réprime en se fixant sur son propre promoteur (Sands *et al.*, 2008). Ceci implique une action transitoire d'ICER, dont l'inhibition est maximale 2h après l'augmentation de la $[AMPC]_{int}$ et commence à décroître 4 h après activation (Mayr *et al.*, 2001; Sands *et al.*, 2008).

Les différents acteurs des voies de signalisation dépendante de l'AMPC sont regroupés dans la figure 30. Le fait que l'AMPC possède de multiples effecteurs et que ces mêmes effecteurs aient eux-mêmes plusieurs cibles permet d'obtenir une régulation fine et complexe de nombreux gènes et de l'activité de nombreuses protéines (Murray, 2008). Il

faut noter également l'émergence d'une idée selon laquelle il existerait une compartimentation de l'AMPC à l'intérieur de la cellule, en particulier au niveau des radeaux lipidiques (Antoni, 2012; Hofer, 2012). Cette compartimentation entraîne des gradients de $[AMPC]_{int}$ observables dans des études utilisant des sondes spécifiques de la localisation cellulaire de l'AMPC (Leroy *et al.*, 2008; Rochais *et al.*, 2004). En effet, il y aurait des complexes AKAP-PKA-PDE-Epac ayant des localisations spécifiques au niveau de la membrane plasmique, et permettant une régulation locale et membranaire de la [AMPC] (Grandoch *et al.*, 2010; Murray, 2008).

Il faut donc noter la grande variété des différents acteurs de cette voie qui permet aux cellules de disposer d'un arsenal très large afin d'entraîner des réponses physiologiques variables d'un type cellulaire à l'autre (Antoni, 2012). L'équipe de Cha-Molstad et coll. montre ainsi que l'expression de CREB et sa transactivation varient en fonction du type cellulaire étudié et que ce phénomène est régulé par des mécanismes épigénétiques tels que la présence d'histones acétylées rendant le gène de CREB plus ou moins actif en fonction du type cellulaire étudié (Cha-Molstad *et al.*, 2004).

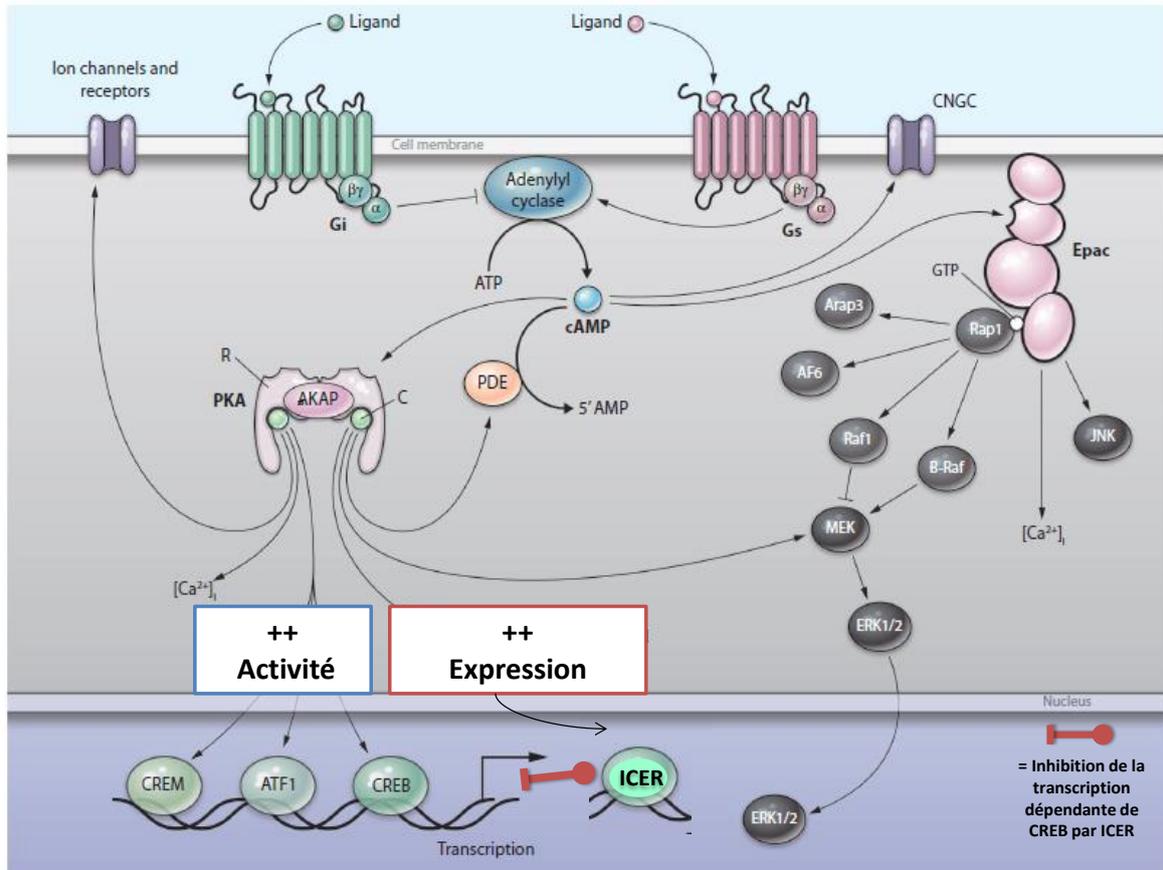


Figure 30. Résumé des différentes voies de signalisation majeures induites par l'AMPc. L'AMPc est produit par l'AC (en bleu) à partir d'ATP, puis l'AMPc peut être dégradé par les PDEs (en orange) en 5' AMP. Il peut aussi activer la PKA qui est associée aux protéines AKAP, et cette activation entraîne la phosphorylation de nombreuses protéines, tels que les canaux ou des récepteurs membranaires (en violet), ou des FT appartenant à la famille CREB (vert clair). Un FT de transcription particulier de cette famille est ICER (en vert clair, au centre), dont l'expression est modulée par la PKA, mais pas son activité, contrairement aux autres FT de cette famille. Il inhibe la transcription dépendante de CREB par compétition, en se fixant sur les éléments CRE et en empêchant la fixation des autres FT de cette famille. L'AMPc peut aussi activer directement l'Epac (en rose) ou les canaux CNG. Il existe donc une grande multitude d'acteurs de ces voies de signalisation dépendantes de l'AMPc (Modifié d'après (Murray, 2008)).

1.3.2. Rôle de la voie AMPc dans la biologie de la cellule cancéreuse

Nous avons vu que les voies impliquant l'AMPc sont variées, et qu'elles sont utilisées par de nombreuses cellules pour transduire des informations essentielles pour les tissus, et entraîner des réponses cellulaires adaptées. De nombreuses études montrent une implication de ces voies dépendantes de l'AMPc dans les différentes étapes du développement tumoral.

a) Rôle de la voie AMPc dans la prolifération des cellules cancéreuses

Les différents acteurs des voies impliquant l'AMPc ont été démontrés comme impliqués dans la prolifération cellulaire de nombreux cancers.

Dans la majorité des études, une élévation de la $[AMPC]_{int}$ diminue la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, une étude a montré que les cellules de la lignée KM12C de cancer du côlon présentent un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 lorsque l'AMPC est augmenté artificiellement par l'ajout de FSK ou bien par l'inhibition de la PDE4 par le rolipram (McEwan *et al.*, 2007). L'augmentation de la $[AMPC]_{int}$ inhibe l'expression de la thymosine β 4 par les cellules murines de mélanome B16F10, impliquée elle aussi dans de nombreux processus nécessaires au développement tumoral (TEM, survie, croissance tumorale, et métastases), et réduit le potentiel métastatique de ces cellules dans un modèle murin (Kim *et al.*, 2009). De manière intéressante, alors que la leptine, hormone impliquée dans la satiété, favorise la prolifération des cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231, lorsqu'elle est ajoutée en même temps que des agents éleveurs de l'AMPC (FSK, 8-Bromo-AMPC et théophylline), elle potentialise l'effet antiprolifératif de l'AMPC, qui passerait par la PKA (Naviglio *et al.*, 2010).

La PKA, quant à elle, et contrairement à l'AMPC, est souvent associée à un mauvais pronostic dans le cancer. Plus précisément, il a été démontré que la PKA présente une expression différente dans les cellules cancéreuses, comparativement à celle observée dans les cellules non cancéreuses de même origine. En effet, une étude clinique a montré que chez la Femme, les deux sous unités RI et RII sont surexprimées dans les tumeurs du sein, comparativement à leur expression dans le sein normal (Miller, 2002). Il a été montré que la PKA jouait un rôle dans la prolifération des cellules cancéreuses du sein MCF7 et MDA-MB-231. En effet, une élévation d'AMPC induite par un analogue (8-Bromo-AMPC) entraîne une diminution de la prolifération de ces deux types cellulaires. Cet effet serait dû à une expression plus importante de la sous-unité RII par rapport à celle de la sous-unité RI (Strobl *et al.*, 1995). Les études s'intéressant à ces sous-unités R de la PKA montrent en effet que le rapport RI/RII est déterminant dans la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, l'étude de Miller et coll. indique que chez les femmes atteintes par un cancer du sein, la sous-unité RI est deux fois plus représentée que la sous-unité RII (Miller, 2002). Cette surexpression de RI (en particulier de $Ri\alpha$), au détriment de RII, est donc associée à la transformation maligne, qu'elle soit chimio-induite, causée par un virus ou bien le résultat de l'expression d'oncogènes. Ainsi, dans le cancer colorectal, 80 % des sous-unités de la PKA seraient représentées par RI (Cho-Chung *et al.*, 1995). De plus, il est montré dans une lignée cellulaire

de cancer de prostate, les cellules PC3M, que la surexpression de la sous-unité RII β inhibe la prolifération et la TEM au profit d'une différenciation cellulaire (Neary *et al.*, 2004). Lors d'une étude clinique chez l'Homme, il a été montré que 17.5 % des patients atteints d'un cancer de la prostate et concerné par cette étude, montraient une surexpression de RI α . Dans cette étude, il est précisé que la PKA participe au développement tumoral des cellules de la prostate ainsi qu'à leur différenciation neuroendocrine (Merkle *et al.*, 2011).

Il existe également un rôle des facteurs de transcription dépendants de l'AMPC dans la régulation de la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, CREB est incriminé dans l'oncogenèse de nombreux tissus, puisqu'il est surexprimé dans certains cas de carcinomes hépatiques, de tumeurs de la glande salivaire et dans la leucémie myéloïde (Siu *et al.*, 2007). De même, il a été montré que la TEM induite par le TGF β 1 dans des cellules immortalisées bronchiques de rat (RLE-6TN) était régulée par la protéine CBP. L'inhibition de cette voie entraîne une réversion du phénotype cancéreux ainsi que la fibrose pulmonaire dans un modèle murin (Zhou *et al.*, 2012). De plus, le gène *BRCA1*, un gène dont l'expression est diminuée dans certains cas familiaux de cancer du sein, semblerait être régulé par CREB du fait de la présence d'un site CRE sur son promoteur (Atlas *et al.*, 2001).

Toutes ces études montrent que l'AMPC a un rôle crucial puisqu'il inhibe la prolifération des cellules cancéreuses, et en particulier celle des cellules cancéreuses du sein (Castoria *et al.*, 2008). Cependant, une étude récente a montré que l'AMPC favorise la réponse proliférative au TGF β de cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 en entraînant la synthèse de son récepteur (T β RI) sans impliquer CREB, mais par interaction directe entre l'AMPC et le niveau d'acétylation des histones (Oerlecke *et al.*, 2013). Les différents acteurs de la voie AMPC sont donc impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses. Il semble exister un paradoxe puisque l'augmentation d'AMPC diminue la prolifération de nombreuses cellules cancéreuses, alors que l'expression de ses effecteurs tels que CREB et la PKA semble être corrélée à un mauvais pronostic (Siu *et al.*, 2007) (Oerlecke *et al.*, 2013).

b) Rôle de la voie AMPC dans la migration des cellules cancéreuses

Nous avons donné des exemples de l'implication de la voie AMPC dans la prolifération des cellules cancéreuses, mais ce n'est pas le seul processus impliqué le développement tumoral. Aussi, la migration cellulaire, fonction importante pour la biologie des cellules cancéreuses, est très contrôlée par de nombreuses voies impliquant l'AMPC.

La migration cellulaire des cellules normales est régulée par l'AMPC, puisque dans les cellules épithéliales non cancéreuses de sein MCF10A, l'augmentation de la $[AMPC]_{int}$ favorise la migration induite par l'intégrine β_1 (Plopper *et al.*, 2000). Les effecteurs de l'AMPC ont de nombreux effets sur la migration cellulaire normale, en particulier l'Epac et la PKA. En effet, Epac est connu pour inhiber la migration de cellules épithéliales normales (cellules épithéliales de rein de chien, MDCK), en activant la protéine G Rap, qui diminue l'adhésion cellulaire et inhibe l'émission de protrusions qui est normalement observée en présence d'un facteur de croissance, l'HGF (Hepatocyte growth factor) (Lyle *et al.*, 2008). Dans les tissus non tumoraux, la PKA présente une modulation paradoxale de la migration cellulaire. En effet, dans de nombreuses cellules, elle stimule la migration cellulaires (cellules normales d'ovaires de cobaye, cellules CHO ; (Lim *et al.*, 2008)), alors qu'elle inhibe la migration des cellules endothéliales HUVEC via un mécanisme dépendant de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Kim *et al.*, 2000). Ces effets différents peuvent sans doute être expliqués par l'origine histologique différente de ces cellules, qui sont soit épithéliales (ovaire) ou endothéliales (HUVEC) .

Dans le cancer, et en particulier dans les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 présentant une migration chimiotactique vers l'acide lysophosphatidique (LPA), il a été montré une localisation préférentielle de l'activité de la PKA au niveau du front de migration (Paulucci-Holthauzen *et al.*, 2009). Pour ce même type de migration dans d'autres cellules cancéreuses du sein, les MDA-MB-435s, il a été observé des variations spatio-temporelles de la $[AMPC]_{int}$ responsables d'effets opposés sur la migration cellulaire. En effet, l'équipe de O'Connor et coll., ont montré que la voie AMPC/PKA pouvait soit i) activer la migration chimiotactique de ces cellules en activant la protéine G Rac, soit ii) inhiber cette migration en inhibant la GTPase RhoA, en fonction de la localisation subcellulaire de la PKA (O'Connor *et al.*, 2001). Cette localisation spécifique de la PKA dans les cellules cancéreuses qui migrent se ferait par l'intermédiaire des AKAP, tel que c'est le cas pour les cellules cancéreuses d'ovaire (SKOV-3EOC) (McKenzie *et al.*, 2011). Il faut noter également que dans le cas des cellules cancéreuses pulmonaires de la lignée A549, il a été montré que l'inhibition de la PKA diminuait la migration cellulaire induite par l'hypoxie (Shaikh *et al.*, 2012). Les effets différentiels de la PKA sur la migration cellulaire des cellules, qu'elles soient normales ou cancéreuses, sont expliqués dans la littérature par une différence de localisation subcellulaire de la PKA, et donc, de son activité. Cette activité est mesurée grâce à

l'utilisation d'une sonde sensible à l'activité de la PKA, appelée AKAR (A-kinase-Activity-Reporter), basée sur les méthodes de transfert d'énergie de fluorescence (FRET), et dont les différents types de sondes sont utilisées par de nombreux auteurs (Lim *et al.*, 2008) (Figure 31).

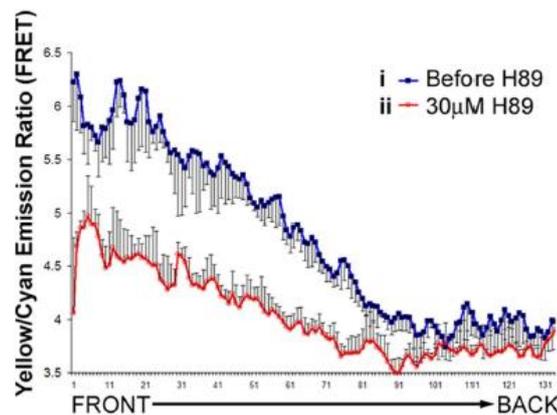


Figure 31. Utilisation de la sonde pmAKAR3 pour montrer une localisation plus importante de l'activité de la PKA à la membrane, au niveau de l'avant de la cellule qui migre par rapport à l'activité mesurée à l'arrière de la cellule. Les cellules utilisées sont des cellules CHO transfectées avec cette sonde de FRET, dont le ratio d'émission est proportionnel à l'activité de la PKA. L'utilisation d'un inhibiteur de la PKA, le H89 (courbe rouge, 30 μ M), permet de montrer qu'il s'agit bien de l'activité de la PKA (d'après (Lim *et al.*, 2008)).

L'utilisation de sondes de ce type a permis aux auteurs de différentes études de confirmer cette localisation préférentielle de la PKA à l'avant de la cellule, sur le front de migration, par l'intermédiaire des AKAP. En effet, différentes AKAP permettraient un ancrage polarisé de la PKA à la membrane, et on observe un gradient d'activité de la PKA, qui a une activité plus faible à l'arrière de la cellule par rapport au front de migration (Lim *et al.*, 2008) (Figure 31). Il y a donc une compartimentation spatiale de la PKA au sein des cellules normales, qui en ayant une telle distribution peut entraîner une activité enzymatique séquentielle différente entre l'avant et l'arrière de la cellule, régulant ainsi localement l'adhésion cellulaire, et donc la migration cellulaire (Howe, 2004). La revue de Howe, publiée en 2004, fait état de la régulation paradoxale de l'adhésion cellulaire via une phosphorylation par la PKA de nombreuses protéines du cytosquelette et de protéines impliquées dans l'adhésion (actine, intégrines, myosine, calpaïnes...). Ceci permet à la PKA de réguler la migration de façon spatio-temporelle : i) de moduler la rétraction cellulaire à l'arrière de la cellule, ii) tout en régulant l'émission de protrusions à l'avant de celle-ci (Howe, 2004).

L'Epac est également un des effecteurs de l'AMPC qui tient une place particulière dans la migration des cellules cancéreuses, puisqu'il a été montré comme favorisant la migration de cellules de mélanome (Baljinnyam *et al.*, 2010). L'étude récente de Spina et coll., vient appuyer l'importance de la PKA et de l'Epac dans la régulation de la migration par chimioattraction des cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 (Spina *et al.*, 2012).

Toutes ces études montrent que l'AMPC, par l'intermédiaire de ses effecteurs principaux, est un second messenger important pour la migration cellulaire, en particulier la migration des cellules cancéreuses.

c) Rôle de la voie AMPC dans le développement de métastases osseuses

Le fait que l'AMPC régule les propriétés de prolifération et de migration des cellules cancéreuses suggère un rôle de ce second messenger dans le développement tumoral et métastatique. Il existe quelques études qui se sont intéressées à l'implication de l'AMPC dans le développement métastatique. Le peu de données concernant ces études concerne le FT CREB. L'étude de Wu et coll., montre ainsi que l'activation de CREB dans les cellules cancéreuses de prostate humaine, entraîne l'acquisition de propriétés d'ostéomimétisme, leur permettant de se développer dans l'os (Wu *et al.*, 2007). Ainsi, les résultats obtenus en immunohistochimie par ces auteurs montrent une expression de CREB très importante dans les tumeurs primaires de prostate et dans les métastases osseuses et une absence de cette expression dans les tissus sains. Il y aurait donc un rôle de la voie cAMP/PKA/CREB dans le mécanisme conduisant au développement de métastases osseuses dans le cancer de la prostate (Wu *et al.*, 2007). De plus, une étude très récente, montre que la Nétrine-1, une protéine de la MEC impliquée dans le guidage des neurones lors du développement embryonnaire, entraîne la phosphorylation de CREB dans des cellules de gliome humain. Ceci conduit à la formation de bourgeonnements cellulaires contribuant à la colonisation lymphatique par ces cellules cancéreuses, dans les nœuds lymphatiques axillaires et inguinaux de souris (Shimizu *et al.*, 2013).

Par ailleurs, l'expression de CREB est corrélée avec un mauvais pronostic dans une étude clinique qui montre que les patientes atteintes d'un cancer du sein et qui présentent des métastases, ont une expression de CREB significativement plus élevée que les patientes de meilleur pronostic (Chhabra *et al.*, 2007). Une autre étude montre que CREB est

impliquée dans les métastases ostéolytiques dans le cancer du sein. En effet, ces auteurs ont utilisé des cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 exprimant la forme sauvage (CREB-wt) ou la forme dominante négative (K-CREB, produite par biologie moléculaire) qu'ils ont injectées dans le ventricule cardiaque de souris Balb/c. Les cellules injectées sur-exprimant CREB sous sa forme sauvage, entraînent des métastases osseuses ostéolytiques, ce qui n'est pas le cas des souris injectées avec les cellules sur-exprimant K-CREB. Cette étude suggère l'intervention de CREB dans le développement de métastases ostéolytiques dans le cancer du sein (Son *et al.*, 2010). De manière intéressante, ces auteurs ont montré que l'expression de CREB dans ces cellules était favorisée par un traitement *in vitro* à l'aide de TGF β , IL-1 ou IGF-1, qui sont des cytokines secrétées dans le microenvironnement osseux.

Il faut citer également, deux études qui s'intéressent à l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes en réponse à l'AMPc. En effet, la balance entre l'activité de ces deux types cellulaires que nous avons étudiés dans la **partie 1.1.2.b. Une cible métastatique préférentielle du cancer du sein : l'os**, est indispensable à la production et la dégradation de l'os, par les ostéoblastes et ostéoclastes, respectivement. Or, l'AMPc entraîne l'expression d'ICER, qui lorsqu'il est surexprimé dans les ostéoblastes de souris transgéniques, entraîne une perte de masse osseuse (Chandhoke *et al.*, 2008). A l'inverse, chez des souris KO pour *CREM*, l'expression protéique d'ICER et de CREM est éteinte, et ces souris présentent alors une augmentation de la masse osseuse, ainsi qu'une diminution du nombre d'ostéoclastes actifs (Yang *et al.*, 2008). Toutes ces études vont dans le sens d'une implication de l'AMPc, par l'intervention des FT de la famille CREB, dans le développement de métastases osseuses.

1.3.3. Régulation des K_{Ca} par l'AMPc

Le canal SK3 est impliqué dans le processus de métastases osseuses dans le cancer du sein, comme nous l'avons vu dans la partie **1.2.4 (Conséquences dans le processus d'établissement des métastases osseuses)**. Puisque l'AMPc est également impliqué dans le développement tumoral et métastatique, il est intéressant de citer ce qui est connu dans la littérature concernant la régulation des canaux ioniques par l'AMPc. Toutes les études montrent un effet indirect de l'AMPc, puisque les effets de l'AMPc sur les canaux ioniques, en particulier les K_{Ca} sont médiés par la PKA, ou l'AMPK.

Nous ne nous sommes pas limités aux SK_{Ca} du fait du peu de données disponibles dans la littérature, mais aux canaux K_{Ca}. L'expression et l'activité de ces canaux peuvent être régulées par les effecteurs de l'AMPC.

a) Régulation de l'activité des K_{Ca} par l'AMPC

L'AMPC est connu pour réguler l'activité de nombreux canaux tels que les canaux K⁺ dépendants du voltage ou K_v (inhibition, (Chung *et al.*, 1995)), les canaux K⁺ sensibles à l'ATP ou K_{ATP} (activation dans les myocytes artériels (Kleppisch *et al.*, 1995) ou inhibition dans les cellules β du pancréas (Kang *et al.*, 2008)), ou encore les canaux Ca²⁺ dépendants du voltage de type L (activation (Kamp *et al.*, 2000)).

Les canaux K_{Ca} sont également sensibles à l'activité des effecteurs de l'AMPC, puisque l'activité du BK_{Ca} est largement décrite comme étant modulée par la PKA, l'Epac et l'AMPK. En effet, dans les années 90, il a été montré que le canal BK_{Ca} était phosphorylé par la PKA, dans les cellules du myomètre de rattes, ce qui activait le canal (Perez *et al.*, 1994). Plus récemment, il a été montré le rôle de l'activité du canal BK_{Ca} dans le couplage excitation contraction du tissu musculaire lisse. Dans ce contexte, ce canal est également activé par l'AMPC *via* la PKA que ce soit chez le rat (artères pulmonaires (Barman *et al.*, 2003), cellules épithéliales de colon (Perry *et al.*, 2009)), ou chez la souris (artères pulmonaires (Marino *et al.*, 2011); et artères du cervelet (Wellman *et al.*, 2001)). D'autres effecteurs de l'AMPC régulent également le BK_{Ca}, puisqu' Epac favorise l'AHP induite par le BK_{Ca} dans les neurones du cervelet (Ster *et al.*, 2007) tandis que l'AMPK augmente l'activité du BK_{Ca} dans certains modèles *in vitro* (ovocyte de Xénope, (Foller *et al.*, 2012)) alors qu'elle la diminue dans les cellules du glomus carotidien (Wyatt *et al.*, 2007). Le canal BK_{Ca} est donc une cible bien connue de la voie impliquant l'AMPC, et son activité est principalement favorisée par une augmentation de l'AMPC, un effet qui passe par la PKA. De plus, il est le premier canal K_{Ca} ayant été décrit comme étant régulé par la PKA, et les auteurs parlent d'association fonctionnelle entre ce canal et la kinase (Esguerra *et al.*, 1994).

Le canal IK_{Ca} est également régulé par l'AMPC dans de nombreux types cellulaires. Ce canal est activé par l'AMPC, et ce *via* un mécanisme impliquant la PKA (Pellegrino *et al.*, 1998). Cependant, son activité est bloquée par la PKA lorsqu'il est exprimé dans l'ovocyte de Xénope (Neylon *et al.*, 2004) par une phosphorylation des sérines présentes sur le C-term de ce canal, dans la région d'interaction entre le canal et la CaM. Plus récemment, il a été

montré que la FSK inhibe le canal IK_{Ca} de manière dépendante de la PKA dans les fibroblastes de la lignée NIH 3T3 et dans des cultures primaires de cellules musculaires lisses aortiques de rat (Choi *et al.*, 2012). Les effets de l'AMPc sur le canal IK_{Ca} , passant par la PKA, sont donc opposés, en fonction du type cellulaire. L'équipe de Neylon et coll. propose une explication à cet effet opposé, en émettant l'hypothèse de la présence de deux sites phosphorylables par PKA dans le domaine C- term. du canal, un qui serait responsable de l'activation du canal, l'autre de son inhibition (Neylon *et al.*, 2006). Peu avant le clonage des SK_{Ca} , en 1996, l'équipe de Bleich et coll. avait décrit la régulation de canaux K_{Ca} par la FSK, qui inhiberait ces canaux dans les cellules de colon de rat (Bleich *et al.*, 1996). On peut supposer une régulation de l'activité des SK_{Ca} par la voie AMPc, de la même manière que les activités de leurs proches parents BK_{Ca} et IK_{Ca} sont régulés par les effecteurs de cette voie.

b) Régulation de l'expression des K_{Ca} par l'AMPc

Il existe peu de données dans la littérature concernant la régulation de l'expression des canaux K_{Ca} par l'AMPc. Cependant, la PKA est connue pour réguler l'expression de surface de certains canaux, tels que celle de l'isoforme néonatale d'un canal sodique dépendant du voltage ($Na_v1.5$). En effet, dans les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231, la PKA active l'expression de ce canal à la membrane plasmique, et la migration dépendante de ce canal (Chioni *et al.*, 2010). L'adressage membranaire des SK_{Ca} est également modulé par la PKA, via l'activation des récepteurs β -adrénergiques dans les neurones pyramidaux de l'amygdale. En effet, la PKA active le recyclage de SK2, phénomène impliqué dans la plasticité neuronale, permettant d'accélérer la transmission synaptique de ces neurones spécialisés dans la potentialisation de la mémoire liée aux émotions (Faber *et al.*, 2008). De plus, il existe deux études montrant que le canal SK2, représentant le plus proche parent de SK3, voit son expression régulée par la PKA. La première étude concerne l'expression de SK2 dans les neurones CA-1 de l'hippocampe chez la souris, et montre que la PKA favorise l'internalisation et le turn-over du canal SK2 à la membrane, ce qui permet une potentialisation à long terme de ces neurones (ou LTP) (Lin *et al.*, 2008). L'autre étude a été réalisée dans des cellules COS 7 (cellules hépatiques de singe) et montre que le canal SK2, une fois phosphorylé par la PKA, voit son expression de surface diminuer, sans modification de l'expression totale du canal dans les lysats cellulaires (Ren *et al.*, 2006). Dans les deux cas,

l'augmentation d'AMPC favorise la diminution de l'expression de surface de SK2, que le canal soit exprimé de manière endogène ou non.

Enfin, Le canal BK_{Ca}, étudié dans un modèle *in vivo* de souris KO AMPK^{-/-}, présente une expression plus faible chez les souris n'exprimant pas l'AMPK alors que son expression est très importante chez les souris possédant cette kinase (Foller *et al.*, 2012).

Il est à noter qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'études montrant des effets de la voie AMPc que ce soit sur l'expression ou l'activité du canal SK3.

1.4. Objectifs du travail

Au regard de toutes ces considérations bibliographiques, qui mettent en lumière l'implication du canal SK3 dans le développement métastatique osseux, nous émettons l'hypothèse de travail suivante : « L'expression et l'activité du canal SK3 sont favorisées par le microenvironnement osseux ce qui permet aux cellules cancéreuses du sein de coloniser le tissu osseux. Il participe ainsi au cercle vicieux métastatique. » Nous souhaitons répondre à la problématique suivante : **Rôle du microenvironnement osseux et en particulier du Ca²⁺ extracellulaire dans la régulation de l'activité et de l'expression du canal SK3.**

Afin de pouvoir répondre à cette problématique et valider notre hypothèse, le travail de cette thèse a consisté à étudier dans un premier temps les effets d'une augmentation de la [Ca²⁺]_{ext.} sur l'expression du canal SK3 (première partie des résultats), en partant du principe que l'ostéolyse osseuse accompagnant le développement de métastases entraîne une augmentation de Ca²⁺ dans la matrice osseuse. Le CaSR étant largement démontré comme impliqué dans ces processus, nous avons étudié l'implication de celui-ci dans la régulation de l'expression du canal SK3. Nous nous sommes intéressés à la régulation de l'expression de SK3 par l'AMPC car la [AMPC]_{int} est modulée par l'activité du CaSR. Afin d'étudier l'expression du canal SK3, nous avons utilisé des techniques de quantification de l'expression des transcrits (Polymerase Chain Reaction), d'étude de l'expression protéique (Western Blot), ainsi que de mesure de l'activité transcriptionnelle du promoteur du gène *KCNN3* (bioluminescence de gènes rapporteurs).

Dans une deuxième partie, nous avons utilisé des techniques d'étude de la migration cellulaire (migration Transwell au travers d'inserts), afin d'étudier les conséquences de la modulation de cette expression du canal SK3 sur la migration des cellules cancéreuses de

sein. En effet, il a été démontré que la migration cellulaire dépendante du canal SK3 était importante pour le développement de métastases osseuses (Chantôme *et al.*, 2013). Cette partie a permis de vérifier la fonctionnalité du canal SK3 dans les cellules d'intérêt, en présence de certains facteurs du microenvironnement osseux, tels que le Ca^{2+} ou le RANKL. Nous avons également testé l'effet d'une inhibition du CaSR sur la migration cellulaire de cellules cancéreuses exprimant SK3.

Une troisième partie nous a permis d'étudier la régulation de l'activité du canal SK3 par l'AMPc à l'aide de la technique de patch-clamp, en configuration cellule-entière. Par ailleurs, ayant démontré récemment que le canal SK3 était associé étroitement au canal Orai 1 (Chantôme *et al.*, 2013), nous avons étudié l'influence de l'AMPc sur la migration et l'entrée de Ca^{2+} dépendantes de ce complexe Orai1-SK3.

Enfin, le Ca^{2+} extracellulaire n'étant pas le seul facteur du microenvironnement pouvant être libéré lors de l'ostéolyse, nous avons obtenu des résultats préliminaires concernant l'influence d'autres facteurs de ce microenvironnement sur l'expression de SK3. Ces résultats sont compilés dans la quatrième et dernière partie de notre étude et ont été obtenus à l'aide des mêmes outils que ceux décrits précédemment.

Cette démarche expérimentale vise à étudier des mécanismes moléculaires pouvant expliquer le tropisme osseux des cellules cancéreuses de sein exprimant le canal SK3. Le travail réalisé lors de ce doctorat a pour objectif de permettre une meilleure compréhension de la régulation de l'expression du canal SK3 et de son activité, afin d'aboutir, à plus long terme à des thérapies innovantes permettant de prévenir et de traiter les métastases osseuses du cancer du sein.

II. Matériel et Méthodes

2.1. Lignées et culture cellulaire

Toutes les manipulations des lignées cellulaires ont été réalisées sous hotte à flux laminaire afin de limiter les contaminations bactériennes ainsi que les infections par des mycoplasmes. Les incubateurs sont à saturation d'humidité, permettent de maintenir leur niveau de CO₂ à 5 % ainsi qu'une température constante de 37° C. Cette concentration en CO₂ permet de contrôler le pH des milieux à l'aide de la réaction créée par la dissolution du CO₂ atmosphérique dans le milieu de culture dont la relation chimique est la suivante :



Le maintien de ces paramètres est indispensable pour un développement optimal des lignées étudiées, et toute variation de température ou la concentration de CO₂ pourraient influencer les résultats obtenus. C'est pourquoi les cellules utilisées pour les expériences réalisées sur des cinétiques relativement courtes (inférieures à 48 h) ont été placées dans des incubateurs qui n'étaient que très peu ouverts par tous les utilisateurs.

2.1.1. Lignée MDA-MB-435s

Il existe plusieurs lignées cancéreuses obtenues à partir de prélèvements de carcinome du sein chez la femme. La lignée MDA-MB-435s fusiforme dérive d'une lignée parentale MDA-MB-435 issue d'une effusion pleurale prélevée chez une Femme de 31 ans atteinte d'un adénocarcinome mammaire (Figure 32). Elle a été isolée par R. Cailleau et al. (Cailleau *et al.*, 1978). Elle a été obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, LGC Promochem, Molsheim, France). La nature exacte de cette lignée a longtemps été discutée, voire controversée, car de nombreuses études affirmaient que ces cellules MDA-MB-435s étaient de mélanome plutôt que d'être issues d'un carcinome mammaire. Or, une étude du caryotype de ces cellules a mis fin à la controverse en démontrant leur origine cancéreuse mammaire (Chambers, 2009).

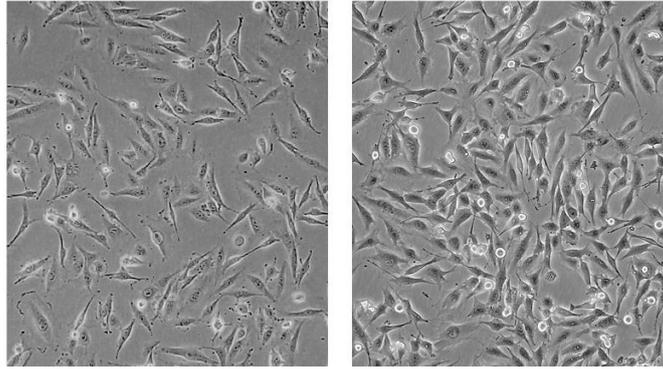


Figure 32. Aspect microscopique des cellules MDA-MB-435s (Image de gauche : faible densité ; image de droite : haute densité). Ces images ont été obtenues sur le site de l'ATCC <http://www.atcc.org/products/all/HTB-129.aspx>.

Cette lignée permet d'obtenir un modèle cellulaire de cancer de sein à hauts potentiels prolifératif et migratoire, avec un phénotype extrêmement agressif. C'est une lignée qui n'exprime pas les récepteurs α aux œstrogènes (ER α), mais qui exprime les récepteurs β (Kimbrow *et al.*, 2008). Un autre critère important concerne l'expression des SKCa dans cette lignée. En effet, cette lignée est particulière car elle exprime le canal SK3. Tous ces éléments font de ces cellules MDA-MB-435s un modèle de premier choix pour l'étude de l'expression et de la fonctionnalité du canal SK3, dans le cadre du cancer et du développement de métastases.

Au laboratoire, deux lignées MDA-MB-435s transduites exprimant la luciférase ont été développées par le Dr. Aurélie Chantôme :

- i) MDA-MB-435s shRD ou SK3⁺ qui expriment SK3
- ii) MDA-MB-435s shSK3 ou SK3⁻ : qui n'expriment plus SK3.

Ces modèles cellulaires ont été utilisés dans l'étude *in vivo* de l'implication du canal SK3 dans le développement de métastases osseuses chez des souris nues (Chantôme *et al.*, 2013).

2.1.2. Lignées HEK 293 T

Concernant cette lignée rénale fœtale, a été immortalisée à l'aide de l'antigène T du virus simien SV40. Cette lignée cellulaire est largement utilisée du fait de la facilité avec laquelle ces cellules se transfectent à l'aide de plasmides ou autres vecteurs de transfection.

Au cours de cette thèse, trois lignées stables ont été utilisées pour les expériences de patch clamp : HEK-hSK1, HEK-rSK2 et HEK-rSK3. La première surexprime de manière stable le canal SK1, la forme retrouvée chez l'humain, alors que les deux autres lignées expriment de

manière stable également les formes retrouvées chez le rat des canaux SK2 et SK3. Les lignées ont été obtenues par transduction stable (cf. Chapitre 2.6. Biologie Moléculaire) par le Dr Aurélie Chantôme. Un autre avantage de cette lignée réside dans le fait qu'elle n'exprime pas, de manière native, les canaux SKCa. Ces lignées nous ont donc permis d'étudier facilement les courants portés par ces canaux à l'aide de la technique de patch clamp, et de comparer les effets de l'AMPC sur ces trois canaux.

2.1.3. Congélation et stockage cellulaire

Afin de conserver les cellules plus longtemps, une congélation est réalisée dans les deux premières semaines qui suivent la décongélation. Celle-ci est réalisée suite à une récupération classique des cellules en culture par trypsination, puis une centrifugation à 700 x *g* pendant 5 minutes. Les culots cellulaires sont ensuite repris dans un mélange contenant 60 % du milieu dans lequel les cellules sont cultivées, 30 % de sérum de veau fœtal (Lonza, Belgique), et 10 % de DSMO stérile. Ce dernier permet de protéger les cellules de l'éclatement lié à la cristallisation de l'eau contenue dans le cytoplasme lors du processus de congélation cellulaire. Les cellules ainsi reprises sont placées dans des cryotubes (Nunc, ThermoScientific, Danemark) eux-mêmes stockés dans un congélateur à -80°C avant d'être placés à l'azote liquide.

2.2. Solutions et molécules utilisées

2.2.1. Solutions et milieux de culture cellulaire:

a) DMEM et α MEM

Pour la culture cellulaire, le milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, BioWhittaker®, Lonza, Belgium) a été utilisé principalement. Le milieu α MEM, a aussi été choisi car son contenu, bien que proche de celui du DMEM, contient moins de glucose et d'ions HCO_3^- .

Ces deux milieux, en plus de contenir tous les ions et nutriments nécessaires à la croissance cellulaire (acides aminés (formes L) et vitamines), contiennent du rouge de phénol, permettant d'évaluer le pH visuellement. Ce colorant présente une couleur qui évolue avec le pH, rouge à pH physiologique (7.4), jaune à pH acide (pouvant être le témoin

d'une infection bactérienne, qui peut acidifier le milieu extracellulaire) et rouge foncé à pH alcalin (il présente un pKa de 8.0).

Le pH du DMEM est relativement alcalin, et la mesure, dans nos conditions de culture, a donné un pH de 7.6 (contre 7.4 théorique, calculé à partir des différentes concentrations ioniques données par le distributeur). Le milieu α MEM (α Modified Eagle Medium, BioWhittaker®, Lonza, Belgium) est, quant à lui, légèrement plus acide (mesuré à 7.4 contre 7.2 théorique) du fait de la concentration plus faible en HCO_3^- . Le pH est un paramètre important concernant l'étude de notre protéine d'intérêt, car l'activité de ce canal est diminuée par des pH extracellulaire et intracellulaires acides par protonation des histidines présentes dans le pore du canal (Goodchild *et al.*, 2009) (Peitersen *et al.*, 2006). La figure 33 montre que des cellules cultivées dans ces deux milieux présentent une différence de niveau d'expression protéique du canal SK3. Le milieu le plus acide (α MEM) favorise son expression comparativement au milieu le plus basique. Ceci nous a permis de nous placer dans les meilleures conditions pour observer des modifications d'expression : le DMEM pour observer une augmentation d'expression, et l' α MEM pour observer plus facilement une diminution de l'expression.

De la même manière, le pH de toutes les solutions utilisées a été vérifié et ajusté à pH 7.4 afin d'éviter le plus possible les variations d'expression dues au pH extracellulaire.

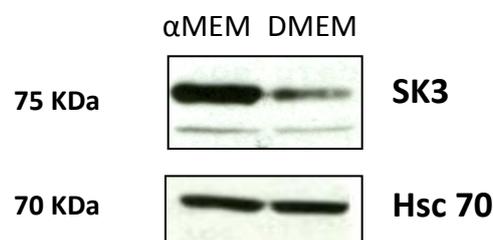


Figure 33. Comparaison du niveau d'expression de la protéine SK3 dans les deux milieux de culture cellulaire utilisés. L'expression du canal SK3 est sensible au milieu utilisé, puisqu'il est plus exprimé dans le milieu α MEM que dans le milieu DMEM.

b) Sérum de veau fœtal : HyClone et SVF

Les deux milieux présentés précédemment ont été complétés à l'aide de deux types de SVF :

- Les cellules MDA-MB-435s ont été cultivées dans du DMEM ou du α MEM complétés avec 5 % de SVF HyClone (Thermo Scientific, USA). Ce sérum est un sérum de meilleure qualité dont la composition est mieux contrôlée que celles des autres sérums.

- Les cellules HEK-293-T quant à elles, ont été cultivées dans du DMEM contenant 10 % de SVF (Lonza, Belgique) car ces cellules nécessitent plus de facteurs de croissance que les cellules cancéreuses, donc un pourcentage de sérum plus important. Leur adhésion au support est ainsi facilitée également. Il convient de préciser que la composition exacte en protéines, lipides, facteurs de croissance etc. n'est pas connue, ni fournie par les revendeurs de sérum, et que d'un lot à l'autre, ces compositions peuvent varier. Nous avons utilisé un seul lot de sérum HyClone, et deux lots de SVF de chez Lonza, afin de limiter ces variations de composition dues aux différences de lots.

c) Opti-MEM

Ce milieu Opti-MEM® (I-GlutaMAX™-I ; Gibco, Life Technologies, UK) a été utilisé pour réaliser des transfections transitoires et/ou stables car il ne contient pas de SVF, ce qui évite que les agents transfectants utilisés (Lipofectamine 2000 et RNAiMax ; Invitrogen) ne se complexent avec les protéines du sérum. Il contient cependant toutes les vitamines et autres nutriments ainsi que facteurs de croissance nécessaires afin que les cellules ainsi cultivées ne se détachent pas du support, et présentent une croissance cellulaire normale. De plus, il n'a jamais été utilisé pour des durées de culture cellulaire supérieure à 24 h en culture ce qui évite toute variation d'expression due à l'absence de SVF.

d) Phosphate Buffered saline Solution (PBS) et Trypsine-EDTA

Afin de récolter les différentes cellules, une solution physiologique (PBS : Phosphate Buffer saline Solution) (Lonza, Belgique) et de la trypsine ont été utilisées. Le PBS est tamponné à un pH de 7.4 grâce au tampon phosphate qu'il contient. Il permet d'éliminer le milieu cellulaire résiduel sur le tapis cellulaire après aspiration de celui-ci, et le fait qu'il ne contienne pas de Ca^{2+} permet de préparer l'action de la trypsine-EDTA, à savoir la rupture des interactions protéiques entre les cellules elles-mêmes et celles existants entre les cellules et leur support. La trypsine-EDTA (Lonza, Belgique) est fournie sous forme d'un mélange de trypsine et d'éthylène-di-amino-tétra-acétique (EDTA). Cette enzyme va protéolyser les protéines qui permettent l'adhésion des cellules entre elles et au support, ce qui va entraîner un décollement des cellules ainsi qu'une individualisation des cellules.

L'EDTA facilite ce décollement en complexant le Ca^{2+} extracellulaire, qui agit comme cofacteur dans l'adhésion cellulaire. On récupère ainsi une suspension cellulaire, que l'on peut ensuite répartir dans d'autres flacons de culture ou ensemercer afin de réaliser les différentes expériences.

e) Solution physiologique saline (PSS)

Cette solution est utilisée pour les expériences de patch clamp et de mesure de Ca^{2+} intracellulaire. Elle est préparée le jour même de la manipulation ou est préparée en grande quantité puis congelée en aliquots, afin d'éviter la contamination par des bactéries, et de contrôler un maximum les concentrations des ions présents. Le pH est contrôlé et ajusté avant chaque expérience. Le contenu de cette solution est présenté dans le tableau ci-dessus (Tableau 3). Il s'agit de mimer le milieu extracellulaire, ce qui explique la forte concentration en Na^+ , et la faible concentration en K^+ .

Cette solution possède une concentration très proche de celle du PBS dont nous avons parlé plus tôt, mais l'avantage de la préparer au laboratoire réside dans le fait que nous pouvons contrôler totalement sa composition, la faire varier en fonction des canaux ioniques à étudier. L'osmolarité théorique de ce PSS est de 320 mOsm et est vérifiée à l'aide d'un osmomètre (Roebbling, Allemagne).

Produit	Masse molaire (g/mol)	Concentration finale (mM)
NaCl	58,44	140
KCl	74,55	4
MgCl_2	95,21	1
NaH_2PO_4	120	0,33
CaCl_2	147	2
HEPES	238,3	10
D-Glucose	180,2	11,1
dH_2O	Eau ultrapure	-

Tableau 3. Composition de la solution physiologique saline utilisée pour les expériences de patch clamp et de mesure de la concentration en Ca^{2+} extracellulaire (pH : 7.4 tamponné au NaOH).

f) Milieu intrapipette : MIP

Ce milieu est utilisé pour le patch-clamp, il permet de contrôler la composition du milieu intracellulaire, puisqu'il est placé dans la pipette de patch-clamp, qui une fois la cellule ouverte va pouvoir dialyser la cellule, et en remplacer le cytosol. Il est donc nécessaire de

contrôler parfaitement certains paramètres, tels que sa composition ionique, son pH (7.2), son osmolarité (309 mOsm dans nos conditions, Tableau 4).

Produit	Concentration mère	Concentration finale (mM)
KCl	3 M	145
EGTA	395 mM (tamponné à 7.4)	1
MgCl ₂	1 M	1
CaCl ₂	1 M	0,72/0,81
MgATP	-	1
HEPES	1 M	10 mM
dH ₂ O	Eau ultrapure	-

Tableau 4. Composition du milieu intrapipette utilisé pour les expériences de patch clamp (pH : 7.2 tamponné au KOH, pCa 6.4 ([Ca²⁺]=0,72 mM) et pCa 6 ([Ca²⁺]=0,87 mM))

On parle de pCa pour signifier la [Ca²⁺] libre présente dans ce MIP. Il s'agit d'une analogie avec la formule reliant le pH à la concentration en protons. Ici, nous avons utilisé une pCa de 6.0 pour les cellules HEK-293T et 6.4 pour les cellules MDA-MB-435s, cela implique que le Ca²⁺ et l'EGTA (Ethylene Glycol-Tetraacetic-Acid) sont ajoutés à des concentrations permettant d'obtenir une [Ca²⁺]_{int} de 10⁻⁶ M et de 10^{-6,4} soit 1 μM et 0.398 μM respectivement. Les calculs de concentrations en Ca²⁺ et EGTA ont été effectués en utilisant le logiciel libre disponible sur : <http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>.

g) Solution de Ringer

Concernant les expériences réalisées au sein du laboratoire LaBEX LERMITT de Châtenay-Malabry, avec l'aide du Dr. Grégoire Vandecasteele, du milieu extracellulaire de type Ringer a été utilisé. Sa composition est présentée dans le tableau 5 ci-dessous. L'osmolarité est d'environ 300 mOsm et a été vérifiée à l'aide d'un osmomètre (Roebing, Allemagne). L'effet du Ca²⁺ extracellulaire a été ainsi étudié sur la [AMPC]_{int} en testant deux [Ca²⁺]_{ext} différentes : soit une concentration contrôle de 1,8 mM en Ca²⁺ libre, soit une [Ca²⁺]_{ext} réduite à 400 μM grâce à l'ajout de 1,4 mM d'EGTA.

Produit	Masse molaire (g/mol)	Concentration finale (mM)
NaCl	58,44	121,6
D-Glucose	180,2	5
Na-pyruvate	110,05	5
NaHCO ₃	84,01	4
NaH ₂ PO ₄	156,01	0,8
HEPES	238,3	10
dH ₂ O	Eau ultrapure	Qsp V _{final}
CaCl ₂	1 M (liquide)	1,8
MgCl ₂	1 M (liquide)	1,8
KCl	74,55	5,4

Tableau 5. Composition du milieu de Ringer utilisé pour les mesures de la [AMPC]_{int} (pH : 7.4 ajusté à l'aide de NaOH ; Osmolarité : 300 mOsm).

2.2.2. Molécules utilisées

La néomycine est un antibiotique qui est livré en solution (Sigma-Aldrich, France) à la concentration de 1 mg/mL. Afin de traiter les cellules pendant 20 h, elle est utilisée à 50, 200 puis 400 μ M, diluée dans le milieu de culture.

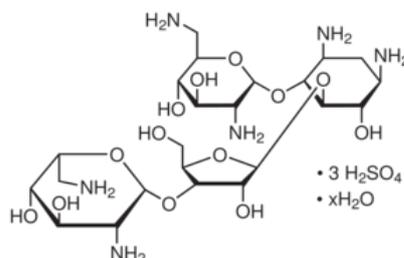


Figure 34. Structure chimique de la néomycine.

Le Ca²⁺ utilisé provient d'une solution à 1 M de CaCl₂ (Fluka®Sigma-Aldrich, France) qui est diluée directement dans le milieu de culture afin d'obtenir [Ca²⁺]_{ext.} finale de 5 mM dans un milieu qui en contient déjà (1,8 mM). La dilution se fait juste avant le traitement des cellules, et les solutions ne sont pas conservées.

La forskoline (FSK), est un activateur de l'adénylate cyclase (AC) (Sigma Aldrich, France) et a été reprise dans du DMSO (Dimethyl sulfoxide) à la concentration de 100 mM

activatrice de l'AC. Elle a été reprise dans de l'eau dé-ionisée et utilisée à la concentration de 100 nM, qui est la concentration retrouvée dans la littérature comme étant utilisée pour activer cette production d'AMPC dans les cellules ventriculaires de rat et dans les cellules HEK 293 (Leroy *et al.*, 2008; Xin *et al.*, 2008).

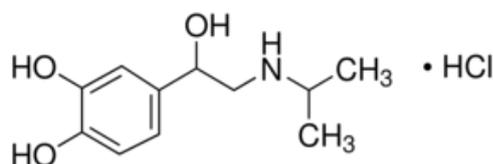


Figure 38. Structure chimique de l'isoprénaline

Le CI-1044 ou ((R)-N-[9-amino-3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-1-phenylpyrrolo[3,2,1-j,k][1,4] benzodiazepin-3-yl]-3-pyridinecarboxamide]) (Drug Safety R&D Pfizer, Amboise, France) nous a été donné par Stephan Chevalier, et est un inhibiteur spécifique de la phosphodiesterase 4 (PDE4) synthétisée par l'entreprise Pfizer. Il permet d'augmenter la $[AMPC]_{int}$ aussi bien dans les cellules HEK 293 que dans les cellules MDA-MB-435s qui expriment ces PDE4 (Burnouf *et al.*, 2000). La concentration utilisée ici varie de 50 à 100 μM , et le CI-1044 se présente sous forme de poudre reprise dans du DMSO pour une solubilisation plus simple. Ce composé est un inhibiteur sélectif des PDE 4 dont l' IC_{50} est $0,5 \pm 0,2 \mu M$ n'a pas d'effet détectable pour les PDE 1, PDE 3, PDE 5 et PDE 7. Il n'existe pas de sélectivité pour les sous-types de PDE4.

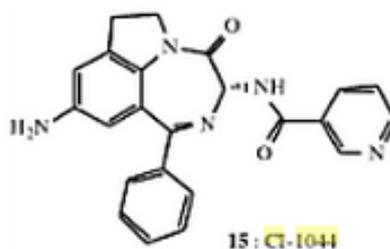


Figure 39. Structure du CI-1044

L'apamine (Sigma, France) est une toxine isolée à partir de venin d'abeille, et est un inhibiteur spécifique des SKCa. Elle vient obstruer le pore de ces canaux, empêchant ainsi la sortie de K^+ , et donc l'hyperpolarisation induite par les SKCa. Elle présente une affinité plus forte pour SK2 > SK3 > SK1.

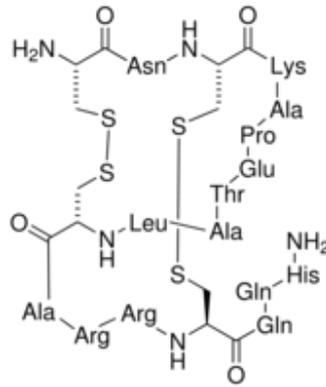


Figure 40. Structure chimique de l'apamine

L'Ibériotoxine (IbTx) (Sigma-Aldrich, France) est un inhibiteur spécifique des BKCa, canaux KCa de grande conductance (B pour Big). En absence d'IbTx, les canaux BKCa donnent des courants très importants en amplitude, et qui sont donc majoritairement visibles sur les enregistrements en voltage-clamp, pouvant masquer à certains potentiels des courants d'amplitudes plus faibles tels que ceux portés par les SKCa. Cet inhibiteur à la concentration de 100 nM permet donc de faciliter l'étude des canaux d'intérêt, les SKCa.

Le **KT 5720** (Sigma-Aldrich, France) est un inhibiteur de la PKA. Il est utilisé à la concentration de 3 μ M.

2.3. Etude de l'expression des protéines et canaux ioniques : Technique du Western Blot

2.3.1. Lyse cellulaire

Après action de l'EDTA sur le tapis cellulaire, un culot cellulaire est récupéré par une centrifugation de 5 min à 700xg. Ce dernier, est beaucoup moins agressif que la trypsine, ce qui permet de ne pas altérer la structure des canaux ioniques et donc de préserver leur activité. Une fois les surnageants éliminés, les cellules sont lysées grâce à l'ajout de 70 à 100 μ L de tampon de lyse sur le culot (environ un million de cellules). Ce tampon est constitué de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) à 2 % final, de PBS et d'un cocktail d'inhibiteur de protéases (Sigma-Aldrich, France). Ces inhibiteurs permettent d'éviter une dégradation des protéines intracellulaires lors de la lyse cellulaire. En effet, la lyse cellulaire est entraînée par l'ajout de

détergent (SDS) qui va rompre toutes les membranes cellulaires, autorisant la libération de protéases dans le lysat. On évite ainsi le clivage de nos protéines d'intérêt, tout en sachant que cette inhibition n'est pas totale. Les extraits sont ensuite passés dans des seringues Microlance® avec des aiguilles de plus en plus fines (de 0.8 à 0.3 mm de diamètre) et nous réalisons plusieurs cycles d'aspiration/ refoulement, afin de casser l'ADN génomique libéré lors de la lyse et ainsi diminuer la viscosité de l'extrait protéique. Les extraits protéiques ainsi obtenus peuvent alors être dosés, assez rapidement et en évitant les cycles décongélation-congélation, car ce matériel biologique est fragile.

2.3.2. Dosage de protéines

Afin d'obtenir la concentration en protéines totales présentes dans les extraits protéiques obtenus précédemment, on réalise une gamme étalon à l'aide d'une protéine dont la concentration est connue, l'albumine bovine (BSA) (Tableau 6). La méthode BCA (Bicinchoninic Acid) est un dosage colorimétrique, réalisé à l'aide d'un kit : est « BC Assay Kit» (Pierce Biotechnology, USA) qui permet d'obtenir une Densité Optique (DO), mesurée à la λ de 562 nm, proportionnelle à la concentration en protéines dans l'extrait cellulaire. Le fait d'avoir une gamme étalon nous permet d'obtenir une courbe d'étalonnage, dont l'équation pourra ensuite permettre de déterminer la concentration protéique totale dans les extraits étudiés, à partir de la DO mesurée à 562 nm (Figure 41).

Solution mère de BSA (à partir de poudre) : 2mg/mL		Gamme étalon ($\mu\text{g/mL}$)						
	échantillons	0	25	62,5	125	250	500	1000
Vol de lysat cellulaire (μL)	5							
BSA 2x (μL)	0	0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
dH2O (μL)	20	12,5						
SDS 2% (μL)	0	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Vol total échantillon	25							
BSA (1B:50A) (μL)	200	200	200	200	200	200	200	200

Tableau 6. Elaboration de la gamme étalon de BSA et des échantillons pour le dosage de protéines totales à l'aide du Kit BCA Assay.

Une fois la concentration protéique totale de l'extrait connue, les échantillons sont préparés pour une électrophorèse visant à leur séparation en vue d'une identification. Du tampon de Laemmli est ajouté à l'échantillon pour l'alourdir, de façon à ce qu'il puisse

migrer plus facilement au sein du gel d'électrophorèse. Ce tampon (cf Composition dans tableau XX.), contient du glycérol qui augmente la densité de l'échantillon, et favorise ainsi son dépôt dans les puits, en évitant une perte de matériel biologique. De plus, il est coloré avec des cristaux de bleu de bromophénol, ce qui permet de suivre l'avancement de la migration électrophorétique. Le fait d'ajouter du β -mercaptoéthanol permet de réduire les ponts disulfures entre protéines et au sein d'une même protéine (structures secondaires et tertiaires) afin de séparer les protéines selon leur taille (kDa) et non leur forme ou leur encombrement dans l'espace. Enfin, le détergent (ici le SDS) permet également de dénaturer les structures secondaires et tertiaires des protéines mais aussi et surtout d'uniformiser la charge nette de toutes les protéines de l'extrait. Il s'hybride à intervalle régulier sur la protéine, ceci conférant une charge totale négative identique à chaque protéine, permettant une séparation en fonction de la taille et non de la charge. La migration au sein du gel est alors homogénéisée, et toutes les protéines migrent alors vers l'anode du montage (pôle +).

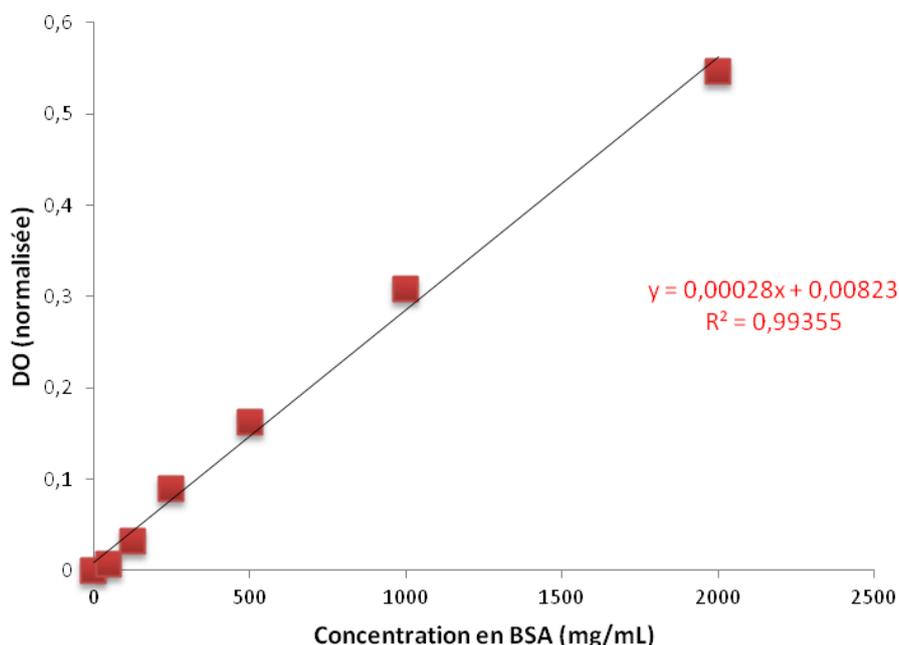


Figure 41. Exemple de courbe étalon obtenue par dosage colorimétrique à l'aide du kit BCA.

Une fois la concentration en protéines totales connue, les échantillons sont préparés dans le tampon de charge décrit précédemment, pour chacune des conditions de traitement ou de transfection cellulaire. La quantité de protéines totales déposée varie entre 50 μ g et

80 µg. En effet, il est nécessaire d'utiliser une quantité suffisante de protéines totales afin de permettre une détection correcte des protéines d'intérêt lors de l'étape de révélation.

2.3.3. Electrophorèse

Une fois les extraits protéiques préparés, les gels d'électrophorèse sont préparés selon les compositions présentées dans le tableau 8 ci-dessous. La composition des solutions permettant d'élaborer ces gels est également présentée dans le tableau 7.

Solution (vol. final)	Composition	Quantité
Tampon de charge Laemmli 2x (40 mL)	Glycérol 20 %	8 mL
	β-mercaptoéthanol 10 %	4 mL
	SDS 4.6 %	18.4 mL
	dH ₂ O	4.6 mL
	Bleu de bromophénol	Quelques cristaux
Tampon de lyse (1 mL)	SDS 10 %	500 µL
	PBS	400 µL
	Cocktail d'inhibiteur de protéases 10x	100 µL
L2X (200 mL)	TRIS	72.6 g
	SDS	1.6 g
	pH	8.8
Solution M (200 mL)	TRIS	12 g
	SDS	0.8 g
	pH	6.8
Tampon d'électrophorèse 10 x (1L)	Tris Base	30.2 g
	Glycine	144 g
	SDS	10 g
	pH	8.3
Tampon de transfert 5x (1L) Sans MeOH (à ajouter à hauteur de 20 %)	Tris Base	18.75 g
	Glycine	90 g
	pH	8.3
Tampon de lavage TTBS (1L) 10 x	Tris Base	6 g
	NaCl	43.5 g
	Tween 20	5 mL
	pH	7.4

Tableau 7. Composition des différents tampons utilisés en western blot

Gel de migration	Gel de concentration
10 mL dH ₂ O	1,25 mL de solution M (pH 6.8)
6,6 mL d'acrylamide 30 %	0,75 mL d'acrylamide 30 %
5 mL de solution L2X (pH 8.8)	3 mL dH ₂ O
240 µL APS 10 % (ammonium persulfate)	50 µL APS 10 %
15,6 µL Temed	5 µL Temed

Tableau 8. Composition des gels d'électrophorèse utilisés.

Avant de préparer les gels d'électrophorèse, il faut réaliser le montage permettant de réaliser cette électrophorèse. Les gels d'électrophorèse sont coulés entre deux plaques de verre, espacées de 1,5 mm. Il faut que le montage soit totalement hermétique afin d'éviter la perte de gel avant sa polymérisation et permettre que celle-ci se fasse de manière homogène.

La première étape consiste à réaliser un gel de migration, qui sera le second gel traversé par les échantillons au cours de la migration électrophorétique. Son pH est basique afin de maintenir l'ionisation des protéines (chargées négativement grâce au SDS présent dans les tampons de lyse et de charge) il est maintenu à 8.8 par la présence de Tris dans le gel et le tampon d'électrophorèse (Tableau 8). Le pourcentage d'acrylamide utilisé représente le maillage du gel. En effet, plus le gel est riche en acrylamide et plus le maillage du gel sera « serré » plus les petites protéines seront retenues et inversement. Ici, les protéines étudiées se situent entre 50 et 100 kDa, ce qui correspond à une taille moyenne de protéine, et donc à un maillage de gel situé entre 8 et 10 % d'acrylamide. Il faut noter que les deux gels de migration et de concentration contiennent du SDS afin de maintenir des conditions dénaturantes au cours de la migration électrophorétique.

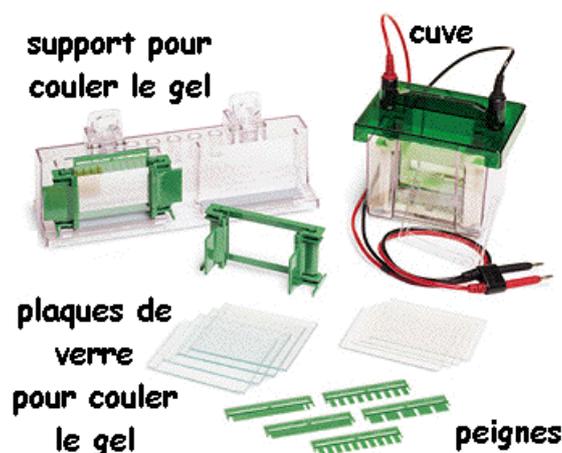


Figure 42. Photographie des différents éléments utilisés pour l'électrophorèse (d'après <http://ead.univangers.fr/~jaspard/Page2/TexteTD/8TPmethodologie/5Electrophorese/1Electrophorese.htm/>).

Le second gel qui est préparé est le gel de concentration, qui comme son nom l'indique permet de concentrer l'échantillon (Tableau 8). En effet, il est le premier gel traversé par les échantillons qui y sont déposés à l'aide de puits fabriqués au sein de ce gel à l'aide de peignes permettant une polymérisation en « créneau » sur le dessus du gel. Les échantillons ainsi déposés vont migrer à travers ce gel de concentration qui présente un pH neutre et un faible taux d'acrylamide (0,5 %), ce qui permet à tous les échantillons d'arriver au même moment au niveau de la limite entre les deux différents gels, sans aucune résistance. Ils entameront donc leur migration au travers du gel de migration au même moment, afin d'y être séparés en fonction de la taille des protéines qui les constituent.

Une fois les deux gels préparés, le gel résultant est placé dans une cassette, qui permet de le fixer dans le montage et de disposer ce dernier dans la cuve d'électrophorèse (MiniProtean II®, BioRad, France) (Figure 42). Il est nécessaire que le montage ne présente pas de fuite, afin de permettre une migration électrophorétique homogène et optimale. On dépose ensuite une quantité suffisante de tampon d'électrophorèse (Tableau 7) au sein de la cuve, puis on impose un potentiel de 40 mV pendant quelques minutes (le temps de traverser le gel de concentration) puis de 70 mV pendant environ 2h30, jusqu'à ce que le front de migration (visualisable grâce au tampon de charge coloré) atteigne la fin du gel de migration.

2.3.4. Transfert

Une fois les protéines ayant été séparées dans le gel de migration, ce gel est récupéré et rincé dans du tampon de transfert contenant 20 % de méthanol (cf. composition dans tableau 7). L'utilité de cet alcool est de dissocier le SDS qui était complexé aux protéines présentes dans le gel afin que celles-ci puissent interagir avec la membrane de polyfluorure de vinylidène (PolyVinylidène Fluoride /PVDF), et ainsi s'y fixer lors de cette étape de transfert (Figure 43). Cette dissociation de l'interaction entre protéines et SDS rétablit les charges nettes des protéines étudiées, il est donc nécessaire d'avoir un tampon de transfert à pH basique (supérieur à 8.0) afin que le champ électrique imposé (240 mA pendant 1h30) puisse transférer toutes les protéines du gel vers la membrane de PVDF. L'avantage de ce type de membrane PVDF, réside dans le fait que lors de l'hybridation avec les anticorps, on

observe moins de bruit de fond, et donc un meilleur signal spécifique des protéines d'intérêt, en plus d'être une matière plus résistante que la nitrocellulose.

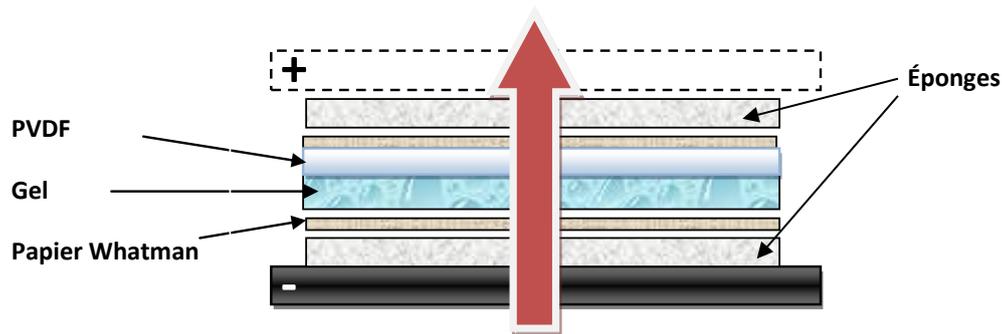


Figure 43. Schéma du montage de transfert des protéines sur membrane de PVDF.

2.3.5. Révélation

Suite au transfert des protéines du gel vers la membrane de PVDF, cette dernière est placée dans une cassette afin d'être rincée avec du tampon de lavage T-TBS 0,1 % (Tween20® Tris Buffered Saline) dont la composition est rappelée dans le tableau XX. Ce tampon permet d'éliminer le méthanol, mais aussi de permettre un rinçage méticuleux du fait de la présence d'un agent tensio-actif non ionique : le Tween 20® (Sigma, France). Cet agent diminue la tension superficielle du tampon TTBS, et permet de retirer tout le tampon de transfert et de bien rincer entre chaque incubation avec les anticorps.

Afin de vérifier si la migration et le transfert se sont déroulés correctement, il est possible d'effectuer un marquage au rouge ponceau à cette étape. Il consiste à incuber la membrane quelques secondes dans du rouge Ponceau (Sigma, France) utilisé pur. Il marque alors toutes les protéines présentes en rouge foncé, avec plus ou moins d'intensité en fonction de la quantité de protéine présente. Il permet donc de vérifier que le dépôt de protéines est homogène, même si ceci sera à nouveau vérifiable à l'aide d'une incubation avec un anticorps détectant une protéine de ménage (Hsc70 ou GAPDH).

Pour permettre la révélation proprement-dite, il est nécessaire d'utiliser deux types d'anticorps : un anticorps primaire, incubé avec la membrane pendant 2 h, et qui reconnaît un épitope spécifique de la protéine d'intérêt étudiée ; et un anticorps secondaire qui a la capacité de s'hybrider sur l'anticorps primaire et qui est couplé à une peroxydase : la Horse Radish Peroxydase (HRP). Une fois les deux anticorps hybridés, la HRP est mise en présence de son substrat (luminol) grâce au kit de chimiluminescence (Pierce® ECL Western Blotting

Substrate, ThermoScientific, France), et par peroxydation de ce dernier, on obtient une émission de photons, imprimables sur des films photographiques (Kodak, Biomax Lightfilm, USA) ou détectables avec une caméra (MF-ChemiBIS 3.2, DNR Bioimaging Systems) (Figure 44). Tous les anticorps utilisés sont dilués dans du lait 2 % Tween Tris Buffer Saline (TTBS) 0,1 %. Les anticorps primaires sont : un anti-SK3 (1/250^{ème}, Sigma Aldrich, France) produit chez le lapin, un anti-GAPDH (1/4000^{ème}, Sigma Aldrich, France) et un anti-Hsc70 (1/30000^{ème}, Tebu-bio, France) issu tous deux de souris. Les anticorps secondaires couplés à la HRP utilisés sont : un anti-lapin (1/10000^{ème}, Jackson Immuno-Research Laboratories, WG, USA) et un anti-souris (1/3000^{ème}, Southern Biotechnologies, USA) tous deux produits chez la chèvre. L'anticorps dirigé contre la protéine SK3 cible les acides aminés 2-21, donc la partie N-term intracellulaire de la protéine.

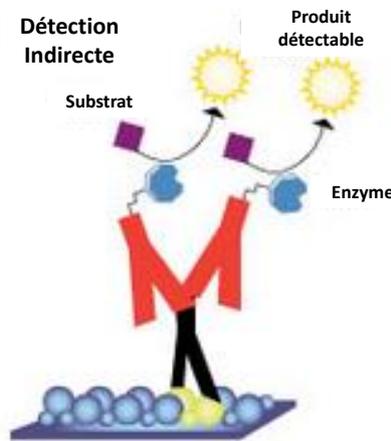


Figure 44. Schéma explicatif de la révélation par chimiluminescence. L'anticorps primaire se fixe sur son épitope (protéine étudiée) puis l'anticorps secondaire se fixe sur l'anticorps primaire, car il reconnaît tous les fragments FAb de l'espèce dans laquelle l'anticorps primaire a été produit. Cet anticorps secondaire est couplé à la peroxydase du Raifort (Horse Radish Peroxydase), qui oxyde le réactif *ECL*, ce qui provoque une émission de photons (source :ThermoScientific : <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4A93DDB6-5056-8A76-4E38-E54A3C46D750>).

Le niveau d'expression de chaque protéine peut être quantifié après numérisation, grâce au logiciel QuantityOne (Bio-Rad, France) et relativisé par rapport au niveau d'expression constant d'une condition à l'autre de la protéine Hsc70, qui constitue un contrôle négatif interne pour chaque expérience. Dans la plupart des cas, les expériences ont été répétées au moins trois fois, mais sans utiliser cette technique de quantification qui ne nous a pas paru pertinente étant donné les résultats clairement visibles et reproductibles.

2.4. Etude des niveaux d'expression des transcrits : PCR semi-quantitative et PCR quantitative

2.4.1. Extraction d'acides ribonucléiques (ARN) totaux

Les cellules sont ensemencées à 1,2 millions dans les flacons 25 cm² et 0,3 million dans des puits de 9,6 cm² (BD Falcon, Belgique). Elles sont ensuite collectées de la même façon que pour le western blot. Les ARN totaux sont extraits grâce au kit d'extraction NucleoSpin® RNA II (Macherey Nagel, Hoerdt, France). Les instructions conseillées par le fournisseur ont été suivies. Brièvement, les cellules sont lysées, le lysat obtenu est filtré sur une colonne de silice, par centrifugation (11000 x g/1 min). Un mélange lysat/éthanol est ensuite chargé sur une colonne de silice puis centrifugé (11000 x g /30 sec). L'ADN est éliminé à l'aide d'une DNase I (endonucléase) avant lavage et assèchement de la colonne contenant les acides nucléiques. L'élution est effectuée grâce à de l'eau dépourvue en RNase par une nouvelle centrifugation de la colonne (11000 x g/1 min). Les ARN totaux obtenus peuvent ensuite être stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

La mesure par spectrométrie de la DO à 260 nm permet d'estimer la quantité d'ARN présent dans l'extrait : une unité de DO à 260 nm correspondant à 40 µg d'ARN/mL. La mesure des DO à 230 et 280 nm renseignent sur le taux de contamination par, respectivement, les solvants d'extraction (éthanol et guanidine présents dans les colonnes d'extraction du kit) et les protéines. Les rapports (DO 260 nm)/ (DO 230 nm) et (DO 260 nm)/(DO 280 nm) doivent être compris entre 1,7 et 2 pour être dans des conditions de pureté optimales.

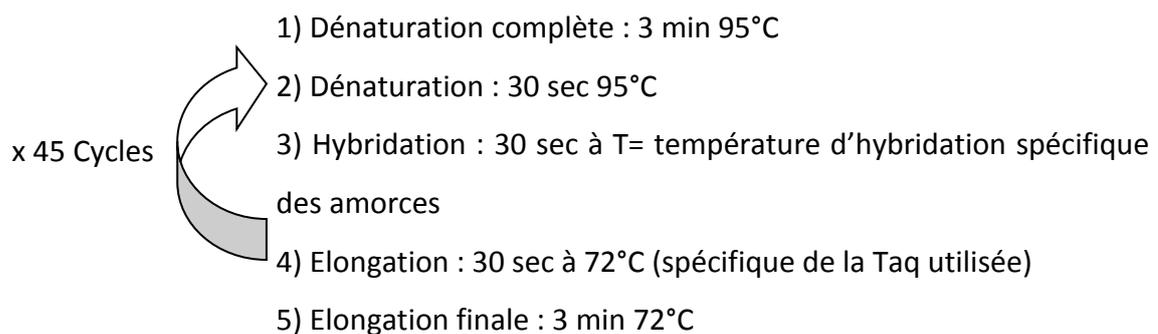
Une fois le dosage effectué, l'intégrité des ARN totaux est vérifiée par migration dans un gel d'agarose 1 % coloré au bromure d'éthidium. La présence de deux bandes nettes, correspondant aux ARN ribosomiaux 28S et 18S, et l'absence de traînées sous la bande 18S, garantissent de cette intégrité.

2.4.2. RT : Reverse-Transcription : Conversion ARN-ADN complémentaire

Ces ARN, pour être quantifiables et identifiables, doivent être amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction) à partir d'amorces spécifiques des transcrits d'intérêt. Cependant, ces ARN doivent au préalable être transformés en ADN complémentaire (ADNc), afin d'être amplifiables par la Taq Polymérase. Ceci est rendu possible par l'utilisation d'une transcriptase inverse (ou RT : Reverse Transcriptase) enzyme capable de synthétiser de l'ADNc à partir de la matrice des ARN totaux ; grâce à des oligonucléotides aléatoires ou pdN6. Grâce au kit Ready-To-Go™ You Prime First-Strand Beads de GE HealthCare (France) à partir de 2,5 µg d'ARN, de l'ADNc est obtenu en quantité suffisante afin de réaliser la PCR proprement dite. Ce kit ne possède pas de dithiothréitol (DTT), qui est un inhibiteur de la PCR quantitative et aurait pu ainsi perturber l'amplification des transcrits.

2.4.3. PCR semi-quantitative ou RT-PCR

Pour réaliser une RT-PCR, un mélange est d'abord préparé (Tableau XX) en fonction du nombre de tubes à tester, puis celui-ci est réparti parmi tous ces tubes. Les échantillons sont ensuite placés dans un thermocycleur, qui va automatiser les cycles de variations de température nécessaires à l'amplification :



Les produits de PCR obtenus sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 2 % après avoir été mélangés avec du tampon de charge (BlueOrange®, Promega, USA). Un volume de marqueur de taille (DNA Ladder 100 pb, Promega, USA) est également déposé. La migration des acides nucléiques s'effectue à 70 V pendant 15 min, elle se fera en fonction de leur taille seulement. Puis, le gel est placé sur une table à UV. Le bromure d'éthidium présent dans le

gel va s'intercaler dans les brins d'ADNc amplifiés, et fluorescer en présence de rayonnement UV. Une caméra permet d'acquérir une photo, qui pourra permettre une quantification de l'expression des transcrits d'intérêt (Tableau 9) grâce au logiciel Quantity One® (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Les ADNc utilisés pour amplifier les ARN 18S ont été au préalable dilués au 1/5.

Composés	Volume (mL/tube)	Concentration finale
Tampon PCR 10x sans Mg ²⁺	10	1x
dNTP 10 mM	1	0.2 mM
MgCl ₂ 50 mM	1.5	1.5 mM
Amorces	2.5	0.5 µM
ADNc	1	-
Polymérase ADN Taq	0.3	1.5 Unités
dH ₂ O (RNase Free)	Qsp 50 µL	-

Tableau 9. Composition du mélange pour l'amplification des transcrits par RT-PCR

2.4.4. PCR quantitative ou qPCR : Méthode « SyberGreen »

Le principe de la qPCR est proche de celui de la RT-PCR, puisqu'elle consiste également à amplifier de manière sélective un fragment d'ADNc spécifique du gène étudié. Les cellules sont cultivées dans des plaques 6 puits (BD Falcon™, Belgique) pendant une période de 48 à 72h selon les traitements (transfection ou drogues). Puis les cellules sont lysées et les ARN totaux extraits à l'aide du kit d'extraction NucleoSpin RNA II selon la technique décrite précédemment. L'ARN ainsi récupéré puis transformé en ADNc par une réaction de transcription inverse (RT) est placé dans des plaques 96 puits opaques blanches. On réalise un mélange contenant les amorces spécifiques des gènes étudiés (Tableau 10), le SYBR® Green (Invitrogen, Life Technologies, France) afin de limiter les pipetages et donc les erreurs de volumes.

Tous les couples d'amorces ont été testés au préalable afin de calculer leur efficacité. Il s'agit d'évaluer le nombre de copies qui seront ajoutées à chaque cycle. Une efficacité de 2 correspond à l'efficacité maximale (100 %), et dans ce cas le nombre de copies est donné par la formule suivante : 2^n , avec n étant le nombre de cycles d'amplification.

Amorces utilisées	Séquence	Taille (pb)	Température d'hybridation (°C)	Nombre de cycles
SK3 Exon5-exon7	F 5' TGGACACTCAGCTCACCAAG R 5' GTTCCATCTTGACGCTCCTC	174	57	30
SK3 Exon1-exon3	F 5' GTTTGGAATTGTTGTTATGGTGA R 5' ACGGTCCAGGCAGCAATGAT	558	54	35
18S	F 5' CGCGGTTCTATTTTGTGGTTTT R 5' TTCGCTCTGGTCCGTCTTG	121	60	25
SK ₂	F 5' GACTTGGCAAAGACCCAGAA R 5' CCGCTCAGCATTGTAAGTGA	230	57	40
SK3 Exon1-exon2	F 5' GTTTGGAATTGTTGTTATGGTGA R 5' GATGATCAAGCCCAAAGGA	130	63	60
HRPT -1	F 5' TGACCTTGATTTATTTTGCATACC R 5' CGAGCAAGACGTTCAAGTCCT	102	63	60

Tableau 10. Amorces utilisées pour amplifier les gènes d'intérêts par PCR : **en bleu** les amorces utilisées pour la RT-PCR et **en vert** les amorces utilisées pour la qPCR.

Dans nos conditions, les efficacités des amorces testées ont toujours été comprises entre 1.85 et 2, ce qui correspond à des efficacités comprises entre 85 % et 100 %. Si l'un des couples d'amorces testés avait une efficacité inférieure à 85 %, ce couple d'amorce n'était pas utilisé. Afin d'obtenir cette valeur d'efficacité, une gamme de matrice a été réalisée (allant de 200 ng à 20 ng), également appelée « dilution limite ». Cette gamme permet d'étudier un couple d'amorces en observant le degré d'amplification du gène étudié en fonction de la concentration en matrice. On dépose donc des quantités différentes de matrices dans des puits différents, puis la même quantité de réactif SYBR Green et d'amorces (6,25 µM). On relève ensuite les différents Ct obtenus à l'aide du thermocycleur. Ces Ct ou Cycle threshold, correspondent aux cycles à partir desquels les amplicons sortent du bruit de fond (Figure 45)

Ces Ct sont ensuite exprimés en fonction du logarithme décimal de la concentration en matrice d'ADNc, et la pente de la droite obtenue donne l'efficacité du couple d'amorces grâce à la relation suivante :

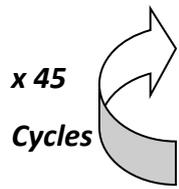
$$\text{Pente} = -1 / \log(\text{efficacité})$$

Le SYBR® Green est un réactif contenant la polymérase recombinante Taq dont l'activité est inhibée grâce à la présence d'un anticorps bloquant son activité à température ambiante, cette inhibition est donc levée par la première étape de la qPCR de dénaturation à 95 °C. Il contient également des nucléotides UDG et dUTP qui permettent d'éviter la ré-amplification des produits de PCR obtenus entre chaque réaction. En effet, le dUTP permet d'obtenir des ADN amplifiés contenant de l'uracil, et l'UDG (uracil DNA glycosylase) retire les résidus uracil des simples et doubles brins d'ADN. Puis l'UDG est inactivé par les hautes températures (en particulier celle de l'étape de dénaturation) ce qui permet d'autoriser l'amplification des séquences d'intérêt. De plus, ce réactif contient un marqueur fluorescent qui se lie directement à l'ADN double brin, de manière spécifique (dsDNA : double stranded DNA). Au sein de la réaction de qPCR ce marqueur fluorescent va permettre de suivre l'accumulation de dsDNA, car la quantité de dsDNA et le signal émis par le SYBR Green sont proportionnels (Figure 45). La sensibilité de ce marqueur est très élevée, puisqu'il permet de détecter 10 copies du gène d'intérêt dans un échantillon de 1 pg d'ADNc.

Il est possible d'ajouter du MgCl₂ qui agit comme cofacteur de cette polymérisation, ce qui augmente le rendement. Nous n'avons pas souhaité ajouter de MgCl₂ car le mélange de SYBR Green en contient déjà 6 mM, concentration qui nous a parue suffisante et qui nous a permis d'obtenir des résultats satisfaisants. D'autres composés sont présents dans ce réactif, tels que tous les désoxyribonucléotides nécessaires à la réaction (dATP, dGTP, dCTP, dUTP, à la concentration de 400 μM pour les trois premiers, et de 800 μM pour le dernier), ou encore du Tris HCl.

Au sein de chaque puits, on trouve donc : 2,5 μL d'ADNc (équivalent à 195 ng d'ARN en supposant que la RT a été efficace à 100 %), ainsi que 5 μL de réactif SYBR Green et 1 μL de chaque amorce (Reverse et Forward). On complète avec de l'eau pure sans RNase ni DNase afin d'obtenir un volume réactionnel de 10 μL.

Concernant la réaction de qPCR proprement dite, elle a été effectuée dans des plaques 96 puits (Frame Star 480, 4titude, UK) blanches opaques (pour éviter la perte de signal fluorescent), qui a ensuite été placée dans un thermocycleur contenant une cellule photoréceptrice et un photomultiplicateur (LightCycler 480, Roche, USA) permettant de réaliser les cycles de variation de température ainsi que de détecter et d'amplifier le signal fluorescent envoyé par le SYBR Green couplé à l'ADN ainsi produit. Le cycle effectué par le programme est le suivant :

- 
- 1/ Pré-incubation de 5 min à 50°C (permet d'activer la *Taq*)
 - 2/ 10 min à 95°C : Dés-hybridation des deux brins de l'ADN de la matrice
 - 3/ 10 sec à 95°C : Dés-hybridation à chaque cycle
 - 4/ 30 sec à 60°C : température d'hybridation des amorces = T_m *
 - 5/ 20 sec à 72°C : température d'élongation de l'ADN: ajout de dNTP complémentaires

* : La T_m : *melting temperature* ou température d'hybridation des amorces est spécifique des amorces utilisées, et identique pour les couples d'amorces d'intérêts testés ici.

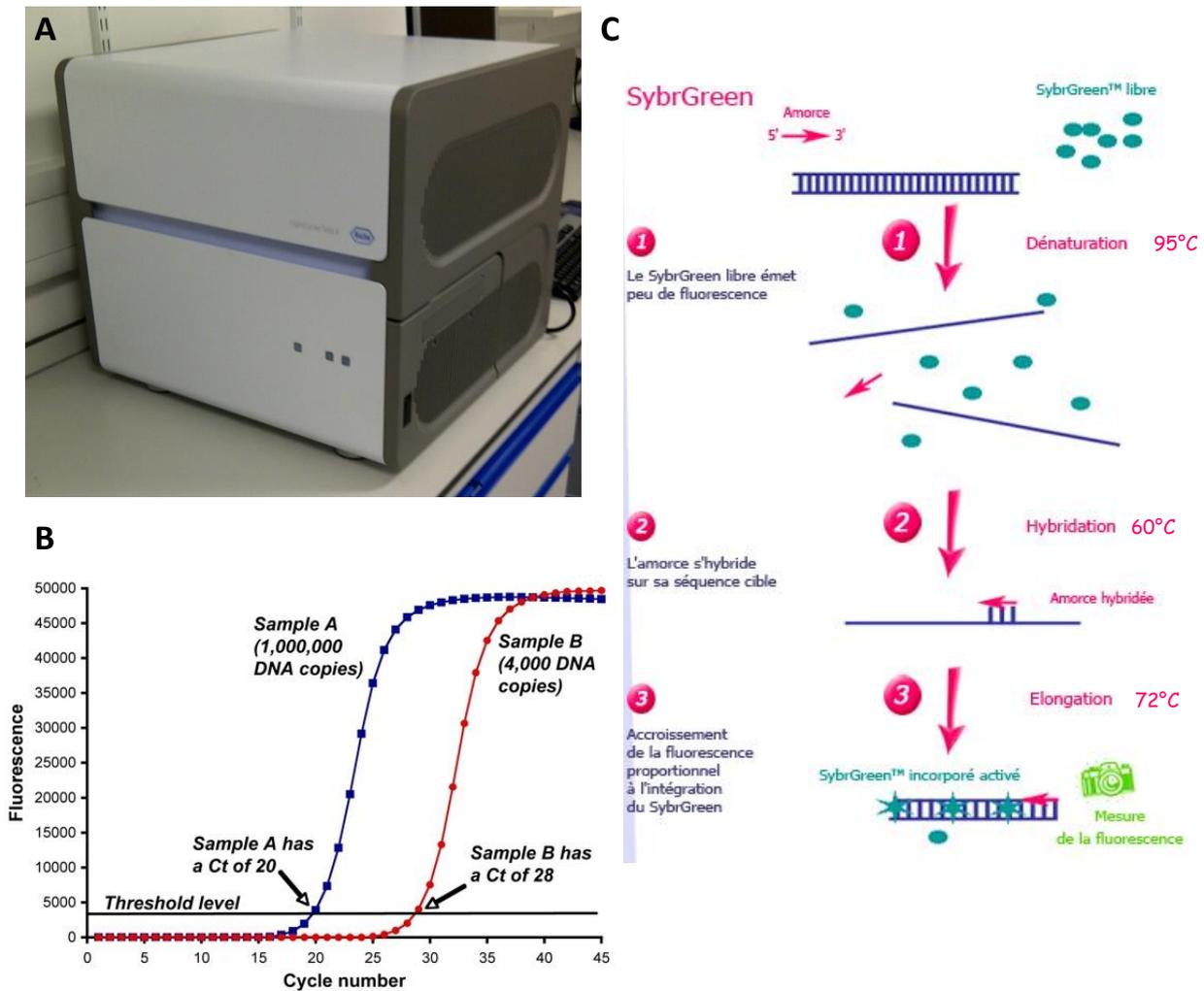


Figure 45. Technique de PCR quantitative A. LightCycler 480 Roche vue d'ensemble B. Exemples de courbes de fusion obtenues et de détermination du Ct (Cycle threshold) : L'échantillon A possède un Ct plus petit que l'échantillon B, car le nombre de copies de cet amplicon est beaucoup plus important dans l'échantillon A (100000 vs 4000) C. Principe de la PCR quantitative SYBR Green : à chaque cycle, le SYBR Green est inséré dans les brins d'ADN néo-synthétisés (modifié d'après le site internet <http://www.roche-applied-science.com/>).

2.5. Mesure de la concentration d'AMPc intracellulaire : dosage ELISA et sonde de FRET

2.5.1. Mesure sur cellules vivantes : sonde FRET Epac-2-camp

Le laboratoire INSERM UMR-S 769 Signalisation et Physiopathologie Cardiaque situé à Chatenay Malabry utilise une sonde (Epac2camp) permettant de détecter la quantité d'AMPc dans une cellule infectée avec un adénovirus contenant l'ADNc de cette sonde, de manière instantanée. Cette sonde est une sonde de FRET (Fluorescence Resonance Energy

Transfer) constituée de deux parties de la protéine Epac2 reliées chacune à un fluorophore (CFP/YFP) (Nikolaev *et al.*, 2004). Cette protéine d'échange permet d'apporter le GTP nécessaire au fonctionnement de petites protéines G telles que Rap1. Cette activité de facteur d'échange est dépendante de l'AMPC intracellulaire, qui possède un site de fixation sur Epac. Lorsque l'AMPC se fixe sur Epac, la protéine Epac se déplie, les deux fluorophores s'éloignent l'un de l'autre et il y a ainsi perte du FRET entre l'YFP et la CFP. Plus il y a d'AMPC dans la cellule, et plus le signal CFP augmente, et le *ratio* d'émission CFP/YFP est proportionnel à la $[AMPC]_{int}$ (Figure 46).

Les expériences ont été réalisées à température ambiante, sur une installation qui se compose principalement d'un microscope inversé à épi-fluorescence (Nikon TE 300) relié à une caméra CCD (cool charged coupled, Sensicam PE, PCO) le tout connecté à un ordinateur, permettant l'enregistrement d'une image toutes les 5s. Le fluorophore CFP est excité pendant 300 ms à l'aide d'une lampe au Xénon (Nikon) possédant un filtre et un miroir dichroïque. L'utilisation d'un séparateur d'émission (Optosplit II, Cairn Research) permet de recueillir deux images simultanées, une pour l'émission du CFP, l'autre pour celle de l'YFP.

Au préalable, les cellules sont infectées avec un adénovirus contenant la sonde Epac2camp à raison de 100 particules virales par cellule (MOI : 100). Les cellules sont ensuite placées dans des boîtes de pétri (fluorodishes) de 10 cm² contenant une plaque de verre circulaire (2 cm²), qui sont perfusées en permanence avec du PSS, contenant des drogues ou des molécules à tester. Cette installation a permis d'étudier les effets d'une diminution de Ca²⁺ extracellulaire sur le taux d'AMPC intracellulaire. Les limites de cette expérience sont multiples. Dans ce système, le fait qu'il s'agisse d'une sonde fluorescente autorise son « *bleaching* » et donc la perte de signal au cours de la mesure. De plus, la mesure des variations d'AMPC intracellulaire à l'aide de la sonde FRET est relative, puisqu'il s'agit d'un ratio CFP/YFP, et ne donne pas d'indication quantitative de la $[AMPC]_{int}$. Pour mesurer cette concentration, il faudrait réaliser une courbe de calibration, à l'aide de concentrations connues, auxquelles correspondraient des valeurs de ratio CFP/YFP permettant ainsi de déterminer plus précisément la $[AMPC]_{int}$.

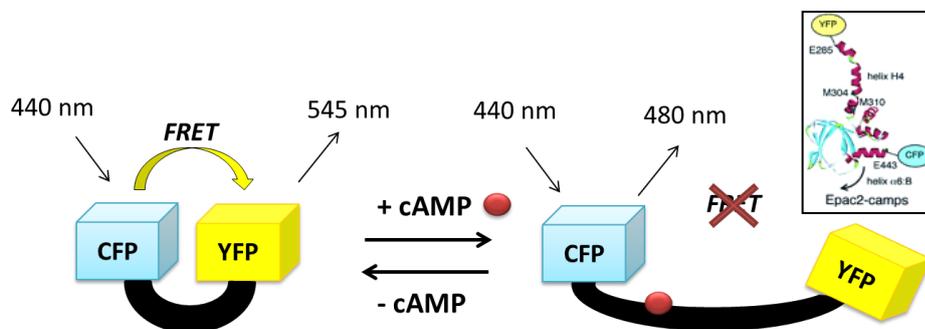


Figure 46. Structure de la sonde Epac2camp et mécanisme de détection des variations d'AMPC intracellulaires. En absence d'AMPC, le fluorophore CFP est excité à 440 nm, et transfère sa fluorescence émise au fluorophore YFP, ce qui entraîne une émission de fluorescence à 545 nm. La présence d'AMPC va éloigner les deux fluorophores par changement conformationnel, et il y aura perte du signal de FRET. Le ratio CFP/YFP augmentera alors, permettant d'identifier une augmentation d'AMPC (Modifié d'après (Nikolaev *et al.*, 2004) et (Leroy *et al.*, 2008)).

2.5.2. Dosage ELISA de l'AMPC intracellulaire

Afin de doser plus précisément la $[AMPC]_{int}$ présente dans les cellules MDA-MB-435s, le kit « Monoclonal Anti-cAMP Antibody Based Direct cAMP ELISA Kit » a été utilisé (NewEast Biosciences, USA). Le principe de ce test est d'établir une compétition entre le cAMP-HRP fourni par le kit dont la quantité est connue et l'AMPC intracellulaire dans leur fixation sur un anticorps complexé au fond des puits de la plaque d'ELISA.

Les cellules sont implantées puis traitées le lendemain avec 1 μM de FSK (contrôle positif) ou des $[Ca^{2+}]_{ext}$ variables (de 400 μM à 5 mM) et ce pour 30 min (traitement aigu). Puis les cellules sont lysées à l'aide d'un tampon contenant 0.1 M HCl et 1 % de Triton X100. L'acide chlorhydrique permet d'inhiber toutes les réactions enzymatiques ayant lieu à pH neutre en acidifiant extrêmement la préparation cellulaire (pH 1.0), et donc en particulier les phosphodiésterases et les autres enzymes régulant la quantité d'AMPC. Le Triton X100 est un détergent qui permet de solubiliser toutes les membranes cellulaires afin d'obtenir un lysat homogène. Le kit contient une plaque 96 puits contenant des puits au fond desquels les anticorps anti-cAMP (chèvre) vont pouvoir venir se complexer, grâce à la présence d'anticorps secondaires reconnaissant spécifiquement les anticorps produit chez la chèvre. La première étape consiste en l'ajout d'un agent neutralisant permettant de rétablir un pH neutre et de stopper la lyse cellulaire. Puis, les échantillons et la gamme de standard (AMPC en concentration connue) sont déposés dans leurs puits respectif. Ensuite, le conjugué cAMP-HRP est ajouté, pour saturer tous les sites non spécifiques du puits. L'ajout de l'anticorps anti-cAMP ainsi qu'une incubation de 2 h à température ambiante va permettre

de le complexer avec les anticorps anti-chèvre qui tapissent le fond du puits, et de reconnaître toute forme d'AMPC présente dans le mélange : l'AMPC intracellulaire et le conjugué cAMP-HRP. Ce conjugué est capable d'émettre des photons quand il est mis en présence de son substrat (luminol oxydé en 3-aminophthalate), et il entre en compétition avec l'AMPC intracellulaire afin de doser ce dernier. Plus il y a d'AMPC intracellulaire, et moins le cAMP-HRP va se complexer aux anticorps anti-cAMP situés au fond du puits et donc moins il y aura d'émission de photons, détectables par spectrophotométrie (Figure 47). La mesure de la DO s'effectue à $\lambda = 450$ nm, corrigée à l'aide d'une deuxième lecture à $\lambda = 580$ nm. Afin d'obtenir une [AMPC] en $\mu\text{g/mL}$, et ce pour chaque expérience, on établit une nouvelle courbe-étalon à partir de la mesure de DO dans les puits représentant la gamme de concentration connue du standard AMPC. Ainsi, plus la DO est élevée et moins il y a d'AMPC, et inversement, du fait de cette compétition.

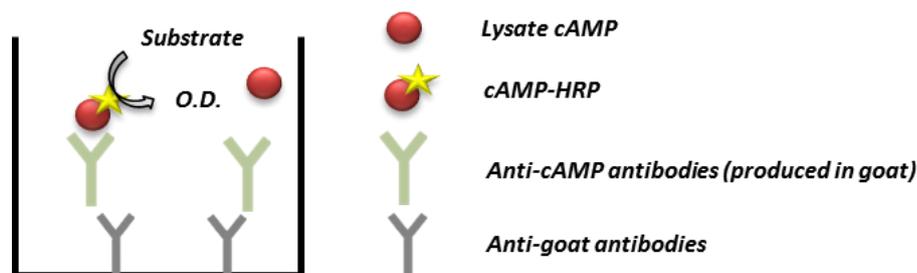


Figure 47. Principe du dosage de l'AMPC intracellulaire à l'aide du kit NewEast Biosciences (modifié à partir de [http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-500 %20Fig %201 %281 %29.jpg](http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA-500%20Fig%201%281%29.jpg)).

2.6. Biologie Moléculaire :

Plusieurs techniques ont été utilisées afin de surexprimer ou d'invalider l'expression de certaines protéines, en touchant l'expression de leurs ARNm. Le fait de rechercher à modifier l'expression d'une protéine oblige à utiliser des séquences géniques qui vont soit s'intégrer dans le génome de manière stable ou transitoire (shRNA et vecteurs d'expression) soit s'hybrider à l'ARNm spécifique de cette protéine et entraîner sa dégradation sélective (siRNA).

2.6.1. Vecteurs d'expression:

Les vecteurs utilisés au cours de cette thèse sont principalement des plasmides, courtes séquences d'ADN double brin capables de s'intégrer dans l'ADN des cellules d'intérêt.

a) Préparation des plasmides

Les plasmides utilisés ont été soit achetés soit donnés par différents chercheurs travaillant dans des domaines de recherches proches de celui du laboratoire. Le nom et la provenance des plasmides sont répertoriés dans le tableau 11, ainsi que le vecteur utilisé.

Nom plasmide	Résistance Bactéries	Antibiotique de sélection/luc +/-
pGL 4.17 vide	AMPI	Néomycine
pGL 4.17 PROM SK3	AMPI	Néomycine/luc +
pGL 4.14 TK Renilla Luc	AMPI	Néomycine/luc +
pSG5 vide	AMPI	Transfection transitoire
pSG5 CREM α Antisens	AMPI	Transfection transitoire
pCR3.1 hCaSR YFP	KANA	Transfection transitoire

Tableau 11. Liste des plasmides utilisés. (AMPI : Ampicilline, Luc : Activité luciférase)

b) Transformation bactérienne

Une fois reçus, les plasmides doivent être amplifiés afin d'obtenir un nombre de copies suffisant afin de permettre la transfection ou la transduction des cellules étudiées. La première étape consiste à transférer la séquence plasmidique dans des bactéries qui sont rendues compétentes, c'est-à-dire capables de recevoir ce plasmide, on parle de transformation bactérienne. Les bactéries utilisées sont les entérobactéries de la souche dH5 α (Invitrogen, France) qui sont compétentes et vont pouvoir intégrer le plasmide d'intérêt par choc thermique. La transformation bactérienne consiste à mettre en présence 1 μ L de plasmide (équivalent généralement à 10 ng de plasmide) avec 50 μ L de bactéries décongelées sur glace (5 min). Puis ce mélange subit choc thermique en passant de 42°C (bain marie ou plaque chauffante recevant les tubes de 1.5 mL) pendant 45 secondes, à un refroidissement sur glace de 2 min, afin de figer à nouveau la membrane bactérienne. Le mélange est alors placé dans 450 μ L de milieu SOC (Invitrogen, France) pendant 1 h à 37 °C dans un incubateur sous agitation (225 rpm). Enfin, un volume de 50 μ L est prélevé afin d'être déposé sur une boîte de pétri tapissée de milieu LB-agar (20 g/L de LB, et 12 g/L

d'agar) contenant l'antibiotique permettant de sélectionner seulement les bactéries ayant intégré le plasmide. En effet, chaque plasmide utilisé ici possède un gène de résistance à l'un des antibiotiques suivants : ampicilline ou kanamycine.

c) Amplification bactérienne

La boîte est placée face inversée dans l'incubateur (37 °C, étuve) pour la nuit. Le lendemain, une ou plusieurs colonies sont sélectionnées et récupérées à l'aide d'un cône, afin d'être placée en pré-culture de 5 mL de milieu LB Broth contenant à nouveau l'antibiotique de sélection, durant 6 h à 37 °C et 225 rpm. Puis cette préculture est utilisée ensuite pour ensemercer les bactéries dans 100 mL de LB Broth contenant également l'antibiotique. Cette culture a lieu sur une nuit ou 12 h à 37 °C avec une agitation de 225 rpm.

d) Purification des plasmides

Une fois la culture terminée, les bactéries sont récoltées et 95 % du volume de culture est utilisé afin de réaliser l'extraction et la purification de l'ADN plasmidique (ADNpl) ainsi produit. Les 5 % de volume restants sont utilisés pour constituer un stock de bactéries transformées avec le plasmide d'intérêt. Ce stock est congelé à -80 °C, et est constitué de 60 % de bactéries en milieu LB Broth et de 40 % de glycérol stérile (autoclavé ou filtré sur des filtres avec des pores de 0.2 µm de diamètre). Cette étape permet donc de réaliser une nouvelle culture bactérienne, et donc une nouvelle amplification de l'ADNpl sans passer par une étape de transformation. L'extraction de l'ADNpl est réalisée à l'aide du Kit NucleoBond® Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel, Hoerd, France). Le principe de ce kit repose sur le fait que l'ADN soit chargé négativement, ce qui lui permet d'être retenu par la colonne échangeuse d'ions fournie dans ce kit. Le volume de culture bactérienne est d'abord centrifugé, puis le culot contenant les bactéries est repris avec un tampon de resuspension qui permet d'homogénéiser la suspension bactérienne et qui contient également une RNase A, qui élimine ainsi l'ARN bactérien contaminant. Puis l'ajout d'un second tampon contenant du SDS permet la lyse bactérienne par dissociation des lipides membranaires. Le temps d'incubation durant cette lyse doit être réduit afin d'éviter la dégradation de l'ADNpl du fait d'une longue exposition aux conditions fortement alcalines de ce tampon. De même, cette étape est critique car l'utilisation d'un vortex ou d'une agitation trop prononcée peut détruire l'ADN chromosomique bactérien et ajouter des débris en contaminant l'ADNpl

extrait. Enfin, la lyse cellulaire alcaline est stoppée par l'ajout d'un tampon de neutralisation qui va également précipiter les protéines et l'ADN chromosomique bactérien. En effet, le pH très alcalin (13.0) du tampon de lyse dénature l'ADN qu'il soit bactérien ou plasmidique, or l'ADN chromosomique bactérien est beaucoup plus long que l'ADNpl et lorsque l'on ajoute le tampon de neutralisation (retour à un pH physiologique) l'ADNpl retrouve quasi-instantanément sa structure native double brin, alors que l'ADN chromosomique précipite. En effet, cet ADN est si long qu'il se réapparie de manière anarchique, et devient insoluble dans l'eau. Ceci permet de séparer les deux phases : la phase liquide contenant l'ADN plasmidique d'intérêt, et le précipitât qui contient les protéines et l'ADN bactérien. La phase liquide va pouvoir être ajoutée dans le tube contenant la colonne d'extraction afin que celle-ci ne retienne que l'ADNpl. Au préalable, la colonne échangeuse d'anions doit être équilibrée afin d'être chargée positivement. Une fois cette étape réalisée, la phase liquide contenant l'ADNpl est chargée sur cette colonne, qui va retenir cet ADNpl, chargé négativement de manière constitutive. Puis la colonne est lavée afin d'éliminer les traces de tampons utilisés et d'améliorer la pureté de l'échantillon. Enfin, l'ADNpl est détaché de la colonne d'extraction à l'aide d'un tampon d'éluat contenant des molécules chargées positivement, qui entraînent l'ADNpl dans l'éluât. Ce dernier est dosé par spectrométrie (1 u.a. de DO à 260 nm = 50 µg/mL d'ADNpl) avant précipitation afin de déterminer le rendement de l'extraction plasmidique. Une étape de précipitation d'ADN est alors nécessaire afin de concentrer l'échantillon en ADN, qui se stockeront mieux ainsi à -20°C. Cette étape est permise grâce à l'ajout d'isopropanol, un alcool, qui va permettre de séparer l'ADN de la phase aqueuse de l'éluât par précipitation. Ensuite, deux options sont possibles, la première qui consiste à réaliser des culots contenant l'ADNpl par centrifugation à 5000 x g pendant 5 min, puis lavage à l'éthanol 70 % des culots, qui sera éliminé par évaporation, puis les culots repris dans de l'eau stérile DNase-free. L'autre option est d'utiliser le NucleoBond Finalizer® fourni dans le kit utilisé, ce qui consiste à récupérer sélectivement l'ADNpl suite à sa précipitation par l'isopropanol. La membrane du Finalizer® est ensuite rincée à l'éthanol 70 %, puis séchée en réalisant plusieurs cycles d'aspiration/refoulement d'air à l'aide de seringues de 50 mL. Enfin, l'éluat est réalisé à l'aide du tampon TE (Tris-EDTA) fourni par le fabricant ou d'eau stérile DNase-free. La première éluat peut être repassée dans le Finalizer® afin d'augmenter le rendement. Le volume d'éluat est adapté en fonction de la

DO à la λ de 260 nm mesurée avant précipitation de l'ADN afin d'obtenir une concentration satisfaisante d'ADNpl (entre 200 et 2 mL pour obtenir généralement une concentration en ADN comprise entre 0.1 et 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). La mesure de la DO aux λ de 280 et 230 nm permettent de renseigner sur la contamination protéique et par les solvants utilisés pour l'extraction, respectivement. Une fois les ADNpl concentrés, ils sont stockés à -20°C afin d'être conservés jusqu'à utilisation.

Il existe certaines limites dans l'utilisation de ces kits d'extraction, qui sont principalement liées à la perte de matériel d'intérêt du fait des nombreuses étapes critiques comme la lyse alcaline ou encore la précipitation ou le passage dans le Finalizer®. Ce sont autant d'étapes pour lesquelles il convient d'être vigilants quant aux durées d'incubation afin d'éviter au maximum la dégradation de l'ADNpl, ou la contamination par les protéines ou l'ADN chromosomique bactérien.

Une fois ces plasmides obtenus, leur pureté est contrôlée à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % contenant au bromure d'éthidium (BET). Ce marqueur va s'intercaler dans les brins d'ADN, et fluorescer lorsqu'il sera exposé aux rayons UV. La présence d'une bande unique de la taille du plasmide garantie l'intégrité du plasmide. Enfin, l'absence de « smear » ou trainée, représentative de la dégradation de l'ADN, permet également de s'assurer de cette intégrité mais aussi de la non-contamination par de l'ADN chromosomique ou par d'autres déchets nucléiques.

Ces plasmides vont pouvoir être utilisés pour réaliser des transfections transitoires et stables au sein des cellules étudiées.

2.6.2. Transfections transitoires:

a) « Small interfering RNA »: siRNA

Afin d'invalider de manière transitoire l'expression des ARNm d'intérêt, des petites séquences interférentes d'ARN ont été utilisées (siRNA). Ces siRNA sont complexés à la Lipofectamine RNAimax® (Invitrogen, France,) dans du milieu sans sérum (DMEM ou Optimem ; 250 μL par puits de plaque 6 puits) lors d'une incubation de 20 min dans des tubes de 15 mL en polypropylène (plastique traité qui évite l'adhérence de molécules sur la paroi). Les volumes de milieu et quantités de siRNA sont adaptées en fonction du nombre de

cellules à transférer. Par exemple, 3 μ L de Lipofectamine sont utilisés pour transférer 150 pmoles de siRNA dans 300000 cellules, ce qui correspond à un puits de plaque 6 puits.

Les siRNA sont ensuite mis en présence des cellules pendant 6h dans le milieu sans sérum (Tableau 12). Puis, du milieu avec sérum est ajouté dans les puits contenant les cellules transférées, afin de les maintenir en culture pendant 24 à 92 h. Le fait d'utiliser la Lipofectamine RNAimax® permet une meilleure pénétration du siRNA dans les cellules, car cet agent transfectant, qui permet la formation de liposomes, est constitué de lipides cationiques qui vont pouvoir se complexer facilement à l'ARN interférent d'intérêt (chargé négativement). Ce complexe va ensuite pouvoir passer plus aisément à travers la membrane plasmique, par endocytose.

Nom du siRNA	Séquence	Taille (pb)
siCTL	5' CUGUAUCGAAUCUUAUGAGCC	23
	5' GGCUCAUAACAUUCGAUACAG	23
siCaSR	5' GGAGUCUGUGGAAUGUAUCAGGUAU	25
	5' AUACCUGAUACAUCCACAGACUCC	25

Tableau 12. Tableau des séquences de siRNA utilisés ici.

b) Surexpression transitoire de protéines d'intérêt :

Afin d'étudier l'effet d'une protéine absente ou faiblement exprimée de manière constitutive dans un modèle cellulaire, il est possible de surexprimer celle-ci en utilisant un plasmide contenant la séquence génique permettant son expression transitoire par la machinerie cellulaire des cellules étudiées.

Cette technique permet d'étudier la manière dont les cellules reçoivent ces plasmides, avant de tenter de transférer ces plasmides de manière stable ; mais elle permet également d'étudier directement et transitoirement l'effet de la surexpression d'une protéine. C'est le cas du CaSR dans notre étude. Le plasmide contenant la séquence codant pour le CaSR fusionné à la YFP (Letz *et al.*, 2010) a été transféré de manière transitoire dans les cellules MDA-MB-435s et dans les cellules HEK 293T afin d'étudier l'impact de cette surexpression du CaSR dans des cellules l'exprimant déjà mais faiblement, ou ne l'exprimant pas de manière native, respectivement. L'avantage du plasmide utilisé est que la protéine hCaSR ainsi produite est étiquetée avec un fluorophore YFP, ce qui permet de vérifier l'efficacité de transfection très facilement grâce à un microscope à épifluorescence.

Les cellules sont implantées la veille dans des plaques 6 puits de manière à obtenir 80 % de confluence le lendemain. Le jour de la transfection, le plasmide (1 µg) est placé dans de l'Optimem® (250 µL) et incubé pendant 10 min, tandis que dans un autre tube 3 µL Lipofectamine 2000® (Invitrogen, France) sont placés dans le même volume d'Optimem®. L'absence de sérum permet d'éviter que les protéines et lipides du sérum se complexent soit au plasmide soit à l'agent lipofectant en réduisant l'efficacité de transfection. Puis le contenu du premier tube contenant le plasmide est ajouté au goutte à goutte dans le second tube, et le mélange est ensuite homogénéisé par une légère agitation. Ce mélange est ensuite incubé pendant 20 min au cours desquelles les complexes lipofectamine/plasmide se forment, puis le mélange est ajouté sur les cellules pour 6 h d'incubation à 37 °C en présence de 5 % de CO₂. Suite à cette période d'incubation, du milieu correspondant et contenant du SVF est ajouté dans chaque puits, afin de maintenir les cellules pendant toute la durée de la transfection (24 à 72 h).

Suite à ces modifications d'expression, les cellules sont soumises à des tests fonctionnels (patch-clamp ; migration ; immunofluorescence ; mesure de Ca²⁺ extracellulaire..) ou analytiques (qPCR, western blot...).

2.6.3. Transfection stable:

Une fois les plasmides testés de manière transitoire, afin de déterminer la quantité de plasmide optimale (compromis entre toxicité et efficacité), ils peuvent être transduits dans les cellules d'intérêt. Ces plasmides contiennent une séquence d'intérêt, que l'on nomme « insert ». Cette transduction stable permet que l'insert soit intégré dans l'ADN cellulaire, pour que les séquences contenues dans celui-ci puissent être transcrites de manière constitutive et stable dans le modèle cellulaire étudié.

transfection. Une fois la meilleure concentration déterminée, il a fallu sélectionner les cellules ayant intégré l'insert dans leur génome. Pour cela, le plasmide pGL4.17 dans lequel est insérée la séquence du promoteur étudié possède également une séquence permettant d'obtenir une résistance à la généticine (G418), un antibiotique de sélection. Un traitement à l'aide de 1 mg/mL de G418 durant une semaine, puis 0.8 mg/mL pendant la semaine suivante, permet d'obtenir 80 % de cellules transfectées avec le plasmide d'intérêt, et d'éliminer toutes les autres cellules. Les cellules sont ensuite utilisées comme toute autre lignée, sans continuer le traitement par antibiotiques, qui pourrait altérer les réponses cellulaires lors des différents tests effectués. Ces cellules ont été cryogénisées afin d'être stockées à -80 °C.

2.6.4. Mutagénèse dirigée

L'objectif de cette expérience est d'obtenir un plasmide contenant la séquence du promoteur *KCNN3* mais avec une mutation ponctuelle située sur le site CRE (cAMP Response Element), afin d'identifier l'importance de ce site dans la régulation de la transcription du canal SK3. Il n'existe qu'un site CRE identifié sur la séquence du promoteur *KCNN3*.

Le plasmide utilisé est donc le plasmide pGL4.17-pSK3-luc qui contient 7.8 kb dont la séquence du promoteur *KCNN3* (2.2 kb). Le principe de l'expérience est de réaliser une PCR classique, mais avec des amorces qui s'hybrident avec la séquence située aux alentours du site CRE étudié, sauf au niveau d'un ou deux nucléotides que l'on a remplacés afin d'éliminer le site CRE (séquence consensus : *TGACGTCA*). Afin de faciliter l'expérience, au sein de ces amorces d'autres nucléotides ont été modifiés afin d'insérer deux sites de clivage par une endonucléase de restriction (Kpn I et Xho I) en aval et en amont du site CRE, ce qui permettra de cliver la séquence d'intérêt afin de vérifier que la mutagénèse a été efficace. Les séquences des amorces sont reportées dans le tableau 13, et la figure 49 présente un schéma expliquant la façon dont le site CRE a été muté par mutagénèse dirigée.

Nom amorce	Séquence	Tm (°C)	% GC
Mutation CRE et insertion site Xho I	F. 5' CCTGCTTCTGTGACCTcGAgGTTGTTACTCAACACC 3'	80,03	53
	R. 5' GGTGTTGAGTAACAACcTCgAGGTCACAGAAGCAGG 3'		
Insertion site Kpn I	F. 5' GAACAACCACTTgGTACcGAATATCATAGTGGAATGC 3'	76,48	42
	R. 5' GCATTTCACACTATGATATTCgGTACcAAGTGGTTGTTC 3'		

Tableau 13. Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée. Les nucléotides en rouge sont celles qui vont permettre d'induire la mutation du site CRE et l'insertion des deux néo-sites de restriction.

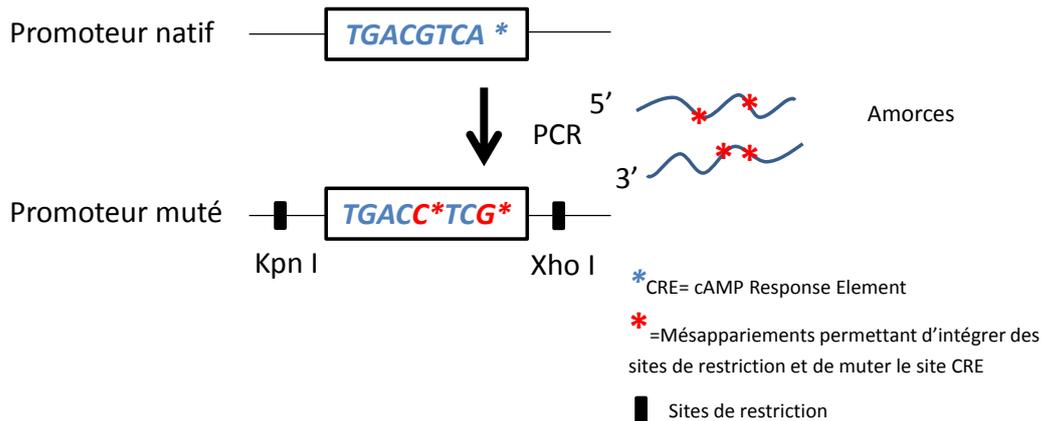


Figure 49. Principe de la mutagenèse dirigée utilisée ici pour muter le site CRE. Le promoteur natif a subi une PCR avec des amorces présentant des mésappariements. Ces derniers n'empêchent pas la liaison entre la matrice (promoteur natif) et les amorces balayant toute la séquence du promoteur *KCNN3* natif, ce qui permet d'amplifier ce promoteur avec des nucléotides remplaçant les nucléotides d'origine, induisant une mutation ciblée du promoteur, sur le site CRE. Ces amorces ont également permis d'insérer deux sites de restriction pour les enzymes de restriction Kpn I et Xho I.

La PCR s'effectue avec 10 ng de plasmide que l'on ajoute dans un tube thermosensible (permettant le chauffage homogène dans tout le tube) contenant du tampon PCR (5µL, 10x). Chaque primer est ajouté (125 ng) ainsi que des nucléotides dNTP (dCTP, dGTP, dATP, et dTTP). La présence de QuickSolution (3µL) permet d'améliorer la polymérisation de l'ADN à l'aide de la DNA polymérase *PfuUltra* HF (2.5U). Le cycle utilisé est le suivant :

- 95°C pendant 1 min
 - 95°C pendant 50 sec
 - 60°C pendant 50 sec
 - 68°C pendant 7,8 min (1min/kb de plasmide)
 - 68°C pendant 7 min
- X 18 Cycles

La polymérase *PfuUltra* HF est une polymérase à ADN présentant un haut degré de fidélité lors du processus de polymérisation (HF : High Fidelity), qui est 18 fois plus important que lors de la synthèse d'ADN par la polymérase classique Taq.

Les amplicons ainsi obtenus sont ensuite refroidis sur glace pendant 2 min, avant d'être digérés pendant une heure à 37°C par l'enzyme Dpn I. Celle-ci élimine l'ADN plasmidique non muté d'origine restant dans le produit réactionnel de PCR. En effet, l'ADN plasmidique non muté est très méthylé car produit dans des bactéries, ce qui n'est pas le cas de l'ADN muté synthétisé par PCR. Cette différence permet d'obtenir une séquence d'ADN amplifiée et mutée la plus pure possible. L'intégrité du plasmide est ensuite vérifiée en faisant migrer ce plasmide dans un gel de 1 % d'agarose/BET. Ce plasmide contenant le promoteur muté est ensuite amplifié à l'aide de bactéries XL Gold, de la même manière que celle décrite dans la partie 6.1. Enfin, après purification de l'ADN plasmidique muté, celui-ci est transfecté dans les cellules MDA-MB-435s afin d'être comparé avec le promoteur *KCNN3* non muté en terme de bioluminescence, tel que décrit dans la partie suivante (VII).

2.7. Mesure de l'activité du promoteur de *KCNN3* : gène rapporteur : luciférase (bioluminescence)

Dans cette partie nous allons aborder la mesure de l'activité du promoteur de *KCNN3* dans des cellules qui l'expriment de manière stable, puis dans des cellules qui présentent une expression transitoire de ce promoteur.

2.7.1. Expression stable du promoteur de *KCNN3*

Une fois les cellules exprimant de manière stable le promoteur du gène *KCNN3* associé au gène de la luciférase Firefly, les cellules peuvent être placées en culture et soumises à différents traitements à l'aide de molécules ou d'ARN interférents (Figure 50). Ceci permet d'étudier la régulation transcriptionnelle de l'expression de SK3 de manière directe via ce gène rapporteur qu'est la luciférase.

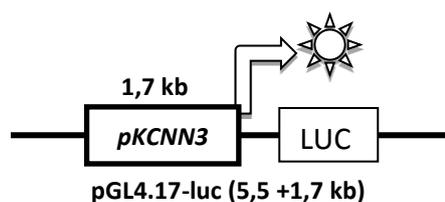


Figure 50. Structure du plasmide utilisé pour l'étude du promoteur *KCNN3*.

Les cellules sont donc implantées en plaques 24 puits (0.1 million de cellules/puits) la veille du traitement, puis traitées, et récoltées après une durée de traitement déterminée (en général 24 h post traitement). La récolte se fait par lyse directe à l'aide du réactif Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega, USA) qui est reconstitué à l'aide d'un tampon fourni par le fabricant. Afin de réaliser cette lyse directement dans chaque puits de plaque 24 puits, 100 µL de réactif sont déposés et 100 µL de PBS sont ajoutés après rinçage au PBS contenant du Ca²⁺. Après une incubation de 10 min, le contenu de chaque puits est divisé en deux volumes de 90 µL qui sont placés dans des puits de plaques blanches opaques de 96 puits (Greiner Bio-one, Allemagne). Le réactif Bright-Glo contient en plus du tampon de lyse cellulaire le substrat de la luciférase exprimée par les cellules ainsi transfectées, la luciférine. L'activité de la luciférase est alors quantifiée via la détection et la quantification des photons émis par cette réaction enzymatique :



Le pic d'émission de cette bioluminescence est mesurable à la λ de 560 nm à l'aide d'un luminomètre (Centro LB 960, Berthold, Allemagne) et les mesures sont exprimées en unités arbitraires (u.a) de bioluminescence puis relativisées par rapport au contrôle interne de l'expérience.

L'appareil utilisé permet des mesures reproductibles à partir du moment où le signal détecté sort du bruit de fond (luminescence > 10 000 u.a.). Une des limites de la technique réside dans le fait que l'intensité du signal luminescent peut varier en fonction du nombre de cellules présentes dans le puits, qui peut lui-même être modifié d'une condition à l'autre en fonction de l'action que peuvent avoir les produits testés sur la prolifération cellulaire. Puisque ne possédant donc pas de contrôle interne à l'expérience, des tests de viabilité

(MTT) ont été effectués en parallèle et dans les mêmes conditions pour chaque produit testé afin de vérifier que cette quantité de cellules ne varie pas.

2.7.2. Expression transitoire du promoteur de *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s

Cette technique d'expression transitoire permet d'étudier les effets d'une transfection sur l'activité du promoteur. En effet, la présence d'un contrôle interne (la luciférase Renilla) permet de s'assurer que toutes les conditions de transfection sont homogènes, et qu'il n'y a pas de modification de l'émission de photons liées à la transfection du siRNA ou du plasmide dont on veut étudier l'effet sur l'activité du promoteur *KCNN3*. Un contrôle interne de transfection qui est donc co-transfecté avec le promoteur, et dont le plasmide permet de forcer l'expression de la luciférase Renilla, possédant un pic d'émission et situé aux alentours de 475 nm. La luciférase Firefly, qui constitue notre gène rapporteur, et la luciférase Renilla ont des substrats différents, ce qui permet de différencier les émissions de photons spécifiques de chaque enzyme (Figure 51). Le principe de mesure est le même mais le réactif utilisé est différent, il s'agit du kit Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega ; USA).

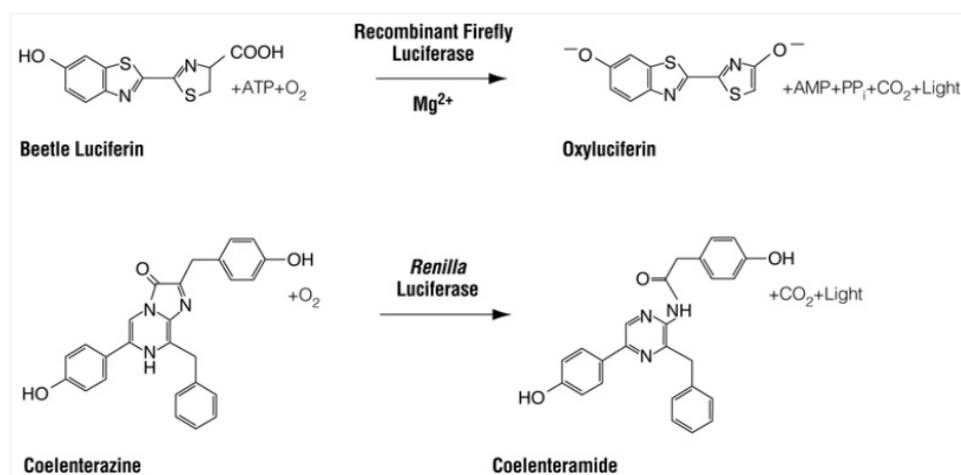


Figure 51. Réactions enzymatiques obtenues à l'aide du kit Dual-Glo[®] : la réaction 1 est celle permettant d'évaluer l'activité du promoteur de *KCNN3*, et la réaction 2 permet d'obtenir un contrôle interne de l'efficacité de transfection.

Ce kit contient un premier réactif identique à celui décrit dans la partie 7.1. , qui permet la lyse cellulaire et qui contient la luciférine. Le second réactif est appelé Stop&Glo[®] et permet d'arrêter la réaction entre la luciférase Firefly et son substrat, tout en activant la

réaction enzymatique impliquant la luciférase Renilla et son substrat spécifique : la coéluentérazine. Dans ce protocole, on utilise donc deux mesures : celle de la bioluminescence émise par la luciférase Firefly, qui est notre gène rapporteur, dont l'intensité est représentative de l'activité du promoteur de *KCNN3* ; et celle de la luciférase Renilla, qui représente l'efficacité de transfection dans chaque puits. La première mesure est donc relativisée par rapport à la seconde, ce qui permet de s'affranchir de la variabilité liée au nombre de cellules, et à l'efficacité de transfection. Enfin, ces ratios obtenus pour chaque condition sont comparés statistiquement au ratio obtenu en condition contrôle. Les deux mesures doivent être réalisées dans les 10 min suivant l'ajout de chacun des substrats pour éviter la perte de signal. Le protocole est donc le même que pour le kit décrit dans la partie 7.1 mais il faut rajouter simplement le deuxième réactif (50 μ L par puits dans la plaque 96 puits) directement après la première mesure, laisser incuber puis réaliser la seconde mesure.

2.8. Etude des courants potassiques par la technique du Patch clamp :

2.8.1. Principe du patch clamp

Cette technique de patch-clamp a été utilisée ici en mode voltage imposé principalement, afin d'étudier les courants des cellules MDA-MB-435s et HEK-hSK1, HEK-rSK2 et HEK-hSK3. Cette technique permet de mesurer les courants générés au travers de la membrane plasmique en fonction des gradients de concentration de ces ions et pour des potentiels de membrane variables et imposés. Il est ainsi possible d'étudier spécifiquement les courants K^+ , en particulier ceux qui nous intéressent, les canaux SKCa. L'utilisation du PSS et du MIP dont les compositions sont présentées dans les tableaux 3 et 4 respectivement, permet de favoriser l'observation de ces courants sortants qui présentent une rectification dans le sens entrant. La mesure des courants est rendue possible par l'établissement d'un circuit fermé entre la cellule et l'amplificateur du signal. Le circuit est composé d'une électrode de mesure placée sur la cellule d'intérêt ainsi que d'une électrode de référence baignant dans le milieu extracellulaire, reliées à l'amplificateur. Ce dernier permet d'amplifier le signal afin qu'il soit numérisé à l'aide d'une carte analogique/numérique

(Digidata 1322A, Axon Instruments, USA) puis envoyé sur un ordinateur afin d'enregistrer puis d'analyser les courants ainsi obtenus.

2.8.2. Installation de patch-clamp.

L'installation de patch-clamp est telle que présentée dans la figure 52 ci-dessous. Elle se compose de plusieurs éléments électriques, informatiques, et mécaniques. Le premier constituant de cette installation est le microscope inversé (Nikon Eclipse, TE2000-U, Nikon, Japan), sur lequel sont placées les boîtes de culture contenant les cellules, et placé de telle sorte que l'on puisse installer une tête de perfusion d'un côté, et la tête d'amplificateur de l'autre (CV 203 BU Headstage, Axon Instruments, USA). Les différents contenus des perfusions peuvent être périfusés autour de la cellule d'intérêt via un système muni d'électrovalves (Biologic-Sciences Instrument, MEV-9, USA). Celles-ci permettent de changer de perfusion à distance, sans toucher les perfusions dans la cage de Faraday, en évitant ainsi les vibrations inutiles. Cependant, ces électrovalves peuvent produire un léger bruit électrique pouvant perturber l'enregistrement.

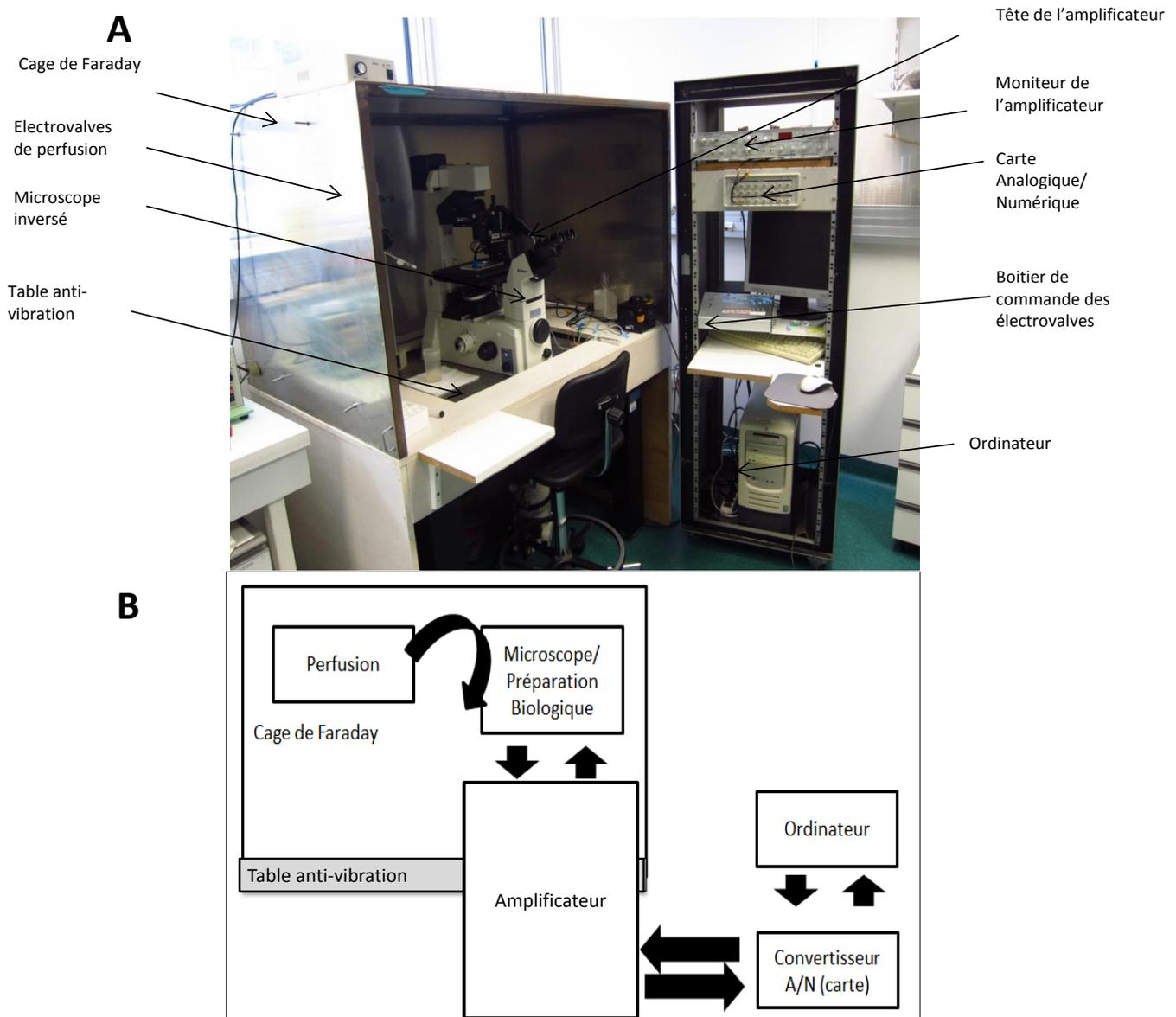


Figure 52. Installation du poste de patch-clamp. A. Photographie du poste de patch-clamp. **B.** Schéma du montage utilisé pour le patch-clamp. Les cellules sont perfusées dans la boîte située sur la platine du microscope. Le circuit électrique est formé par la pipette de patch, qui est reliée à la tête de l'amplificateur de patch, contenant un convertisseur courant/tension. Cette tête est reliée au boîtier de l'amplificateur, lui-même relié à une carte analogique/numérique qui permet d'envoyer ensuite le signal à un ordinateur afin de compiler les données, et de les analyser. Le circuit est fermé grâce à la présence d'une électrode de référence placée dans le bain.

La pipette de mesure est placée dans un portoir en plexiglas contenant un fil d'argent chlorurée (à l'aide d'eau de Javel), et ce portoir, appelé « holder », est relié à la tête de l'amplificateur. Le circuit électrique est fermé grâce à la présence d'une électrode de référence qui baigne dans le PSS contenu dans la boîte de culture. Le signal obtenu est converti soit en courant soit en voltage, en fonction du mode de patch-clamp utilisé (courant/voltage imposés, respectivement) par le convertisseur contenu dans cette tête

d'amplificateur contrôlé par le boîtier de l'amplificateur (Axopatch 200B, Axon CNS, Molecular Devices, Axon Instruments, USA). Cet amplificateur va amplifier le signal avec un gain choisi entre x1 et x10, et filtrer le signal via (filtre de 1 kHz dans notre cas) afin d'obtenir un signal analogique de qualité qui pourra être numérisé à l'aide de la carte (convertisseur analogique/numérique) puis envoyé vers l'ordinateur afin d'être analysé. Le signal est récupéré avec une fréquence d'échantillonnage de 10 kHz, correspondant à l'enregistrement d'un échantillon toutes les 100 μ sec, puis l'acquisition se fait via le logiciel pCLAMP 10.2 (Clampex, Molecular Devices, USA).

2.8.3. Approche et configurations utilisées

Les cellules sont placées dans des boîtes de culture adaptées, avec une confluence faible (15000 cellules/boîte de 10 cm²) afin de pouvoir étudier des cellules isolées, et ainsi éviter les jonctions communicantes. Puis cette boîte est placée en face de l'objectif d'un microscope inversé.

Les électrodes de mesure sont réalisées par étirement de pipettes de verre, qui sont des capillaires de borosilicate (Harvard Apparatus, USA). Nous avons utilisé deux types de verres, avec deux diamètres internes différents : 0,86 ou 1,17 mm. Le verre utilisé ici est qualifié de « verre dur » par opposition au « verre mou » qui possède une température de fusion plus faible (inférieure à 800°C). Cet étirement est réalisé grâce à une étireuse horizontale (P-97, Sutter Instrument Co., USA) possédant plusieurs paramètres sur lesquels il faut jouer pour améliorer la résistance de pipette. En effet, afin d'obtenir la résistance de pipette désirée, il est possible de modifier la température de chauffage, mais aussi la durée et/ou la vitesse de chauffe, ainsi que d'ajouter un étirement mécanique supplémentaire. Nous avons également utilisé une étireuse verticale (Narishige, PC-10, Japon), permettant de réaliser deux chauffages consécutifs de températures différentes afin d'obtenir la forme et la résistance de pipette attendues.

L'approche cellule/électrode se fait de la manière suivante : la micropipette de verre est placée dans le bain contenant du PSS. Quel que soit le type cellulaire étudié (cellules cancéreuses ou HEK 293T), nous utilisons des pipettes dont la résistance se situe aux alentours de 3 à 6 M Ω . Cette résistance est associée à une forme d'extrémité de pipette (en

longueur et en diamètre) adaptée pour l'obtention d'un gigaseal sur ces cellules. La pipette est ensuite approchée de la membrane cellulaire à l'aide d'un micromanipulateur piézo-électrique (Burleigh, USA), et dès que celle-ci touche la membrane, la résistance de pipette augmente légèrement. On applique alors une légère aspiration à l'aide d'une seringue reliée au « holder ». L'objectif est de sceller l'extrémité de la pipette à la membrane cellulaire, et la qualité de ce scellement est contrôlée par l'obtention du « gigaseal » (correspondant à une résistance de 1 G Ω). On se trouve alors dans la configuration « cell-attached » ou « cellule-attachée » (Figure 53).

Il faut alors compenser la capacité de la pipette en utilisant le boîtier de commandes de l'amplificateur. Puis, on réalise une deuxième aspiration, afin d'exercer une pression négative permettant la rupture de la membrane se trouvant sous l'extrémité de la pipette, on se trouve alors dans la configuration « cellule-entière » ou « whole-cell » (Figure 53).

Cette configuration est optimale pour la mesure des courants globaux présents dans la cellule, et elle permet de contrôler à la fois la composition du milieu extracellulaire (PSS), et celle du milieu intracellulaire, qui est remplacé par le milieu intrapipette (MIP) au fur et à mesure de la dialyse. Cependant, cette configuration implique une perte de certains médiateurs ou second messagers intracellulaires qui sont alors dilués dans le MIP, et qui auraient pu moduler l'activité des canaux étudiés.

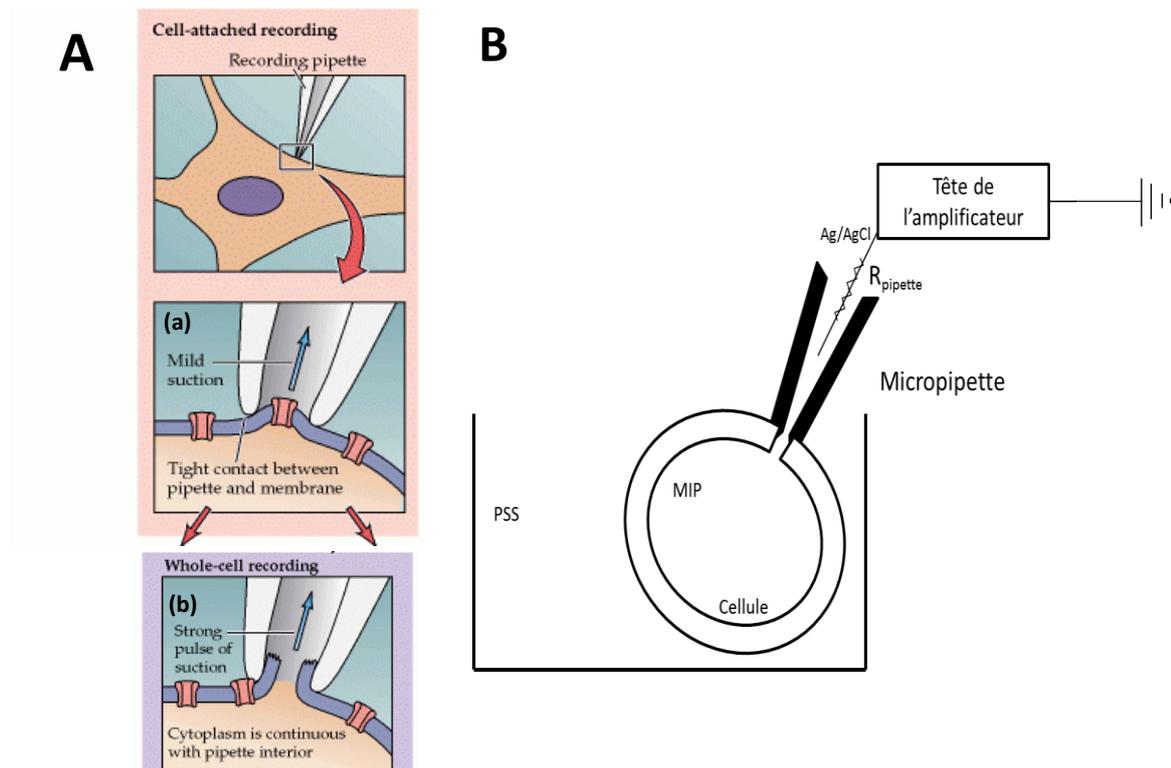


Figure 53. Configurations de patch clamp utilisées. **A.** Plusieurs configurations existent, à partir de la première pression négative et du gigaseal (a.), il est possible de passer en configuration « cellule-entière » ou « whole cell » (b) par aspiration plus prononcée, qui entraîne l'ouverture de la cellule. C'est cette configuration qui a été utilisée ici. Elle permet de contrôler la composition des milieux intra- et extracellulaire, afin de mesurer les courants totaux présents dans la cellule d'intérêt. **B.** Schéma du circuit permettant les mesures de courants et de potentiels en patch-clamp, configuration cellule entière.

(Source : [http://www.pabc.com.pkpatch %20nd %20page_clip_image001.gif](http://www.pabc.com.pkpatch%20nd%20page_clip_image001.gif))

Une fois la cellule ouverte, il convient de vérifier que les différents paramètres mesurés sont corrects, à savoir :

- La **capacité membranaire**, qui est le reflet de la surface membranaire de la cellule. En effet, plus la surface de la cellule est grande, plus elle va pouvoir accumuler des charges électriques, et donc plus la capacité membranaire est élevée. Elle est comprise entre 15 et 30 pF pour les cellules étudiées. Au-delà de 50 pF, on peut considérer que plusieurs cellules sont attachées à la pipette. Elle est calculée via l'intégration de l'aire sous le pic de courant capacitif divisée par la variation de voltage imposé, de manière automatique par le logiciel pCLAMP.

- La **résistance membranaire** : qui représente la perméabilité de la membrane plasmique aux ions. Cette résistance diminue lorsque les canaux ioniques sont activés, d'après la loi d'Ohm ($U=RI$). Elle se calcul en obtenant la pente de la relation $I=f(V)$ aux alentours du voltage membranaire de repos V_m . Elle reflète également la conductance ionique, qui est l'inverse de cette résistance.
- La **résistance d'accès** : elle est le reflet de la qualité du passage physique des ions entre le milieu intracellulaire et la pointe de la pipette. Il convient d'avoir une résistance d'accès faible, car une résistance d'accès élevée est synonyme d'obstruction de la pipette. Or cette obstruction perturbe l'enregistrement et témoigne d'une mauvaise mesure des courants ou des voltages étudiés. Une résistance d'accès correcte est inférieure à 20 M Ω . Elle est calculée automatiquement par le logiciel pCLAMP à partir de la pente de décroissance du courant capacitif, qui permet d'obtenir la relation suivante : $\tau=Ra \times C$ où la τ est la constante de temps, Ra la résistance d'accès et C la capacité membranaire.
- Le **courant de fuite** : qui est observé lorsque la pipette et la membrane cellulaire ne sont plus correctement scellées. Le courant de fuite empêche de mesurer le potentiel de membrane de repos ainsi que la résistance membranaire. Il est donc nécessaire d'avoir un courant de fuite minimal (<50pA pour les cellules MDA-MB-435s (à $V_m= -70$ mV) et <100 pA pour les cellules HEK 293T-SKCa (à $V_m= -70$ mV), qui surexpriment les canaux et présentent des courants d'amplitude plus importante), afin de ne pas sous-estimer les courants enregistrés.

Une fois ces paramètres validés et relevés, la mesure et l'enregistrement peuvent être effectués *via* le logiciel pCLAMP 10.

2.8.4. Protocoles utilisés

Il existe plusieurs protocoles de patch-clamp, que ce soit en potentiel imposé (voltage-clamp) ou en courant-imposé (current-clamp, PA-clamp). Ici, les protocoles utilisés sont tous des protocoles de voltage imposé, pour lequel on impose un voltage à la membrane cellulaire, et on mesure le courant qui en résulte.

On peut différencier les types de protocoles utilisés ici en deux catégories :

- les créneaux de voltages ou « pulses » permettant d'établir des relations de courant/voltage,
- et les rampes de voltage imposé, donnant directement les relations courant/voltage.

a) Relations courant/voltage :

Ce protocole consiste à imposer des créneaux de voltage croissants avec une durée de stimulation plus courte que pour les protocoles de rampe que nous verrons plus loin (Figure 54). On réalise ainsi des incréments du potentiel membranaire de 10 mV d'amplitude, à chaque pulse, toutes les 4 sec. Ceci permet de laisser le temps aux canaux présentant un délai d'activation de s'ouvrir. Après enregistrement, on réalise la moyenne de l'amplitude du courant à l'état stable (principalement en fin de pulse) par rapport à $I = 0$ pA, pour chaque créneau de voltage imposé. Puis on trace ensuite la courbe $I=f(V)$, après avoir divisé le courant par la capacité membranaire, calcul permettant de s'affranchir de la taille de la cellule, et donc, de comparer les cellules entre elles.

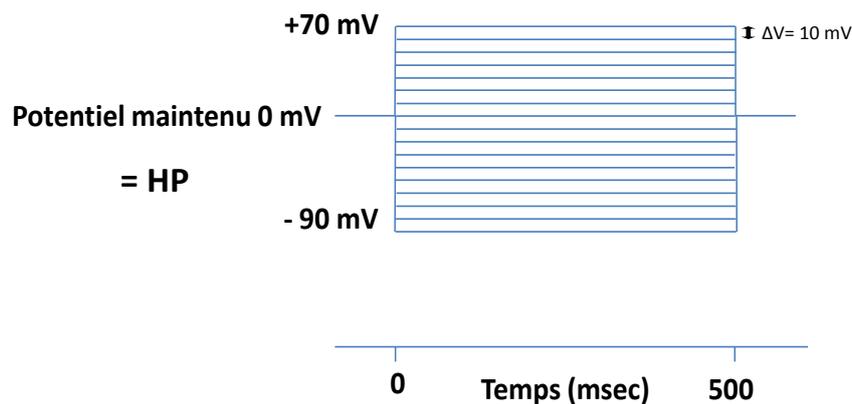


Figure 54. Exemple de protocole I/V utilisé en voltage imposé pour les cellules HEK-293T.

b) Rampes de voltage imposé :

Il s'agit ici d'imposer des voltages croissants ou décroissants pendant une certaine durée, en balayant ces voltages, c'est-à-dire, en restant très peu de temps à chaque voltage testé. Pour les HEK 293T nous avons réalisé des rampes de voltages balayant des voltages allant de -100 à +100 mV, en utilisant un potentiel de maintien égal à 0 mV. Pour les cellules MDA-MB-435s, on utilise des rampes de voltage balayant de -70 mV à +70 mV en 2000 millisecondes (msec), en réalisant des incréments de voltage très brefs (potentiel de maintien : -70 mV), ce qui donne le décours de voltage présenté dans la figure 55 ci-dessous.

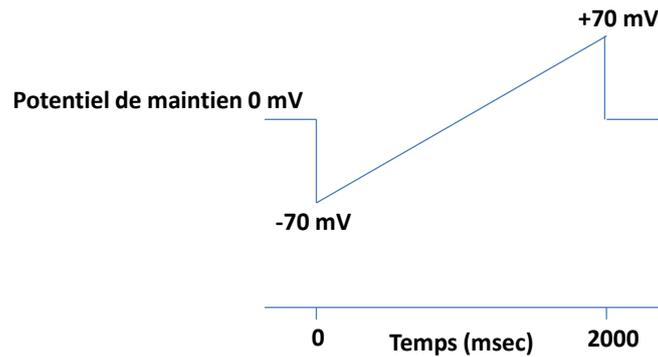


Figure 55. Exemple de protocole de rampe utilisé en voltage imposé.

Ce protocole est adapté à l'étude des canaux dont l'activation (et l'inactivation) sont indépendantes du voltage et du temps, ce qui est le cas des canaux SKCa. Il a été utilisé pour les cellules HEK293T-SKCa et MDA-MB-435s, et a permis d'étudier l'activité des canaux SKCa étudiés. Les compositions du MIP et du PSS sont telles que les courants majoritairement visibles résultant d'un tel protocole de voltage imposé ne soient dus qu'à l'activité des canaux K^+ , en particulier des SKCa. En effet, le potentiel d'équilibre pour le chlore dans nos conditions est nul, du fait de la présence d'une quantité identique d'ions chlorure de part et d'autre de la membrane cellulaire ($E_{Cl^-} = 0$ mV). Afin de mesurer l'amplitude des courants dans les cellules HEK293T surexprimant les canaux d'intérêt, nous nous sommes placés à ce voltage membranaire nul ($V_m = 0$ mV). Aussi, au potentiel membranaire de 0 mV, les courants enregistrés ne seront que des courants K^+ .

2.9. Migration cellulaire

Pour évaluer la capacité des cellules à migrer en réponse à des stimuli ciblant SK3, nous avons utilisé des inserts de migration BD (BD35097 ; Becton Dickinson, France) tapissés d'une membrane de polyéthylène (PET) criblée de pores de 8 μm de diamètre. Les pores de ce type d'inserts ont un diamètre quatre à cinq fois plus petit que celui des cellules MDA-MB-435s (40 μm). Ceci implique que les cellules qui auront migré au-delà de cette membrane auront non seulement la capacité de se déplacer sur un support, mais également celle de changer de forme afin de pouvoir s'insinuer au travers de ces pores de 8 μm de diamètre.

Les inserts sont placés dans des plaques 24-puits adaptées pour recevoir ces inserts sans que ceux-ci en touchent le fond (Multiwell stérile, Falcon®). Les cellules MDA-MB-435s sont ensemencées à la densité de 60 000 cellules par insert dans 200 μ L de milieu DMEM 5 % HyClone au niveau du compartiment supérieur. Le compartiment inférieur contient quant à lui 800 μ L de ce même milieu. Les traitements sont réalisés directement dans les milieux situés en dessous et au-dessus de l'insert, au moment de l'ensemencement des cellules. Aucun gradient de SVF n'est nécessaire pour que les cellules migrent, et chaque molécule testée est donc présente en quantité identique au-dessus et en dessous de l'insert. L'absence de gradient de SVF évite une quelconque chimioattraction qui pourrait perturber l'évaluation des effets des différentes molécules sur la migration dépendante du canal SK3.

Les drogues sont préalablement testées en parallèle à l'aide d'un test MTT (Sels de tétrazolium ou (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)) afin de montrer qu'elles n'ont pas d'effet sur la viabilité cellulaire à 24 h, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la migration (cf Partie 2.10).

Les cellules ainsi ensemencées sont ensuite placées à l'incubateur pendant 24 h puis les inserts sont rincés au PBS (Figure 56). Les cellules sont alors perméabilisées et fixées à l'aide d'un bain de méthanol glacé 100 % pendant dix minutes. Puis après un rinçage au PBS, les inserts sont placés dans un bain contenant du DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole - dilué au 1/5000^{ème} dans du PBS contenant du Ca^{2+}) qui une fois les cellules perméabilisées, va entrer dans le noyau. C'est un agent intercalant fluorescent qui émet dans le bleu (456 nm) et permet ainsi de détecter les noyaux. Les cellules situées au-dessus de l'insert sont au préalable éliminées à l'aide d'un coton-tige, afin de ne détecter que les cellules ayant traversé la membrane poreuse de l'insert et donc situées sous l'insert.

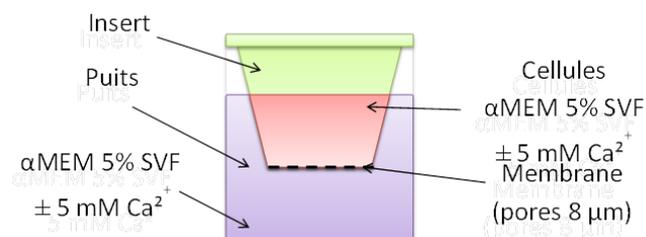


Figure 56: Schéma du montage permettant d'évaluer la migration *in vitro*.

Pour chaque insert, une série de 8 photographies est réalisée puis, les cellules sont comptées à l'aide d'un logiciel de comptage, développé sous ImageJ (National Institutes of Health, USA) par le Dr. Thierry Brouard du laboratoire d'informatique de l'ÉPU

Polytech'Tours, E.A. 6300 - ERL CNRS 6305 (Brouard *et al.*, 2009). Le nombre moyen de cellules ayant migré par insert est comparé statistiquement dans les conditions contrôles à celui mesuré dans les conditions de traitement. Pour chaque expérience, trois inserts sont utilisés par conditions.

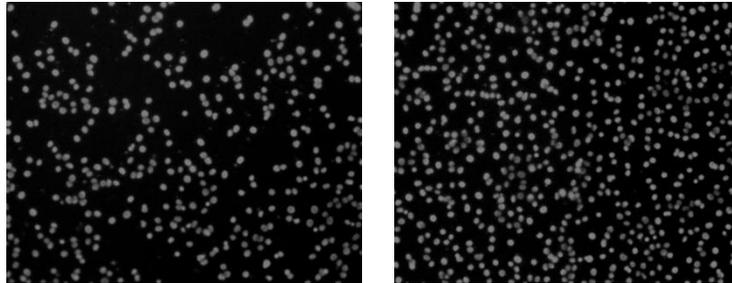


Figure 57 : Images représentatives des clichés obtenus suite à une comparaison de la migration cellulaire sur inserts, de cellules MDA-MB-435s avec deux $[Ca^{2+}]_{ext.}$ différentes. A gauche : avec une concentration physiologique de Ca^{2+} (1,8 mM) ; à droite : avec $[Ca^{2+}]_{ext.}$ élevée (5 mM). Les points visibles représentent les noyaux marqués au DAPI.

2.10. Viabilité cellulaire : Sels de tétrazolium ou MTT

Afin d'étudier les effets de nos différentes molécules sur la migration cellulaire, il a fallu vérifier que ces dernières n'avaient pas d'effet toxique sur les cellules étudiées. Le test MTT a été largement décrit dans la littérature (Berridge *et al.*, 2005), et permet d'étudier la prolifération cellulaire, ainsi que la viabilité cellulaire en présence de différents traitements. Les cellules viables ont un pouvoir réducteur suffisant pour activer les enzymes dépendantes de la NADPH cytosolique qui réduisent les sels de tétrazolium présents dans le réactif MTT (milieu et sels de tétrazolium) en cristaux de formazan. Ces cristaux, une fois solubilisés dans du DMSO (ne sont pas hydrosolubles contrairement à ceux générés par d'autres sels de tétrazolium comme le réactif WST : Water Soluble Tetrazolium salt), permettent d'obtenir une coloration violette proportionnelle à la quantité de cellules viables. La mesure de la DO à 550 nm de cette coloration grâce à un spectrophotomètre (identique à celui utilisé pour le dosage de protéines lors du western blot) permet donc de comparer la viabilité entre les conditions de culture (traitements vs contrôle).

Il faut prendre avec précaution les résultats obtenus car certaines cellules sont totalement viables mais n'ont pas une activité mitochondriale assez élevée, ni un potentiel réducteur cytoplasmique suffisant pour réduire ces sels en cristaux de formazan, ce qui sous

estime la viabilité de ces cellules. Cependant, il a été vérifié que les cellules d'intérêt ici ont une activité métabolique suffisante et donc un potentiel réducteur permettant la réduction des sels de tétrazolium de manière proportionnelle à la quantité de cellules viables.

2.11. Mesure des variations de Ca^{2+} libre intracellulaire

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de pétri de 60 mm de diamètre la veille (300 000 cellules). L'objectif est d'étudier les effets de certaines molécules sur les variations de Ca^{2+} intracellulaire libre présent dans le cytosol et donc d'estimer les entrées de Ca^{2+} . Nous utilisons la sonde ratiométrique Fura-2 au laboratoire pour les cellules cancéreuses de sein que nous étudions, afin de s'affranchir de la quantité de sonde chargée par cellule.

2.11.1. Sonde Fura-2AM

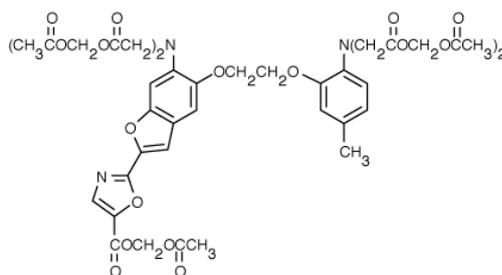


Figure 58. Structure du Fura-2-AM

Le Fura-2AM a la capacité de traverser la membrane plasmique grâce à la présence du groupement acétoxy-méthyle (AM). Une fois dans la cellule, cette sonde fluorescente ne peut plus en sortir, du fait de l'hydrolyse du groupement AM par les estérases intracellulaires (Figure 58). Dès que ce groupement est éliminé, le Fura-2 peut se complexer au Ca^{2+} intracellulaire libre et ainsi émettre une fluorescence dépendante de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$. En effet, cette sonde est ratiométrique du fait de la présence d'une double excitation, l'une représentant la forme liée au Ca^{2+} (F_{340} = excitation à 340 nm) l'autre la forme libre (F_{380} = excitation à 380 nm). L'émission de fluorescence de ces deux formes est mesurée à la λ de 510 nm et est exprimée sous forme de ratio de fluorescence F_{340}/F_{380} , qui représente la variation de Ca^{2+} intracellulaire libre. Ceci en fait une sonde de premier choix pour l'étude des variations de Ca^{2+} intracellulaire, puisqu'elle permet une mesure quantitative du Ca^{2+} intracellulaire libre, indépendamment de la quantité de sonde chargée dans les cellules. Les

cellules sont récoltées suite aux différents traitements et/ou transfections puis incubées avec le Fura-2-AM (5 μ M) durant 45 min dans de l'Optimem. Certains traitements courts peuvent être effectués pendant la charge cellulaire avec la sonde, tel que c'est le cas avec la forskoline. Après 45 min, les cellules sont rincées avec 10 mL de PSS contenant du Ca^{2+} et centrifugées 5 min à $1000 \times g$ ce qui permet d'éliminer l'excédent de sonde non chargée dans les cellules. Le culot cellulaire est repris dans 2 mL de PSS sans Ca^{2+} afin d'être placé dans une cuve en quartz permettant la mesure dans le spectrofluorimètre.

2.11.2. Spectrofluorimètre

Le spectrofluorimètre (Hitachi, F 2500, USA) utilisé ici permet d'enregistrer l'émission de fluorescence de la sonde Fura-2 à 510 nm suite à la double excitation à 340 et 380 nm de ce fluorophore pendant 50 ms toutes les 2 sec, rendue possible par la présence d'un monochromateur permettant de sélectionner ces deux longueurs d'ondes d'excitation. Cette émission est détectée par le tube du photomultiplicateur (PMT) présent dans le spectrofluorimètre, qui permet de rendre le signal détectable et convertible en signal analogique par cette machine. Les enregistrements sont envoyés à un ordinateur afin d'être stockés dans le logiciel FL Solution (Hitachi, USA), puis analysés grâce au logiciel Origin 7.0 (Microcal Software, Northampton, MA, USA).

2.11.3. Protocoles

Lors de mon travail de thèse, j'ai pu mettre au point deux protocoles afin de différencier les deux entrées de Ca^{2+} dans les cellules MDA-MB-435s. En effet, l'entrée de Ca^{2+} intracellulaire peut être modulée principalement *via* deux voies :

- ✓ **l'entrée de Ca^{2+} capacitive ou SOCE (Store Operated Channel Entry)**, faisant suite à la vidange calcique du RE.
- ✓ **l'entrée calcique constitutive indépendante de la vidange du RE**, indépendante de la vidange calcique du RE.

a) Protocole d'étude de l'entrée constitutive :

Les cellules sont reprises dans 2 mL de PSS sans Ca^{2+} , et incubées dans le spectrofluorimètre pendant 40 sec, pour éviter la décharge spontanée du RE en Ca^{2+} , du fait

de l'absence de Ca^{2+} extracellulaire. Puis on ajoute 2 mM de Ca^{2+} extracellulaire, qui va naturellement passer à travers les canaux Ca^{2+} . On enregistre alors des tracés comme celui présenté sur la figure 59.A.

b) Protocole d'étude de l'entrée capacitive :

Cette entrée de Ca^{2+} est permise grâce à la présence d'un senseur calcique à la surface du RE, la protéine STIM 1, qui va détecter la diminution Ca^{2+} dans la lumière du RE puis aller se complexer aux canaux Orai1/Orai3 afin de permettre au RE de se remplir à nouveau en Ca^{2+} .

Il s'agit exactement du même protocole que pour l'entrée constitutive, sauf que pendant la période où les cellules sont incubées avec du PSS sans Ca^{2+} , on ajoute 50 μM de thapsigargine, un inhibiteur des SERCA (pompes assurant la recapture du Ca^{2+} par le RE). Cette molécule permet la vidange du RE rapide, et lorsque l'on ajoute le Ca^{2+} extracellulaire (2 mM), on observe une entrée capacitive de Ca^{2+} , liée à l'intervention de STIM 1. La figure 59. B. présente un exemple de traces obtenues avec ce protocole.

c) Validation des protocoles :

Au cours de cette thèse, les deux protocoles présentés ci-dessus, ont été validés par la transfection d'un siSTIM1 qui présente un effet sur l'entrée capacitive, alors qu'il n'a pas d'effet sur l'entrée constitutive (Figure 59).

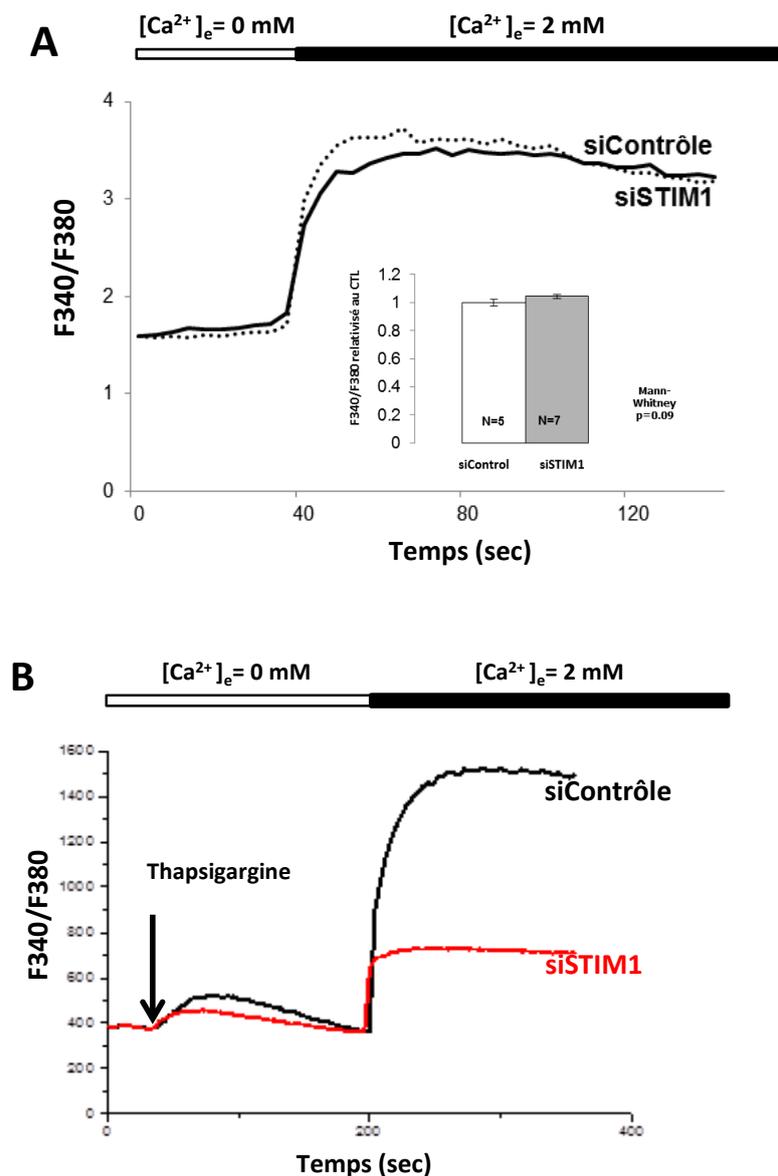


Figure 59. Protocoles de mesure de Ca²⁺ intracellulaire. A. Absence d'effet du siSTIM1 sur l'entrée constitutive de Ca²⁺. B. Effet du siSTIM1 sur l'entrée capacitive de Ca²⁺. Le ratio de fluorescence F340/F380 est proportionnel à la [Ca²⁺]_{int}.

La mise au point de ces deux protocoles nous a permis d'étudier les effets de différentes molécules sur les deux types d'entrée calcique présentés précédemment. Cependant, les résultats présentés dans cette thèse ne concernent que l'entrée constitutive de Ca²⁺.

Cette étude spectrofluorimétrique présente quelques limites, du fait de l'utilisation d'une suspension cellulaire. En effet, la qualité de la suspension peut perturber l'enregistrement (état des cellules après récolte, intégrité cellulaire...). De plus, une fois les

molécules à tester ajoutées à la suspension cellulaire, il n'est plus possible de les retirer ou de les rincer afin d'observer un potentiel effet réversible. Cependant, il existe d'autres techniques permettant l'étude des variations de Ca^{2+} intracellulaire, et ce sur une seule cellule ou un petit groupe de cellules adhérentes, à l'aide d'un microscope à épifluorescence relié à une caméra haute résolution, et sur lequel il est possible de disposer un système de périfusion cellulaire. Ces autres techniques permettent de gagner en précision des mesures, tout en maintenant la cellule dans des états d'adhérence et de culture physiologiques.

2.12. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SigmaStat (version 3.0.1a, Systat Software, Inc). Dans tous les cas, sauf si c'est indiqué, les données sont exprimées sous forme de moyennes \pm l'écart standard à la moyenne (SEM). Le N représente le nombre de fois où l'expérience a été répétée, le n représente lui le nombre de répliques par N. Les comparaisons entre deux moyennes ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney. Lorsqu'il y avait plus de deux moyennes à comparer entre elles, les tests d'analyse de variances de Kruskal-Wallis ou d'ANOVA ont été préférés, suivis de tests post hoc de Dunn's, de Dunnett's, de Neuman-Keuls ou de Bonferroni. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque le $p < 0,05$.

Remarque : les analyses de cytométrie ayant été réalisées par A. Chantôme et R. Felix (Laboratoire Cellules Dendritiques et Greffes-Tours) et de localisation protéique dans les radeaux lipidiques par M. Guéguinou (U 1069), je ne les ai pas détaillés dans ce matériel et méthodes. De la même manière, la digestion spécifique des protéines membranaires par incubation avec la protéinase K, a été réalisée par A. Chantôme.

III. Résultats et Discussion

3.1. Partie I. Le Ca²⁺ extracellulaire régule l'expression de SK3 via l'AMPC

3.1.1. Régulation de l'expression de SK3 par le Ca²⁺ extracellulaire

a) Effets du Ca²⁺ extracellulaire sur l'expression de la protéine SK3

Afin d'étudier les effets du Ca²⁺ extracellulaire sur l'expression de la protéine SK3, une cinétique d'enrichissement du milieu extracellulaire en Ca²⁺ a été réalisée. Cet enrichissement consiste à augmenter la [Ca²⁺]_{ext.} en la faisant varier de 1,4 mM à 5 mM, pendant 2 à 36 heures dans une étuve à CO₂. On observe à l'aide d'une analyse par western blot, que cette élévation de la [Ca²⁺]_{ext.} augmente l'expression protéique du canal SK3 à partir de 15 h d'enrichissement du milieu en Ca²⁺ (Figure 60).

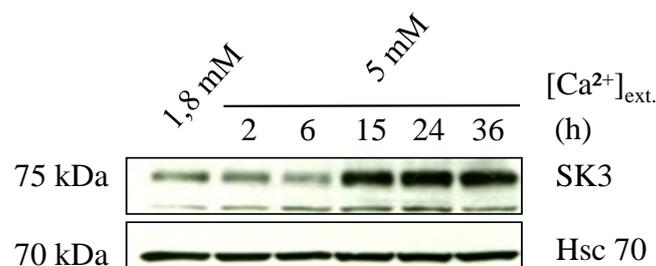


Figure 60. Etude cinétique des effets d'une élévation de Ca²⁺ extracellulaire sur l'expression de la protéine SK3 observée par western blot pour les cellules MDA-MB-435s. L'expression du canal SK3 augmente avec une élévation de la [Ca²⁺]_{ext.}. A partir de 15 h d'enrichissement du milieu en Ca²⁺ on obtient une augmentation de l'expression de SK3 qui est maintenue dans le temps, au moins jusqu'à 36 h (50 µg de protéine, Hsc70 : protéine chaperonne constituant le témoin de charge ; N=3 pour chaque point et N=6 pour 24 h).

De la même manière, nous nous sommes demandé si une diminution de la [Ca²⁺]_{ext.} pouvait réduire l'expression protéique de SK3. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé l'EGTA, un chélateur de Ca²⁺, afin de diminuer la [Ca²⁺]_{ext.} libre dans le milieu. L'utilisation de ce chélateur à 500 et 900 µM permet d'obtenir dans nos conditions de culture des [Ca²⁺]_{ext.} libres finales respectives de 900 et 400 µM. Le fait de diminuer cette [Ca²⁺]_{ext.} réduit l'expression protéique de SK3 (Figure 61).

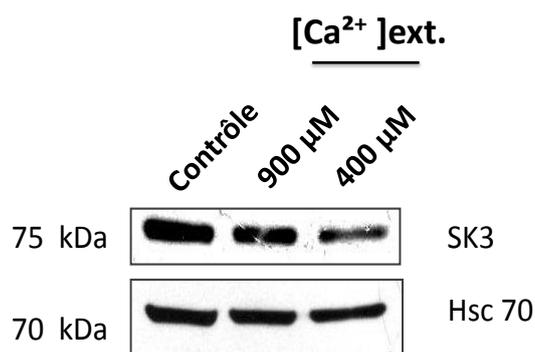


Figure 61. Western blot représentatif des effets d'une diminution du Ca^{2+} extracellulaire sur l'expression de la protéine SK3 dans les cellules MDA-MB-435s. Une diminution de $[Ca^{2+}]_{ext.}$ correspondant à 900 μM et 400 μM de Ca^{2+} libre (EGTA 500 et 900 μM , respectivement), entraîne une diminution de l'expression de SK3 (50 μg de protéine, N=2).

Suite à cette observation, nous avons cherché à déterminer si la régulation de l'expression du canal SK3 avait lieu au niveau transcriptionnel.

b) Effet du Ca^{2+} extracellulaire sur l'expression transcriptionnelle de KCNN3

L'étude des transcrits *KCNN3*, codant pour la protéine SK3, a été permise grâce à l'utilisation de la PCR semi quantitative. Une cinétique plus courte que celle que nous avons faite pour la protéine, a été réalisée, et les transcrits ont été étudiés suite à 15 h et 24 h d'enrichissement du milieu avec 5 mM de $[Ca^{2+}]_{ext.}$

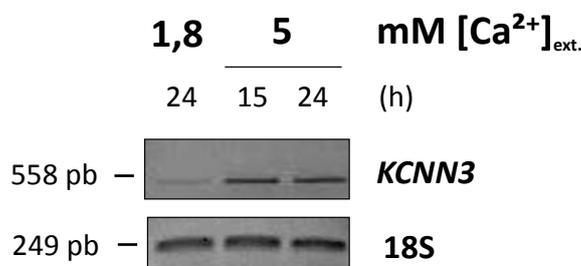


Figure 62. Image représentative de l'effet du Ca^{2+} extracellulaire sur le niveau d'expression des transcrits *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s. De même que pour la protéine SK3, on observe que le nombre de transcrits *KCNN3* est augmenté en présence d'un milieu contenant 5 mM de Ca^{2+} comparativement au milieu contrôle n'en contenant que 1,8 mM. Ces résultats sont comparés à l'aide d'un témoin de charge, l'ARN 18s (N=3).

L'enrichissement en $[Ca^{2+}]_{ext.}$ dans le milieu augmente l'expression des transcrits *KCNN3* dès 15h et se maintient après 24 h d'enrichissement (Figure 62). Afin de quantifier ces effets, nous avons eu recours à la qPCR. A l'aide de cette technique, nous avons répété l'expérience et montré qu'en présence d'une $[Ca^{2+}]_{ext.}$ de 5 mM le taux de transcrits *KCNN3* augmente de 25 % par rapport au contrôle (Figure 63).

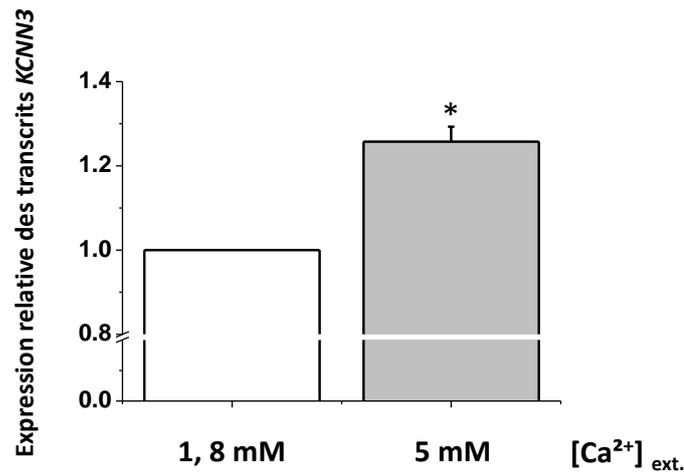


Figure 63. Effets de l'élévation de la [Ca²⁺]_{ext.} sur l'expression des transcrits *KCNN3* après 24 h d'enrichissement du milieu dans les cellules MDA-MB-435s. Le taux de transcrits *KCNN3* est relativisé par rapport aux transcrits codant pour la protéine contrôle HPRT1. Une augmentation de la [Ca²⁺]_{ext.} pendant 24 h augmente le taux de transcrits *KCNN3* de 25 % (N=4; * p<0.029 Mann-Whitney).

On obtient donc un effet identique sur la protéine et sur l'ARNm codant pour SK3, ce qui suggère une régulation au niveau transcriptionnel de *KCNN3* par le Ca²⁺ extracellulaire. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié la régulation du promoteur du canal SK3 par le Ca²⁺ extracellulaire.

c) Influence du Ca²⁺ extracellulaire sur l'activité du promoteur *KCNN3*

Grâce au plasmide pGL4.17-pSK3-luc transfecté de manière stable dans nos cellules d'intérêt MDA-MB-435s, il est possible d'étudier l'activité transcriptionnelle du promoteur *KCNN3*, qui est le promoteur assurant et contrôlant l'expression de la protéine SK3. L'augmentation de la [Ca²⁺]_{ext.} pendant 24 h entraîne une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle du promoteur *KCNN3* de 20 % par rapport au contrôle (Figure 64).

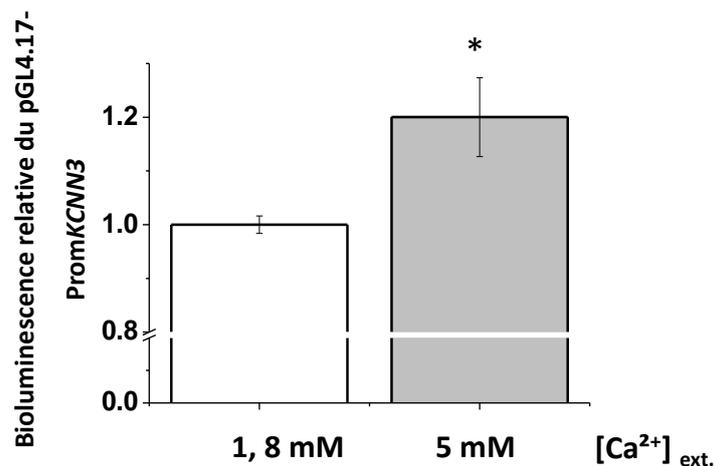


Figure 64. Effets du Ca²⁺ extracellulaire sur l'activité du promoteur *KCNN3*. L'élévation de la [Ca²⁺]_{ext} augmente l'activité du promoteur *KCNN3* de 20 %. L'activité du promoteur est normalisée par rapport au contrôle [Ca²⁺]_{ext} = 1,8 mM (N=3; n=9, *p=0,04 Mann Whitney).

Après avoir étudié les effets du Ca²⁺ extracellulaire sur l'expression de SK3, nous avons cherché à identifier quelle protéine avait la capacité de détecter ces variations de Ca²⁺ et d'activer les voies de signalisation permettant de réguler l'expression de SK3. Le CaSR, qui est exprimé dans les cellules MDA-MB-435s (Liu *et al.*, 2009) pourrait être un bon candidat impliqué dans cette régulation.

3.1.2. Mise en évidence du rôle du CaSR dans la régulation de l'expression de SK3

a) Modulation de l'expression protéique de SK3 par le CaSR

Le CaSR est un récepteur couplé aux protéines G, qui est sensible à la [Ca²⁺]_{ext} et activé par celle-ci à partir de 1 mM. Afin d'étudier le rôle du CaSR dans la régulation de l'expression de SK3, nous avons dans un premier temps traité nos cellules MDA-MB-435s pendant 24 h avec la néomycine, un agoniste non sélectif de ce CaSR. Ce traitement entraîne une augmentation de l'expression de SK3 que ce soit au niveau de la protéine SK3 (Figure 65.A) ou des transcrits (Figure 65.B).

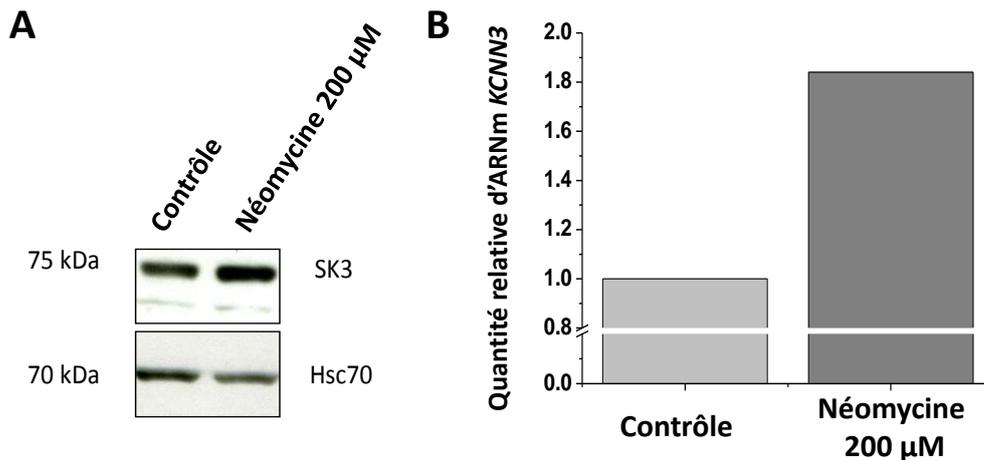


Figure 65. Effets de la néomycine sur l'expression de SK3. A. Western blot représentatif des effets de la néomycine sur l'expression protéique de SK3 (N=3). B. Effet de la néomycine sur le niveau d'expression des transcrits SK3 quantifiés par qPCR (N=1, n=3). Dans les cellules MDA-MB-435s, l'activation du CaSR par un autre agoniste que le Ca^{2+} , la néomycine (200 µM, 24 h) augmente l'expression transcriptionnelle et protéique de SK3.

Afin de confirmer l'implication du CaSR dans l'expression de SK3, nous avons ensuite inhibé celui-ci, à l'aide d'un antagoniste pharmacologique, le NPS 2390. Une application de NPS 2390 sur les cellules MDA-MB-435s pendant 24 h, réduit l'expression de la protéine SK3 (Figure 66).

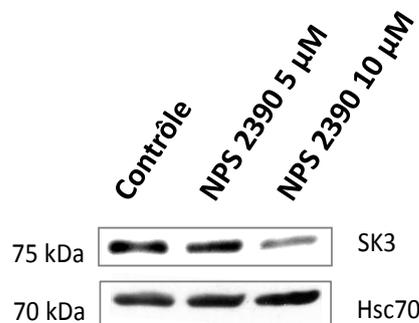


Figure 66. Cliché représentatif des effets du NPS 2390 sur l'expression de la protéine SK3 dans les cellules MDA-MB-435s. L'inhibition pharmacologique durant 24 h par le NPS 2390 du CaSR diminue l'expression de la protéine SK3 (N=2).

Afin de confirmer le lien qui existe entre le CaSR et l'expression de la protéine SK3, un ARN-interférent ou siRNA dirigé contre le CaSR a été transfecté sur les cellules MDA-MB-435s. Au préalable, nous avons vérifié l'efficacité du siCaSR dans les cellules HEK293T et MDA-MB-435s surexprimant le CaSR-YFP dans lesquelles le CaSR a été invalidé par transfection transitoire du siCaSR (Figure 67).

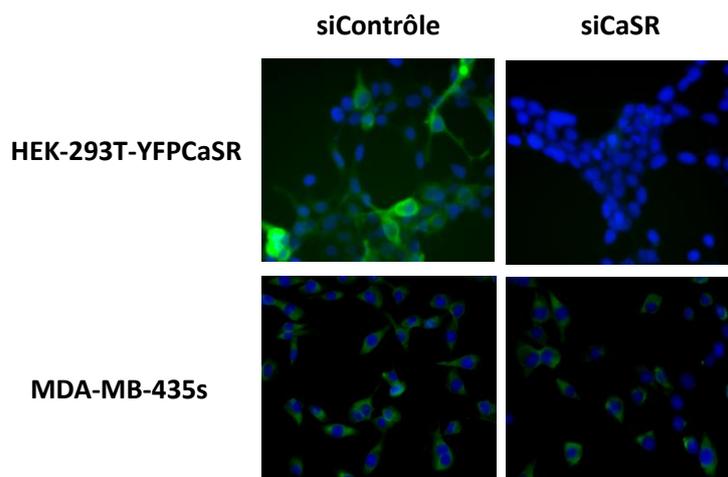


Figure 67. Validation du siCaSR dans nos deux modèles cellulaires. Images obtenues à l'aide d'un microscope à épifluorescence, validant l'efficacité du siCaSR sur deux types cellulaires, les HEK-293 T (haut) et les cellules MDA-MB-435s (bas) surexprimant le CaSR. (Grossissement x100, en vert le CaSR, en bleu les noyaux cellulaires marqués au DAPI (150pmoles de siRNA/300 000 cellules)).

Nous avons observé une différence d'efficacité du siCaSR sur l'extinction du CaSR observée entre les deux lignées, puisque cet ARN interférent éteint totalement le signal dans les HEK293T-CaSR-YFP, mais réduit le signal d'environ 50 % dans les cellules MDA-MB-435s. Les cellules HEK293T sont connues pour être un excellent modèle cellulaire pour l'étude des effets de la surexpression ou de l'extinction d'une protéine, puisqu'elles se transfectent plus facilement que la plupart des autres types cellulaires. Nous pensons que cette différence d'efficacité du siCaSR est donc liée à une différence d'efficacité de transfection avec le siCaSR dans ces deux lignées.

En faisant varier la durée de transfection avec le siCaSR on obtient une extinction progressive de la protéine SK3 dans les cellules MDA-MB-435s (Figure 68). L'effet du siCaSR sur l'expression de SK3 est dépendant du temps. En effet, l'effet du siCaSR est plus importante sur l'expression de SK3 à 72 h qu'à 48 h et on observe une extinction presque totale de la protéine SK3, 92 h après l'invalidation du CaSR.

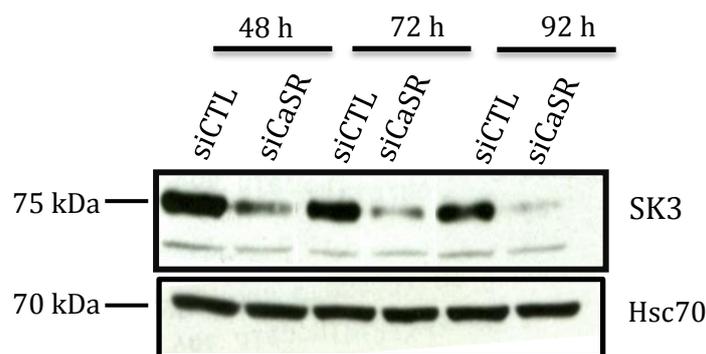


Figure 68. Western blot montrant les conséquences de l’extinction du CaSR sur l’expression de la protéine SK3. Une invalidation du CaSR à l’aide de siRNA dirigés contre le CaSR permet d’obtenir une extinction progressive de l’expression de la protéine SK3 dans les cellules MDA-MB-435s (150 pmoles de siRNA/300 000 cellules ;N=3).

Une fois la relation établie entre l’expression du CaSR et celle de la protéine SK3, nous avons voulu savoir si l’augmentation d’expression de SK3 induite par le Ca^{2+} extracellulaire était liée au CaSR. Pour cela, les cellules ont été transfectées avec le siCaSR puis incubées pendant 24 h avec le milieu contenant 5 mM ou 1,8 mM de Ca^{2+} extracellulaire. Les résultats sont présentés dans la figure 69.

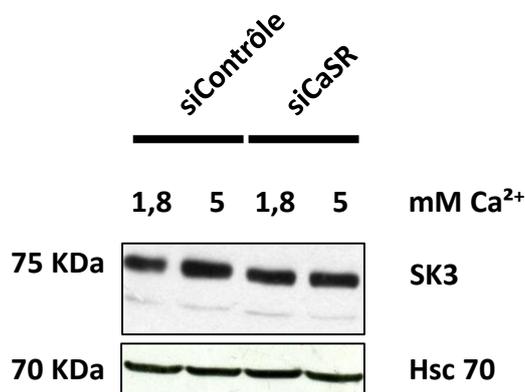


Figure 69. Western blot montrant l’influence de l’invalidation du CaSR sur l’augmentation de l’expression protéique de SK3 induite par l’élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ dans les cellules MDA-MB-435s (N=1).

Cette expérience montre qu’une invalidation du siCaSR inhibe l’augmentation d’expression de SK3 induite par l’élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$. Cependant, en condition de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ physiologique (1,8 mM), nous n’observons pas de différence dans l’expression de la protéine SK3 entre les cellules transfectées avec le siCaSR vs siContrôle. Il faudrait répéter l’expérience afin de confirmer ces résultats, mais il pourrait s’agir d’une activation du CaSR moins importante à faible concentration (1,8 mM), et donc un effet moindre du siCaSR sur l’expression de SK3 dans ces conditions par rapport à une condition avec 5 mM de Ca^{2+}

extracellulaire. Toutefois, le CaSR semble bien impliqué dans la détection de l'élévation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ et réguler ainsi l'expression du canal SK3 dans les cellules MDA-MB-435s.

b) Régulation transcriptionnelle de SK3 par le CaSR

Nous avons ensuite étudié si le CaSR régulait SK3 au niveau transcriptionnel. Lorsque le siCaSR est transfecté dans les cellules MDA-MB-435s on observe une diminution des transcrits SK3 alors qu'aucun effet n'est observé sur les transcrits *KCNN2* (Figure 70.A). L'utilisation d'amorces ciblant *KCNN2*, qui code pour la protéine SK2, une isoforme proche de SK3, a permis de montrer la spécificité de l'effet du siCaSR observé sur SK3. Afin de quantifier l'effet du siCaSR sur les transcrits *KCNN3*, nous avons utilisé la qPCR. Comme le montre la figure 70.B, 80 % des transcrits codant pour SK3 sont réduits par l'inactivation transitoire du CaSR (72 h post-transfection). Le CaSR module donc l'expression des transcrits et de la protéine SK3. Il s'agit d'une régulation ayant lieu au niveau transcriptionnel, tout comme celle observée avec le Ca^{2+} extracellulaire.

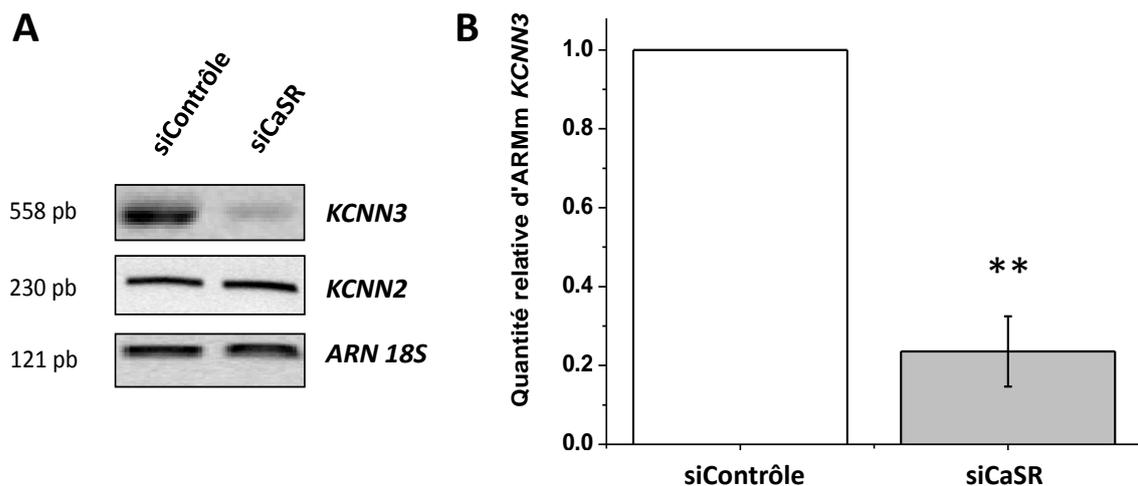


Figure 70. Effets du siCaSR sur l'expression des transcrits *KCNN3* et *KCNN2*. A. PCR semi-quantitative permettant de comparer les effets du siCaSR sur les transcrits codant pour SK2 et SK3. L'inactivation du CaSR dans les cellules MDA-MB-435s diminue l'expression transcriptionnelle de SK3 alors qu'elle n'affecte pas celle de SK2. Les ARN 18S représentent le contrôle interne de cette expérience. B. Effets du siCaSR sur les transcrits *KCNN3* étudiés en qPCR (72 h post-transfection, 150 pmoles de siARN/300 000 cellules ; N=4, ** p=0.029 Mann Whitney).

c) Etude de la régulation du promoteur de SK3 par le CaSR

Afin de préciser le mécanisme de régulation de SK3 par le CaSR, nous avons testé si cet effet se faisait au niveau du promoteur *KCNN3*. Pour cela, nous avons développé des cellules MDA-MB-435s qui expriment de manière stable ce promoteur (pGL4.17 Prom *KCNN3*). Nous avons ensuite invalidé de manière transitoire le CaSR (48 h ; 150 pmoles/300 000 cellules)

dans ces cellules et observé une diminution reproductible de l'activité du promoteur de l'ordre de 15 %, en présence d'une $[Ca^{2+}]_{ext}$ de 1,8 mM.

Nous obtenons une diminution de l'activité du promoteur *KCNN3* suite à la transfection du siCaSR dans les cellules MDA-MB-435s (Figure 71). Bien que reproductible, celle-ci est faible, ce qui peut sans doute être expliqué par la durée de transfection qui n'était que de 48 h, durée insuffisante pour assister à une dégradation importante voire complète du stock protéique du CaSR dans ces cellules. Il serait intéressant d'augmenter la durée de transfection afin d'observer une diminution sans doute beaucoup plus importante de l'activité du promoteur, traduisant probablement une augmentation de la dégradation de la protéine CaSR. Cependant, il est aussi possible ce petit effet suffise à diminuer fortement l'expression transcriptionnelle et protéique de SK3 comme démontré plus tôt (**partie 3.1.2.A et B**).

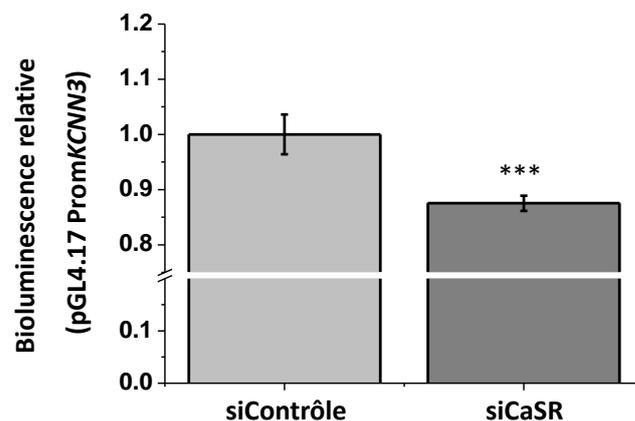


Figure 71. Effet du siCaSR sur l'activité du promoteur *KCNN3*. L'activité du promoteur diminue de 15 % en réponse à une invalidation du CaSR par transfection du siCaSR pendant 48h dans les cellules MDA-MB-435s (150 pmoles/300 000 cellules ; N=2, n=8, *** $p=0.0002$, Mann Whitney).

3.1.3. Régulation de l'expression de SK3 par la voie AMPc/PKA

Le CaSR, en tant que récepteur couplé aux protéines G peut être associé à une protéine $G_{\alpha i}$ inhibitrice, ou une protéine $G_{\alpha s}$ activatrice (Saidak *et al.*, 2009b). La première voie qui a été étudiée ici concerne la protéine $G_{\alpha i}$, qui réduit la production d'AMPc par inhibition de l'AC (Figure 72). Nous disposons d'inhibiteurs et d'activateurs de cette voie, la FSK active la production d'AMPc par activation de l'AC ; et la toxine de pertussis (PTX) qui bloque l'activité de la protéine $G_{\alpha i}$, et permet ainsi de favoriser indirectement la production

d'AMPC. Une autre molécule nous permet d'augmenter artificiellement la $[AMPC]_{int.}$, le CI-1044, en inhibant les PDE4.

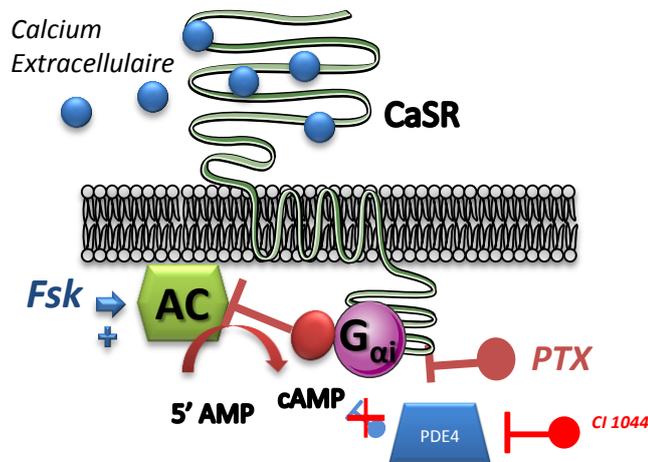


Figure 72. Schéma illustrant la voie de signalisation impliquant la protéine $G_{\alpha i}$ activée par le CaSR. L'activation du CaSR peut conduire à une réduction de la production d'AMPC par l'adénylate cyclase (AC). La toxine de pertussis (PTX) permet d'élever artificiellement la $[AMPC]_{int.}$ en inhibant la $G_{\alpha i}$. La forskoline (FSK) elle, va activer l'AC, et entraîner une élévation de la $[AMPC]_{int.}$. Enfin, l'utilisation d'un bloqueur des PDE4, le CI-1044, permet également d'augmenter la $[AMPC]_{int.}$.

a) Effet d'une élévation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ sur la production d'AMPC

Nous avons testé les effets d'une élévation de Ca^{2+} extracellulaire sur la production d'AMPC, afin de mimer les effets d'une inhibition du CaSR. Pour cela, nous avons réalisé un dosage ELISA permettant la mesure de la $[AMPC]_{int}$ dans les cellules MDA-MB-435s traitées avec la FSK comparées à celles placées dans un milieu riche en Ca^{2+} et dont la $[Ca^{2+}]_{ext.}$ est de 5 mM, pendant 30 min. Ainsi, nous avons montré qu'une élévation de la $[Ca^{2+}]_{ext.}$ pendant 30 minutes pouvait diminuer significativement la $[AMPC]_{int}$ (Figure 73).

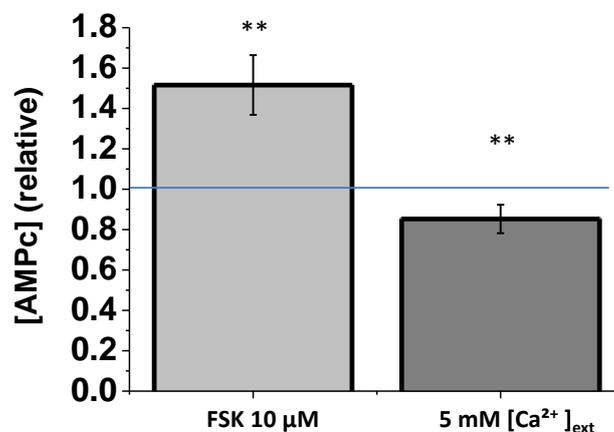


Figure 73. Etude de la $[AMPC]_{int}$ par ELISA, en réponse à une stimulation de l'adénylate cyclase (FSK 10 μ M ; 30 min) et une augmentation de Ca^{2+} extracellulaire (5 mM pendant 30 min) dans les cellules MDA-MN-435s. La $[AMPC]_{int}$ est relativisée à celle mesurée dans les cellules non traitées (N=3 **p=0,008 Mann Whitney).

La $[AMPc]_{int}$ ainsi mesurée varie entre $24,03 \pm 7,8$ pmol/mL en condition contrôle, et $33,63 \pm 7,08$ pmol/mL avec un prétraitement de 30 min avec $10 \mu M$ de FSK. Pour comparaison, l'équipe d' O'Connor et coll. a mesuré la $[AMPc]$ sans stimulation avec la FSK dans les cellules MDA-MB-435s et a obtenu une concentration de 3,7 pmoles/million de cellules (O'Connor *et al.*, 1998). Ici, nous avons mesuré une concentration basale de 24,03 pmoles/mL correspondant à 5 pmoles/million de cellules, ce qui est proche de ce qu'ont obtenu O'Connor et coll.

Afin de compléter ces mesures nous avons utilisé une sonde de FRET, Epac-2-camp, dont le ratio de fluorescence est proportionnel à la $[AMPc]_{int}$. Cette technique permet de mesurer les variations de la $[AMPc]_{int}$ dans des cellules adhérentes. Les données ont été relativisées à celles obtenues avec la FSK. Un exemple de traces obtenues est présenté dans la figure 74.

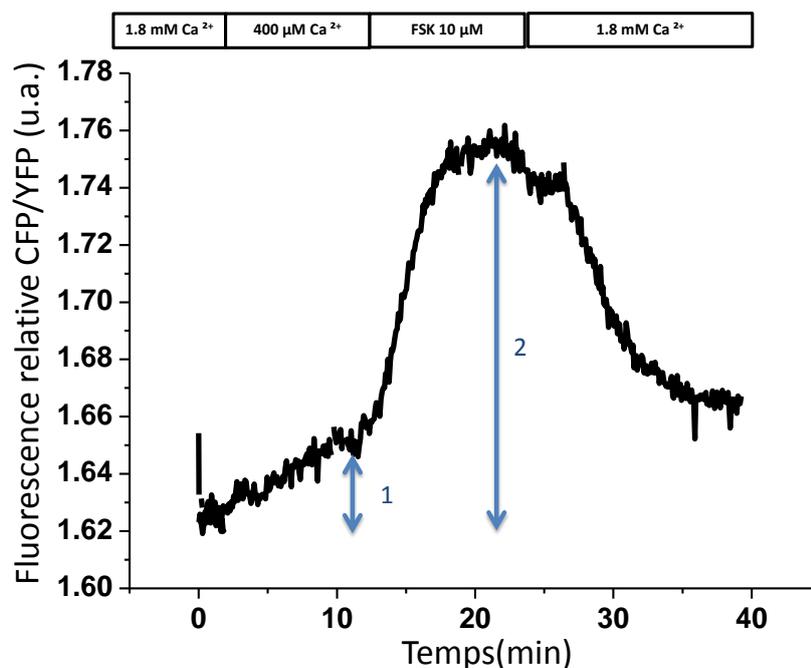


Figure 74. Exemple représentatif de trace obtenue par FRET avec la sonde Epac-2-camp sur les cellules MDA-MB-435s. L'effet d'une diminution de $[Ca^{2+}]_{ext}$ (1) est relativisé par rapport à l'effet maximal de la FSK(2).

L'utilisation de cette sonde de FRET montre qu'une diminution de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ est capable d'augmenter la $[AMPc]_{int}$ dans les cellules MDA-MB-435s. On obtient ainsi une augmentation de la $[AMPc]_{int}$ correspondant à 20 % de l'effet maximal obtenu avec la FSK $10 \mu M$ (Figure 75). Ces résultats de FRET ont été obtenus au sein de l'équipe INSERM UMR-S 769 Signalisation et Physiopathologie Cardiaque situé à Chatenay-Malabry (Université Paris

Sud 11), en collaboration avec le Dr. Grégoire Vandecasteele. Ces résultats montrent que la diminution de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ augmente la $[AMPC]_{int}$, ce qui est cohérent avec la diminution de la $[AMPC]_{int}$ obtenue suite à l'activation du CaSR en réponse à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_{ext}$. Néanmoins, ces résultats sont à répéter en augmentant le taux d'infection par l'adénovirus utilisé pour infecter les cellules, afin d'obtenir des résultats plus robustes. De plus, il serait nécessaire d'étudier les effets du siCaSR sur cette $[AMPC]_{int}$. Nos résultats préliminaires ne sont pas significatifs du fait de ce faible taux d'infection des cellules (nombre de cellules infectées/nombre de cellules totales). Il paraît important de reconduire ces expériences afin de conclure sur le rôle du CaSR.

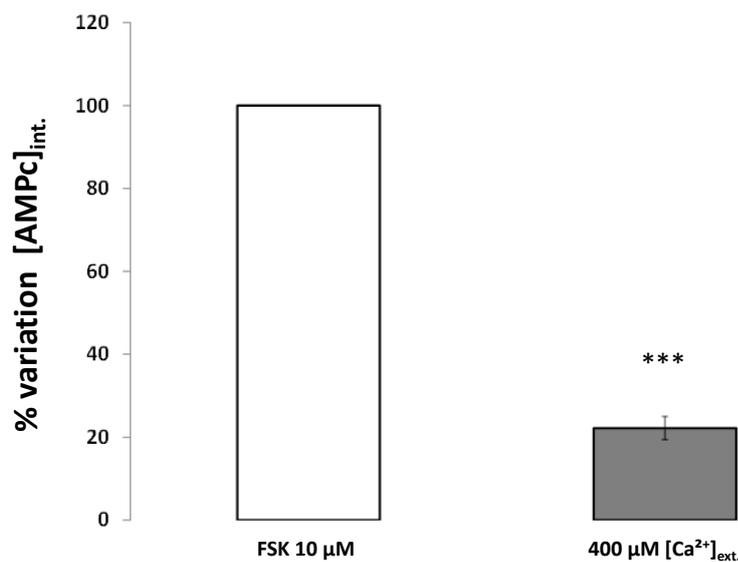


Figure 75. Variation de la $[AMPC]_{int}$ lors des diminutions de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ de 1,8 mM à 400 μ M dans les cellules MDA-MB-435s. L'effet est relativisé par rapport à l'effet maximal obtenu à l'aide de la FSK 10 μ M en présence de 1,8 mM de $[Ca^{2+}]_{ext}$. (N=7, ***p<0.001 Mann Whitney).

L'ensemble de ces résultats nous a permis de montrer que la $[Ca^{2+}]_{ext}$ influence la $[AMPC]_{int}$. En effet, une augmentation de Ca^{2+} extracellulaire diminue la $[AMPC]_{int}$ et inversement. Il s'agirait d'une régulation par le CaSR *via* la protéine G_{α_i} , même si l'implication directe du CaSR reste à démontrer. En effet, si l'on ne retrouve plus l'effet du Ca^{2+} extracellulaire en absence de ce CaSR, on pourra affirmer que l'effet du Ca^{2+} extracellulaire passe par l'activation du CaSR.

b) Implication de la protéine $G_{\alpha i}$ dans la régulation de l'expression de SK3

La PTX est un inhibiteur spécifique des protéines $G_{\alpha i}$. Nous l'avons utilisée pour étudier le rôle de ces protéines $G_{\alpha i}$ dans la transcription de SK3. Ainsi un traitement des cellules MDA-MB-435s de 12 h avec la PTX, s'est traduit par une diminution de 20 % de l'activité du promoteur *KCNN3* (Figure 76). L'effet maximal (20 %) est obtenu dès 50 ng/mL. Nous avons utilisé cette toxine durant 12 h et à une concentration maximale de 200 ng/mL, afin d'être cohérent avec ce qui est connu dans la littérature concernant cette toxine (Zhong *et al.*, 2012).

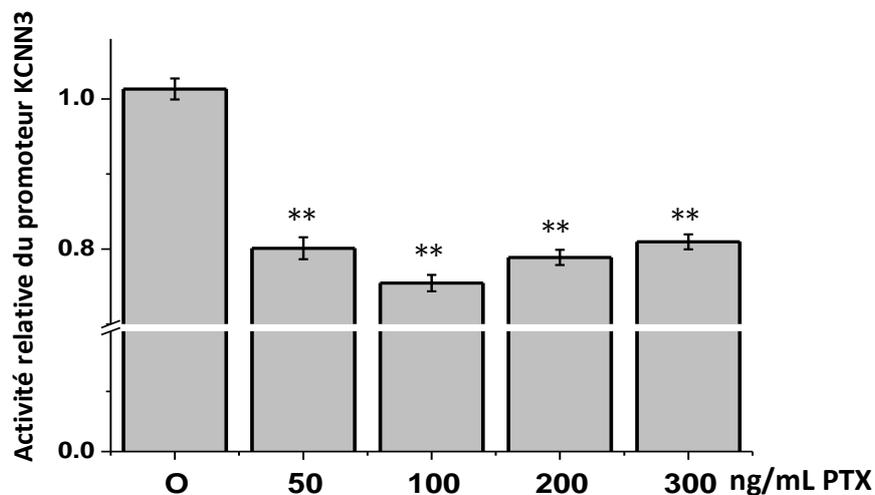


Figure 76. Effet de l'inhibition de la protéine $G_{\alpha i}$ par la PTX en présence de 1,8 mM de Ca^{2+} extracellulaire (12 h de traitement) sur l'activité du promoteur *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s-p*KCNN3* (N=3 ** $p < 0.05$ Kruskal Wallis et Post Hoc de Dunnett's, effet significatif par rapport au contrôle sans traitement).

Il y aurait donc une régulation de la transcription de SK3 par la protéine $G_{\alpha i}$ activée par le CaSR en réponse à l'élévation de Ca^{2+} extracellulaire. Cependant, aucun effet n'est observé sur la protéine SK3 (Figure 77). Cette absence d'effet pourrait s'expliquer par un temps de traitement trop court utilisé pour le western blot. En effet, la diminution d'activité du promoteur est observée 12 h après traitement, et n'est pas retrouvée sur la protéine SK3 après 15 h de traitement. Il aurait sans doute fallu réaliser un traitement plus long, probablement 24 h, afin d'observer un effet de la PTX sur la protéine.

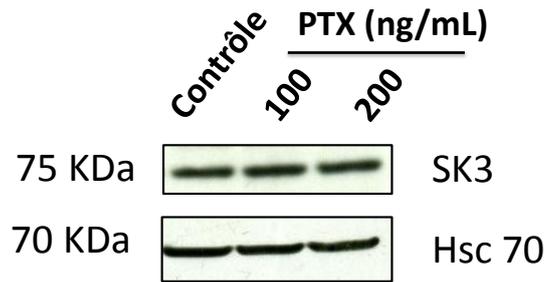


Figure 77. Western blot représentatif de l'effet de la PTX sur la protéine SK3 après 15 h d'incubation dans les cellules MDA-MB-435s en présence de 1,8 mM de $[Ca^{2+}]_{ext}$ (N=2, Hsc 70 représentant le contrôle protéique interne).

Puisque la protéine $G_{\alpha i}$ est impliquée dans l'expression transcriptionnelle de SK3, et que cette protéine G est responsable d'une diminution de la $[AMPC]_{int}$, il nous a paru intéressant de vérifier si la $[AMPC]_{int}$ avait une influence sur l'expression de SK3.

c) Influence de la $[AMPC]_{int}$ sur l'expression de SK3

Peu de molécules visant à réduire la $[AMPC]_{int}$ sont disponibles, c'est pourquoi nous avons essentiellement utilisé des molécules permettant d'augmenter cette $[AMPC]_{int}$, telles que la FSK qui active l'AC ou le CI-1044, un inhibiteur des PDE4s (Burnouf *et al.*, 2000). On agit ainsi dans le sens contraire d'une activation du CaSR, qui aurait tendance à diminuer cette $[AMPC]_{int}$ dans notre modèle cellulaire. La figure 78 montre que 10 μ M de FSK diminuent l'expression protéique de SK3.

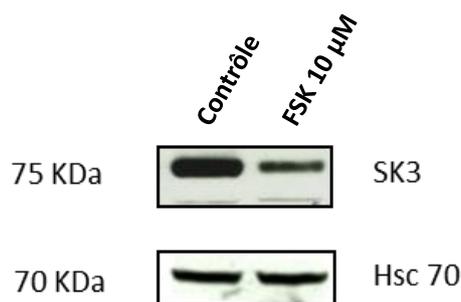


Figure 78. Western blot montrant l'effet de la FSK sur l'expression protéique de SK3 dans les cellules MDA-MB-435s (N=3). (Hsc 70 représentant le contrôle protéique interne).

Nous avons démontré que la régulation de l'expression de SK3 par le Ca^{2+} extracellulaire *via* le CaSR avait lieu au niveau transcriptionnel. Nous avons donc testé l'effet de la FSK sur le niveau d'expression des transcrits *KCNN3* et l'activité du promoteur *KCNN3*.

La FSK incubée pendant 24 h avec les cellules MDA-MB-435s diminue fortement l'expression des transcrits *KCNN3* (Figure 79).

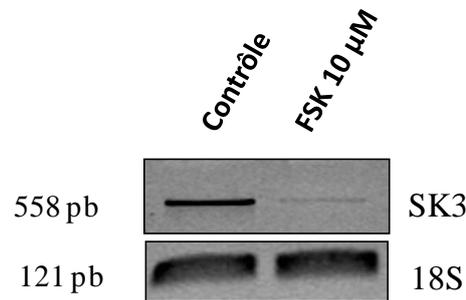


Figure 79. Effet d'un traitement de 24 h par la FSK 10 μM sur les transcrits *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s (PCR semi-quantitative) (N=2). Les ARN 18S représentent le contrôle interne.

La figure 80A montre que la FSK diminue l'activité du promoteur *KCNN3*. L'effet est dépendant de la dose avec un IC_{50} estimé de 0,78 μM de FSK. Le CI-1044 a le même effet sur ce promoteur. Comme nous pouvons l'observer sur la figure 80.B, les deux molécules, la FSK et le CI-1044 ont un effet additif. Chaque molécule prise séparément diminue l'activité du promoteur *KCNN3* de 25 et 35 % respectivement, et lorsque celles-ci sont incubées en même temps, on obtient une diminution qui atteint 60 %, valeur qui est égale à la somme des deux effets pris séparément. L'AMPC a donc un effet répresser sur la transcription de SK3.

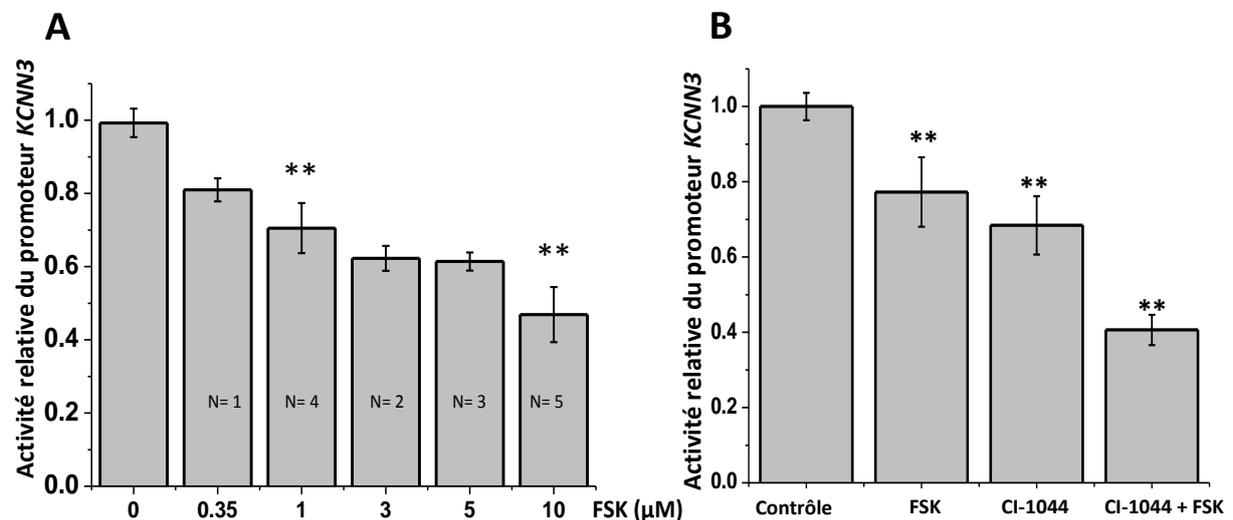


Figure 80. A. Relation effet-dose de la FSK sur l'activité du promoteur *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s. (N : nombre d'expériences, chaque N représente des triplicatas (n=3), ** $p < 0,05$ Kruskal-Wallis et post-hoc de Dunnett's 1 et 10 μM FSK vs contrôle). B. Effets de la FSK et du CI-1044 sur l'activité du promoteur *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s (N=3, ** $p < 0,05$ Kruskal-Wallis et post-hoc de Bonferroni, comparaison deux à deux).

L'ensemble de ces résultats indique que l'élévation d'AMPc intracellulaire diminue l'expression de SK3. Il est probable que le CaSR, en détectant l'augmentation de Ca^{2+} extracellulaire, activerait une protéine $G_{\alpha i}$, elle-même réprimant l'AC. Cette inhibition diminuerait la $[AMPc]_{int}$, ce qui lèverait l'inhibition de l'AMPc sur le promoteur *KCNN3*. Il existe de nombreuses cibles de l'AMPc pouvant expliquer cette régulation négative de l'expression de SK3.

d) Rôles des effecteurs de l'AMPc sur l'expression de SK3

L'AMPc peut activer plusieurs kinases et autres protéines impliquées dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires comme nous avons pu le voir dans l'introduction. Une attention particulière a été portée ici sur la PKA ainsi que sur l'Epac, deux cibles privilégiées de l'AMPc (Figure 81).

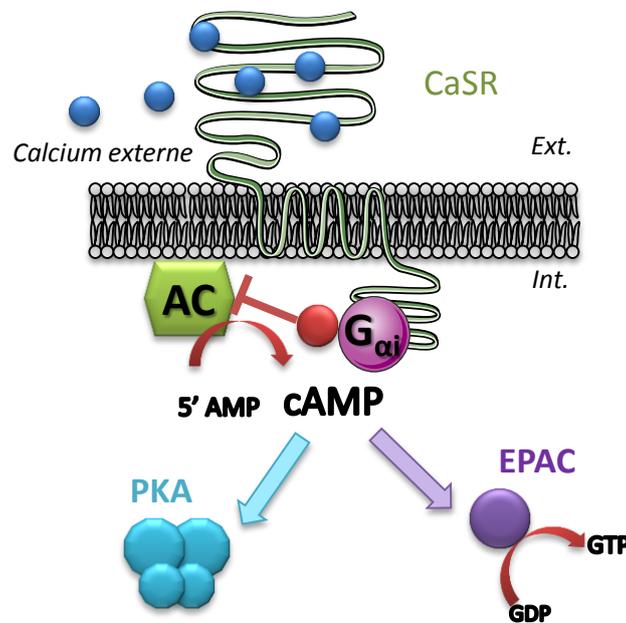


Figure 81. Voies potentiellement impliquées dans la régulation de la transcription de *KCNN3* par l'AMPc. Le CaSR active la protéine $G_{\alpha i}$, qui va diminuer la $[AMPc]$ entraînant une diminution de l'activité de la PKA et/ou de l'Epac. La PKA va alors cesser de phosphoryler certaines protéines, tels que des facteurs de transcription, tandis que l'Epac verra une diminution de l'échange de GDP contre de GTP utiles à l'activité d'autres petites protéines G telles que Rap1, Ras, etc.

Dans un premier temps un inhibiteur de la PKA a été utilisé, le KT 5720, afin d'étudier ses effets sur la protéine SK3. Aucun effet visible n'est observé sur l'expression de la protéine SK3 (Figure 82).

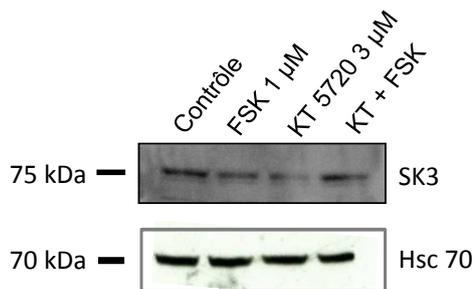


Figure 82. Western blot montrant les effets d'un traitement de 24 h avec le KT 5720, un inhibiteur de la PKA sur l'expression de la protéine SK3, avec et sans FSK, dans les cellules MDA-MB-435s (N=2). Hsc 70 est la protéine utilisée comme contrôle de dépôt.

Cependant, lorsque l'on teste les effets du KT 5720 sur l'activité du promoteur *KCNN3*, on observe qu'une inhibition de la PKA augmente l'activité de ce promoteur (Figure 83). Dans ce cas, le fait de prétraiter avec le KT 5720, 30 minutes avant d'ajouter la FSK, permet de prévenir les effets de celle-ci sur l'activité du promoteur de SK3 (Figure 83). L'absence d'effet observable sur la protéine peut sans doute s'expliquer par une durée trop courte de traitement et de l'ajout simultané des deux molécules, sans prétraitement par le KT 5720.

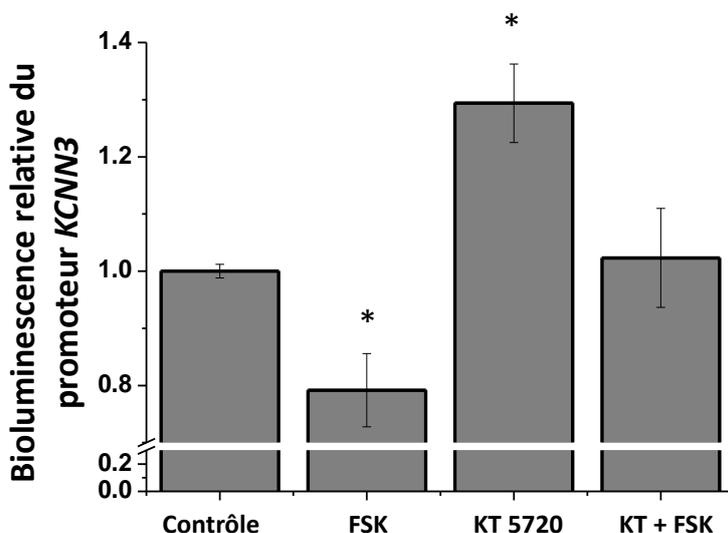


Figure 83. Effet d'un prétraitement de 30 min avec le KT 5720 (3 μM) avec ou sans FSK (1 μM, 24 h) sur la transcription de *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s (N=3, *p<0,05, ANOVA et post-hoc Bonferroni).

La PKA semble donc impliquée dans la régulation de la transcription du gène *KCNN3* en la réprimant. Il existe plusieurs autres effecteurs de l'AMPc, tels que l'Epac ou encore l'AMPK (une kinase dépendante de l'AMPc). L'Epac est un facteur d'échange GDP/GTP, indispensable à l'activité des petites protéines G intracellulaire. Il permet d'engendrer plusieurs voies de signalisation qui pourraient également réguler l'expression de SK3. Afin

d'étudier les effets d'Epac sur l'expression de SK3, nous disposons d'un activateur sélectif de cette protéine, l'analogue de l'AMPc sélectif pour l'Epac ou ESCA (Epac-Selective cAMP Analog ou 8CPT-2'-OMe-cAMP). Il a été testé sur les cellules MDA-MB-435s, mais ne présente aucun effet visible sur l'expression la protéine SK3 après 24 h de traitement, aux deux concentrations utilisées habituellement : 100 et 200 μ M (Figure 84).

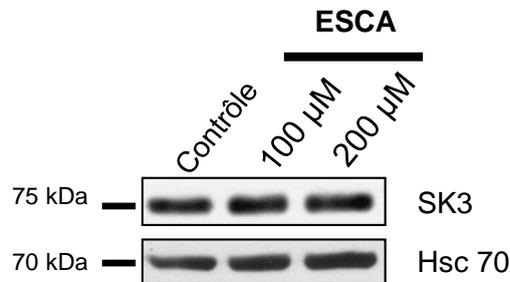


Figure 84. Western blot représentatif des effets sur l'expression protéique de SK3 suite au traitement de 24 h par un activateur sélectif de l'Epac : l'ESCA (100 et 200 μ M) dans les cellules MDA-MB-435s (N=2). Hsc 70 est la protéine utilisée comme contrôle de dépôt.

Il serait intéressant de réaliser des traitements plus longs avec l'ESCA pour espérer entrainer des effets sur l'expression protéique de SK3. Par ailleurs, il faudrait tester les effets de l'ESCA sur l'activité du promoteur *KCNN3*, et pour apporter des informations sur la régulation transcriptionnelle de *KCNN3* par l'Epac.

La voie PKA semblerait donc être impliquée dans la régulation négative de l'expression du canal SK3. Ainsi, la PKA serait réprimée par l'activité du CaSR qui augmenterait ainsi l'expression de SK3. Cela indique qu'il existe soit un FT répresseur de l'expression de SK3 activé par la PKA, soit un activateur de cette transcription qui serait réprimé par la PKA.

e) Identification du facteur de transcription répresseur de la transcription de SK3

Il existe de nombreux facteurs de transcription régulés par le taux d'AMPc intracellulaire, et qu'ils soient activateurs ou répresseurs, ils sont tous classés sous l'appellation CREB (CRE-Binding protein). Ces FT reconnaissent et se fixent sur des séquences nucléotidiques qui leur sont spécifiques, sur les promoteurs des gènes dont ils régulent la transcription, appelés CRE (cAMP Response Element). Le promoteur *KCNN3* possède cet élément de réponse.

Dans un premier temps, nous avons muté le site CRE présent sur le promoteur *KCNN3*, par mutagenèse dirigée. En substituant l'un des nucléotides de ce site, et en comparant l'activité du promoteur *KCNN3* muté (CREm-PROM) à celle du promoteur natif (WT-PROM) transfectés de manière transitoire dans les cellules MDA-MB-435s, on observe une forte induction de l'activité du promoteur *KCNN3* contenant le site CRE muté. Ceci suggère une répression permanente de l'expression transcriptionnelle de SK3, lorsque le site CRE est présent (Figure 85A).

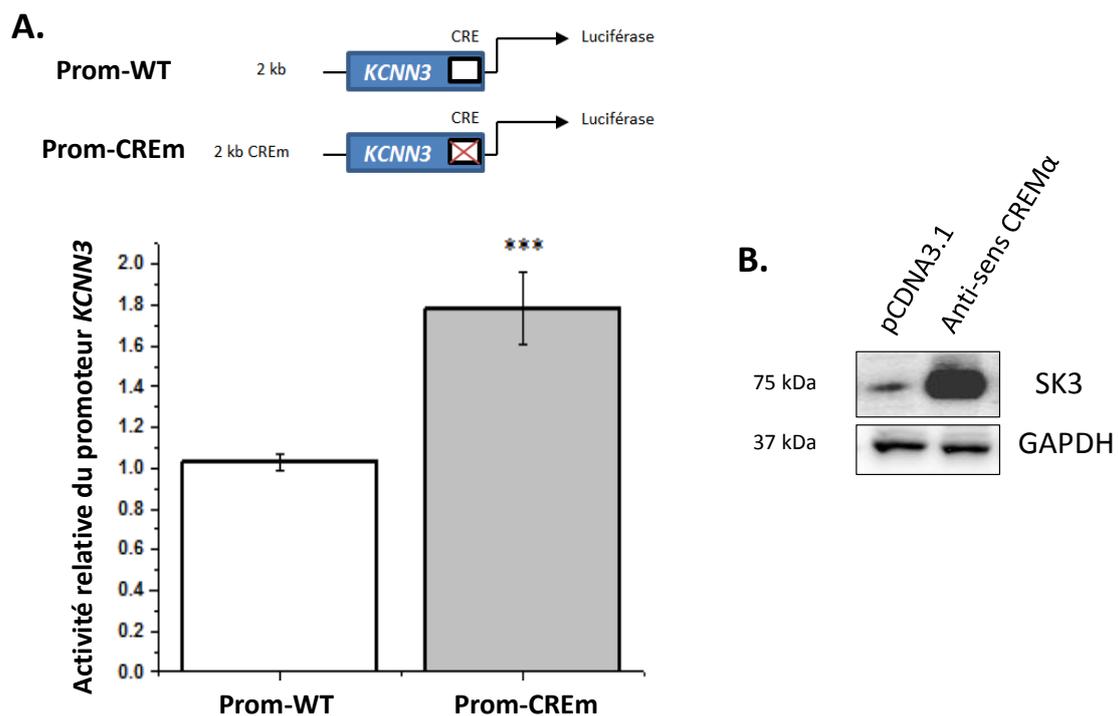


Figure 85. Etude du rôle des FT répresseurs de la famille CREB sur l'expression de SK3. A. Effet d'une mutation sur le site CRE, empêchant la fixation des FT de la famille CREB, présent sur le promoteur *KCNN3*. Cet effet est comparé à l'activité du promoteur *KCNN3* natif, et les deux plasmides ont été transfectés de manière transitoire dans les cellules MDA-MB-435s (N=3, t-test ***p<0.001). B. Western blot présentant l'effet d'une incubation des cellules MDA-MB-435s avec une séquence ARN anti-sens dirigée contre CREMα sur l'expression protéique de SK3 (N=3).

Au regard de ce résultat, il semblerait que le FT impliqué serait un facteur de transcription appartenant à cette famille CREB, mais répresseur. Il pourrait donc s'agir soit de CREMα, soit d'ICER. A notre connaissance, il n'est pas possible à l'heure actuelle de différencier ces deux FT avec les outils dont nous disposons. Afin d'étudier le rôle de ces deux FT répresseurs, une séquence anti-sens ciblant CREMα a été utilisée par le Dr. Aurélie Chantôme. Cette séquence est une séquence ARN simple brin, complémentaire de l'ARNm de CREMα, va se fixer sur cette séquence ARNm et entrainer sa dégradation par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) dans les cellules MDA-MB-435s. Nous pensons qu'il

est probable que cet ARN anti-sens cible également l'ARNm d'ICER, qui possède une séquence commune avec CREM α . Ainsi, l'invalidation de ces deux FT, entraîne une augmentation très importante de l'expression de la protéine SK3 (Figure 85B). L'un de ces deux FT réprime donc fortement l'expression de SK3. Il serait intéressant de rechercher des outils permettant de différencier ces deux FT, tels que des ARN interférents spécifiques, afin de préciser ce résultat.

La voie AMPc/PKA n'est pas la seule à être impliquée dans les cellules MDA-MB-435s en réponse à l'activation du CaSR, puisqu'il est capable d'entraîner l'activation d'autres protéines G, telles que la protéine G α_{q11} .

3.1.4. Rôle de la voie G α_{q11}

Nous avons vu que le CaSR peut également activer d'autres protéines G, et principalement la protéine G α_{q11} qui est une protéine G activatrice, capable d'augmenter la $[Ca^{2+}]_{int}$. (Figure 86). Par ailleurs, cette voie peut également activer des canaux Ca $^{2+}$ présents sur la membrane plasmique via le DAG et la PKC, le résultat étant également une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{int}$. Le Ca $^{2+}$ va ensuite activer des voies de régulation de la transcription impliquant des FT dépendants de la $[Ca^{2+}]_{int}$. Celui auquel nous nous sommes intéressés, est NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), qui est activé par déphosphorylation *via* la CaN, phosphatase elle-même activée par l'augmentation de $[Ca^{2+}]_{int}$ (Coulon V., 2001).

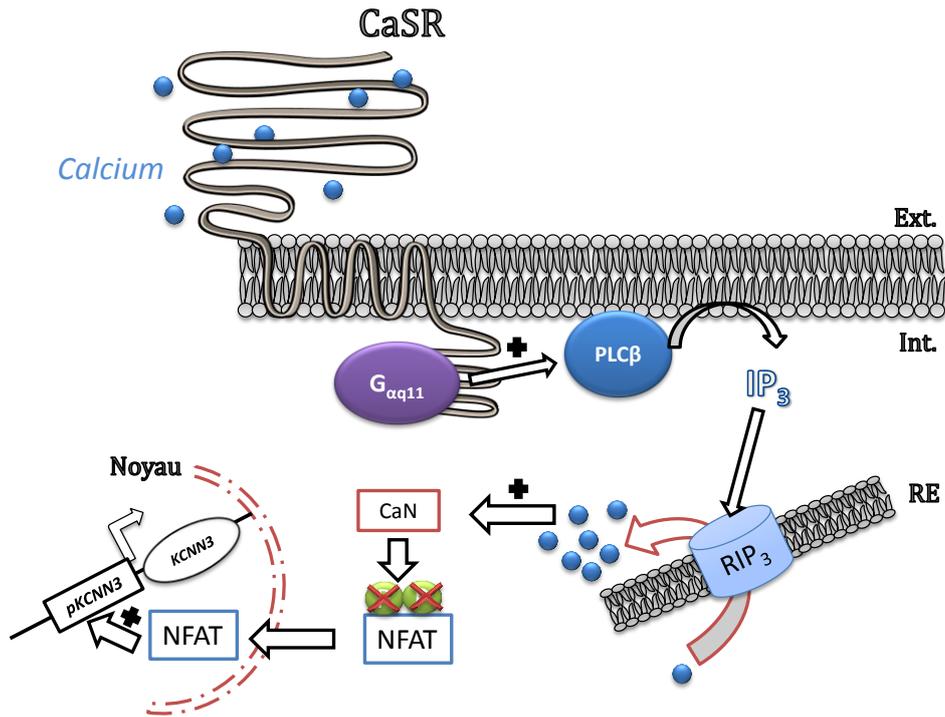


Figure 86. Modèle hypothétique montrant la régulation potentielle de l'expression du canal SK3 par la voie dépendante de la protéine $G_{\alpha q11}$. L'activation de la protéine $G_{\alpha q11}$ par le CaSR entraîne l'activation de la phospholipase C β (PLC β), qui dégrade le PIP $_2$ en IP $_3$ (Inositol triphosphate). L'IP $_3$ va alors activer son récepteur (RIP $_3$) ce qui a pour conséquence une sortie de Ca $^{2+}$ dans le cytoplasme. La calcineurine (CaN), une phosphatase activée par le Ca $^{2+}$ va dé-phosphoryler NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), qui peut ensuite aller se fixer sur le promoteur *KCNN3*, et entraîner la transcription de la protéine SK3.

Afin de tester l'implication de cette voie dans la régulation du canal SK3, nous avons utilisé deux inhibiteurs de la CaN : la CsA et le domaine auto-inhibiteur de la CaN (AID). L'inhibition de cette phosphatase conduit à l'inhibition de NFAT. Les traitements de 24 h avec la CsA (8 μ M) et l'AID (50 μ M) ne montrent pas d'effet visible sur la protéine SK3 ni sur les transcrits *KCNN3*, respectivement, lorsque la $[Ca^{2+}]_{ext}$ dans le milieu est de 1,8 mM (Figure 87).

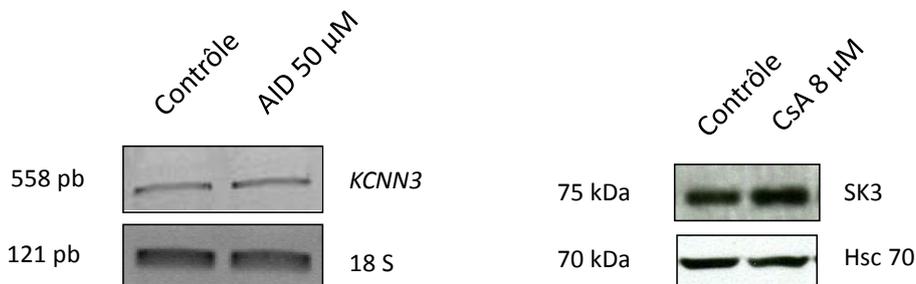


Figure 87. Effets de l'inhibition de la CaN par son domaine auto-inhibiteur (AID 50 μ M, à gauche), et par la CsA (8 μ M) sur l'expression des transcrits *KCNN3* (à gauche) et de la protéine SK3 (à droite). Les cellules MDA-MB-435s ont été traitées pendant 24 h avec ces molécules (N=2).

Par contre, lorsque la $[Ca^{2+}]_{ext}$ est augmentée jusqu'à 5mM, la CsA diminue l'activité du promoteur *KCNN3* de 35 % (Figure 88). Cette diminution de cette activité est associée à une diminution d'expression de la protéine SK3 dans ces conditions de $[Ca^{2+}]_{ext}$ (Figure 89). Nous pensons que cet effet différentiel, observé en présence de ces deux $[Ca^{2+}]_{ext}$ (1,8 mM vs 5 mM), est sans doute un effet lié à l'activité du CaSR qui serait plus importante en présence d'une forte $[Ca^{2+}]_{ext}$.

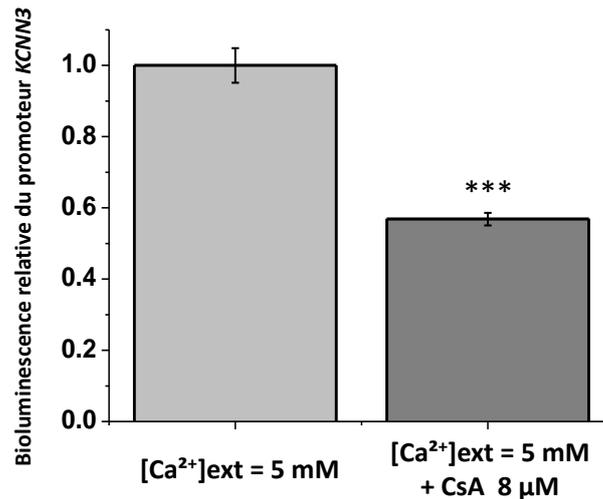


Figure 88. Effets de l'inhibition de la voie NFAT, par la CsA (8 μM , 24 h) en présence d'une $[Ca^{2+}]_{ext}$ de 5 mM sur l'activité du promoteur *KCNN3* dans les cellules MDA-MB-435s (N=3, Mann Whitney, ***p<0.001).

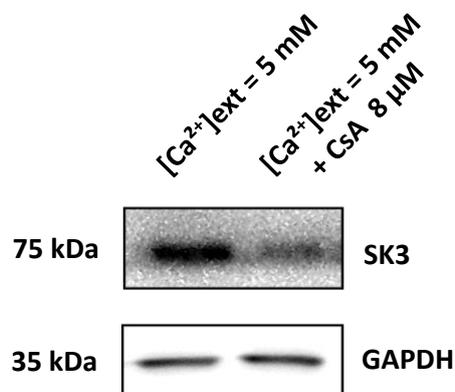


Figure 89. Western blot représentatif de l'effet de l'inhibition de la translocation nucléaire de NFAT par la CsA (8 μM ; 24 h), dans les cellules MDA-MB-435s, en présence de 5 mM de Ca^{2+} extracellulaire (N=3).

La CsA a réduit donc l'expression de SK3, uniquement lorsque la $[Ca^{2+}]_{ext}$ augmente de 1,8 à 5 mM. Ceci indique la voie NFAT pourrait être activée par le CaSR, en réponse à l'augmentation du Ca^{2+} extracellulaire, et ainsi augmenter l'expression du canal SK3. Ainsi,

quelle que soit la voie de signalisation empruntée ($G_{\alpha q11}$ ou $G_{\alpha i}$), une activation du CaSR entraînerait une augmentation de l'expression de SK3.

Cependant, il ne faut pas exclure la possibilité d'avoir des effets indépendants de ce CaSR, puisque l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ augmente la FEM en faveur d'une entrée de Ca^{2+} *via* certains canaux calciques tels que Orai 1 (Chantôme *et al.*, 2013) et cette entrée pourrait favoriser également l'expression du canal SK3 *via* NFAT. Cette hypothèse fait l'objet d'un autre travail dans notre équipe et ne sera donc pas développé ici.

3.1.5. Discussion

Nos résultats montrent pour la première fois une régulation de l'expression de la protéine SK3 par le Ca^{2+} extracellulaire. Jusqu'ici, la seule régulation de l'expression de SK3 connue était celle impliquant les œstrogènes, en particulier le 17- β -œstradiol (Bosch *et al.*, 2013; Pierce *et al.*, 2010) qui régule positivement la transcription de SK3 par l'intermédiaire des FT de la famille Sp (Specific protein). L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ favorise l'expression de la protéine SK3 et des transcrits *KCNN3*. Il s'agit d'une régulation de la transcription de *KCNN3* puisque l'activité transcriptionnelle du promoteur *KCNN3* est favorisée par le Ca^{2+} extracellulaire. Récemment, nous avons démontré que le canal SK3 exprimé dans les cellules cancéreuses humaines du sein MDA-MB-435s était impliqué dans le développement de métastases osseuses dans un modèle murin de xénogreffe orthotopique (Chantôme *et al.*, 2013). Les métastases osseuses issues du cancer du sein sont associées à une ostéolyse prononcée, responsable d'une dégradation de la matrice osseuse, et donc d'une libération massive de certains facteurs osseux dans le microenvironnement (SDF-1, RANKL, TGF β , Ca^{2+} ...). L'hypothèse de ce travail a consisté à se demander si l'un de ces facteurs pouvait favoriser l'expression du canal SK3. Nous nous sommes particulièrement intéressés au Ca^{2+} extracellulaire dont la concentration peut être très élevée localement (Kingsley *et al.*, 2007), et pourrait entraîner une augmentation de l'expression de SK3. Le canal SK3 serait alors fortement exprimé et favoriserait le développement de métastases osseuses, qui à leur tour accentueraient le phénomène de lyse osseuse, et entretiendraient le cycle vicieux ainsi installé (Das *et al.*, 2012).

Le Ca^{2+} extracellulaire régule donc l'expression du canal SK3, et ce, au niveau transcriptionnel, un effet qui passe par l'activation du CaSR. Ce récepteur est exprimé dans nos cellules d'intérêt, les MDA-MB-435s, et activé par une $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$ minimale de 1 mM (Liu *et al.*, 2009). L'inhibition transitoire par siARN de ce CaSR diminue l'expression des transcrits *KCNN3* et de la protéine SK3, et son activation par des agonistes, les augmente. De plus, on observe une spécificité de l'effet sur le canal SK3, puisque les transcrits *KCNN2*, codant pour le canal SK2, ne sont pas affectés par l'invalidation transitoire du CaSR. Nous avons montré également que l'invalidation du CaSR inhibe l'augmentation d'expression de SK3 induite par l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$. Le CaSR a donc un rôle important dans la régulation de l'expression de SK3 induite par le Ca^{2+} extracellulaire. Ce CaSR est connu par ailleurs pour réguler l'expression d'autres canaux K^+ , puisqu'il diminue l'expression des canaux K_{IR} 4.1 et K_{IR} 4.2 (Cha *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2007).

Ce récepteur couplé aux protéines G est capable d'activer plusieurs voies de signalisation, suite à son activation par le Ca^{2+} extracellulaire. En effet, il permet d'induire une voie impliquant la protéine G_{α_i} et une voie dépendante de la $G_{\alpha_{q11}}$, avec des conséquences différentes sur la physiologie cellulaire (Brennan *et al.*, 2013; Saidak *et al.*, 2009b). Il a été montré que ce récepteur peut activer des voies de signalisation différentes en fonction du type cellulaire. Par ailleurs, des voies peuvent être activées dans certaines cellules épithéliales cancéreuses du sein alors qu'elles ne le sont pas dans les cellules épithéliales du sein normales (Mamillapalli *et al.*, 2008). En étudiant la première voie induite par le CaSR et impliquant la protéine G_{α_i} qui diminue la $[\text{AMPc}]_{\text{int.}}$, on observe une forte diminution très reproductible de l'expression de SK3, en particulier au niveau transcriptionnel. De manière intéressante, l'inhibition de la G_{α_i} et l'élévation d'AMPc, ont les mêmes effets, à savoir une diminution de la transcription de *KCNN3*, ce qui est cohérent avec la mise en jeu de cette voie CaSR/ G_{α_i} . L'AMPc est connu pour réguler essentiellement non pas l'expression mais l'activité de canaux impliqués dans l'excitabilité cellulaire des tissus cardiaques et nerveux (Antoni, 2012; Perera *et al.*, 2013). Or nous avons démontré ici pour la première fois qu'un canal ionique impliqué dans la colonisation osseuse par les cellules cancéreuses du sein voit son expression régulée par l'AMPc, ce qui confère à ce dernier un rôle jusqu'alors inconnu dans le cancer.

Il faut noter l'étude de Shui et coll. qui a montré récemment qu'une forme particulière du CaSR (SNP : single nucleotide polymorphism) est retrouvée exprimée chez des patients ayant en commun la présence de métastases osseuses consécutives au développement d'un cancer de la prostate (Shui *et al.*, 2013). Il existe de nombreux polymorphismes du CaSR, et il se peut que le CaSR exprimé par les cellules cancéreuses du sein soit une isoforme possédant ce genre de mutation ponctuelle ou SNP. Nous émettons l'hypothèse que la forme de CaSR exprimée par les cellules MDA-MB-435s soit une forme pouvant résulter d'un tel polymorphisme. En outre, plusieurs éléments indiquent la possibilité d'une expression d'une forme du CaSR non détectable à savoir : i) nous n'avons pas pu mettre en évidence la présence de ce CaSR dans notre modèle cellulaire, quel que soit l'outil utilisé (western blot ou PCR) ii) certains effets étudiés ne sont visibles qu'à la $[Ca^{2+}]_{ext}$ de 5 mM qui ne le sont pas à la $[Ca^{2+}]_{ext}$ physiologique. Il est également possible que le niveau d'expression protéique du CaSR soit très faible dans notre modèle cellulaire. Il faut noter que l'activation du CaSR est maximale à 5 mM (Hannan *et al.*, 2012).

Afin d'aller plus loin dans l'étude de la régulation de l'expression du canal SK3 par l'AMPC, il a fallu identifier les effecteurs responsables de la diminution de l'expression de SK3. La régulation de la transcription par un inhibiteur de la PKA (KT 5720) nous a permis de montrer que la PKA est impliquée dans la régulation de l'expression de SK3. Des effets différents ont été retrouvés par l'équipe de Ren et coll. qui ont, eux, montré une régulation négative de l'adressage membranaire de SK2 par la PKA (Ren *et al.*, 2006). Il serait intéressant d'étudier l'implication d'autres protéines activées par l'AMPC, telles que la protéine kinase AMPK (AMPC Kinase). En effet, cette dernière est exprimée dans plusieurs types de cancers (poumons (Brock *et al.*, 2012), ovaire (Dupont *et al.*, 2012), et colon (Huo *et al.*, 2013)). De plus, celle-ci a la capacité de réguler l'expression du canal Kv7.1, et de phosphoryler directement le canal BK_{Ca} (Andersen *et al.*, 2012) et pourrait également réguler l'expression du canal SK3. Nos résultats ne permettent pas d'affirmer un rôle de l'Epac dans la régulation de l'expression de SK3. Des expériences complémentaires sur l'activité du promoteur *KCNN3* avec une gamme de concentrations et de durées de traitement plus larges d'ESCA ainsi qu'une élévation de $[Ca^{2+}]_{ext}$ pourraient permettre de conclure sur le rôle d'Epac.

Ces premiers résultats obtenus dans cette première partie nous ont permis de montrer que la voie AMPc/PKA exerce une répression permanente de la transcription du gène *KCNN3* (Figure 90). Le CaSR, en diminuant le taux d'AMPc intracellulaire, permettrait donc de lever l'inhibition de l'AMPc sur la transcription du gène *KCNN3*, et d'induire ainsi l'expression de la protéine SK3. Nos données montrent que la mutation de CRE entraîne une augmentation très importante de l'activité du promoteur *KCNN3*, ce qui indique que ce site est en permanence réprimé. L'inhibition de l'expression de deux FT répresseurs de la famille CREB, CREM α et ICER, a permis de lever cette répression et d'augmenter très fortement l'expression de SK3. Nous avons donc démontré que l'un de ces deux FT répresseurs est responsable de cette répression permanente sur le promoteur *KCNN3*. De manière intéressante, il a été montré que CREM α était surexprimé dans les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-435s (Balestrieri *et al.*, 2009). Il y a donc un de ces deux facteurs répresseurs, qu'il reste à discriminer, qui se fixe sur CRE, et inhibe ainsi en permanence la transcription de *KCNN3*. Nous pensons que lorsque la $[Ca^{2+}]_{ext}$ augmente, le CaSR s'active, et en inhibant la production d'AMPc, il lève l'inhibition de ce dernier sur la transcription de *KCNN3*, et augmente ainsi l'expression de SK3. Cette voie Ca^{2+} /CaSR/AMPc pourrait expliquer l'expression du canal SK3 dans les métastases osseuses, ce canal participant alors à la colonisation de ce tissu par les cellules cancéreuses du sein.

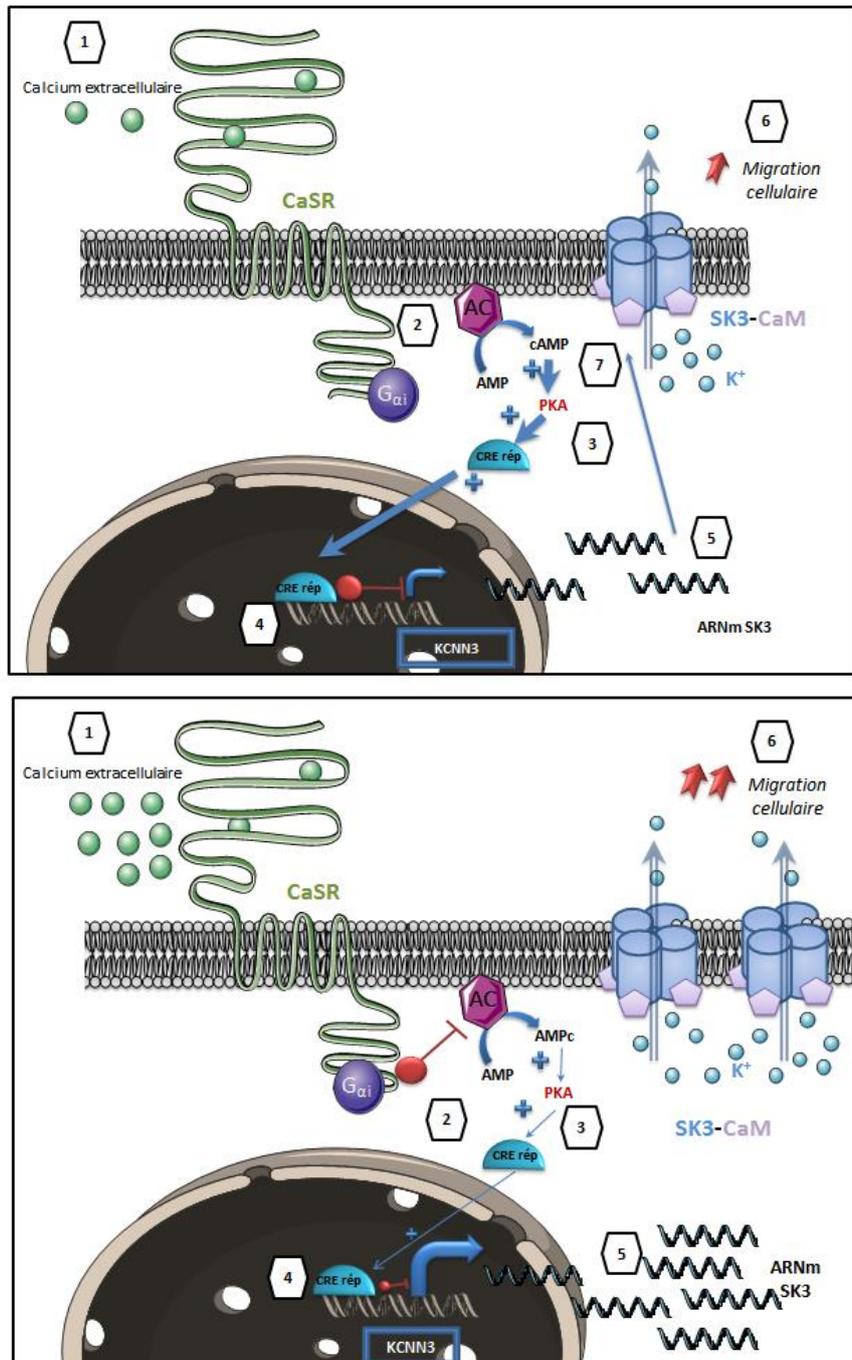


Figure 90. Modèle hypothétique de la régulation de la transcription du canal SK3 par le Ca^{2+} extracellulaire. **A.** Dans les conditions normales ($[\text{Ca}^{2+}]_e = 1,8 \text{ mM}$), le CaSR réduit faiblement l'activité de la voie AMPc-PKA (1), via la protéine $G_{\alpha i}$ (2). Cette faible inhibition de la voie AMPc-PKA maintient un niveau d'AMPc relativement élevé, qui active la PKA(3). La PKA peut alors phosphoryler un répresseur de la famille CREB, CREM α ou ICER (regroupés ici sous le terme CRE rép) (4), qui réprime l'expression transcriptionnelle du gène *KCNN3* (5) et donc la migration dépendante du canal SK3. **B.** Dès lors que le Ca^{2+} augmente (ostéolyse : $[\text{Ca}^{2+}]_e = 5 \text{ mM}$) le CaSR est activé plus intensément (1). Ceci réduit considérablement l'activation de la voie AMPc-PKA (2) et lève l'effet du répresseur (3) sur le site CRE présent sur le promoteur du gène *KCNN3* (4). On observe alors une augmentation de l'expression de SK3 (5) conduisant à une migration cellulaire plus importante des cellules cancéreuses du sein et participant ainsi à la colonisation osseuse(6).

Le CaSR peut également activer la voie $G_{\alpha q11}/PLC\beta$ et entraîner une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{int}$. Nos données préliminaires montrent que lorsque la $[Ca^{2+}]_{ext}$ augmente, nous obtenons un effet de la CsA sur l'expression de SK3. Ces données suggèrent que le CaSR, activé par l'élévation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$, régule positivement l'expression de SK3 par l'intermédiaire de NFAT. Cependant, il est probable que la totalité des effets observés sur l'expression de SK3 en réponse à cette augmentation de $[Ca^{2+}]_{ext}$ ne soient pas tous dus à l'activité du CaSR. En effet, si la $[Ca^{2+}]_{ext}$ augmente, on assiste à une augmentation de la FEM en faveur d'une entrée de calcium *via* des canaux calciques tels que Orai1. Il serait nécessaire d'étudier l'implication de ces canaux calciques dans ce phénomène afin de préciser les mécanismes en jeu. Toutefois, peu importe la voie empruntée, le résultat de cette élévation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$ est une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{int}$ qui peut alors activer NFAT et entraîner l'expression de SK3. Cependant, il existe d'autres facteurs de transcription qui sont également dépendants de la $[Ca^{2+}]_{int}$ tels que DREAM (downstream responsive element antagonist modulator) ou encore CREB. En effet, CREB peut être phosphorylé et ainsi activé par la CaMKII et la CaMKIV (Calmodulin Kinase II et IV), elles-mêmes activées par le Ca^{2+} intracellulaire via la CaM (Coulon V., 2001)(Figure 91). DREAM est un répresseur de la transcription, qui est fixé constitutivement sur les séquences DRE (DREAM Response Element) présentes sur les gènes qu'il cible. Lorsque que la $[Ca^{2+}]_{int}$ augmente, le Ca^{2+} se fixe directement sur les quatre domaines EF-hands de DREAM, qui se détache alors du

promoteur des gènes qu'il réprimait, et permet ainsi la transcription (Naranjo *et al.*, 2012). Ces FT pourraient donc également être impliqués dans la modulation de l'expression de SK3 par le Ca^{2+} suite à la colonisation osseuse.

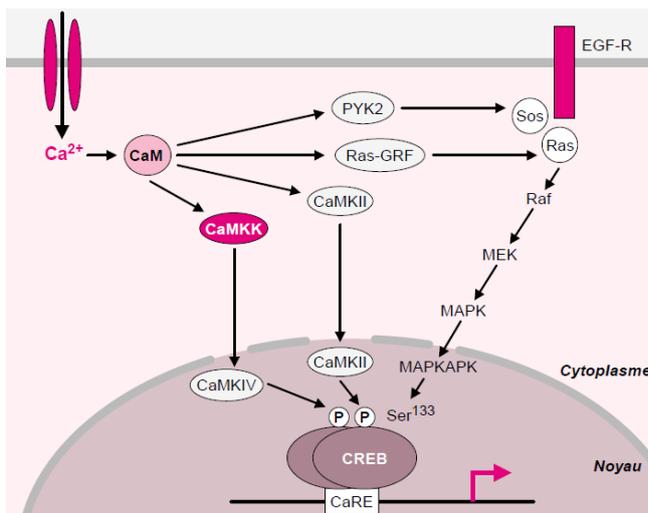


Figure 91. Modulation de la transcription dépendante de CREB par le Ca^{2+} intracellulaire, exemple de la voie EGF-R. (d'après (Coulon V., 2001)). Le Ca^{2+} intracellulaire entre dans la cellule par l'intermédiaire des canaux calciques, puis active la CaMKII et la CaMKIV, qui phosphorylent CREB, le rendant ainsi actif, et permettant la transcription des gènes cibles.

3.2. Partie II. Conséquences de l'activation de la voie Ca^{2+} /CaSR sur la migration cellulaire

Après avoir montré une régulation de l'expression du canal SK3 par l'AMPc et le Ca^{2+} extracellulaire, nous avons choisi d'étudier les effets de l'activation de la voie Ca^{2+} /CaSR sur la migration cellulaire.

3.2.1. Le Ca^{2+} extracellulaire régule la migration dépendante du canal SK3

Le canal SK3 est impliqué dans la migration de plusieurs types de cellules cancéreuses (pour revue, (Girault *et al.*, 2012)), et il a paru essentiel d'étudier l'effet du Ca^{2+} extracellulaire sur la migration dépendante du canal SK3 dans les cellules MDA-MB-435s. Nous avons évalué la migration des cellules MDA-MB-435s en conditions physiologiques ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}} = 1,8 \text{ mM}$) et la comparer à celle obtenue lors d'une élévation de Ca^{2+} extracellulaire et ce, en absence (cellules SK3^-) et en présence de SK3 (cellules SK3^+) (Figure 92).

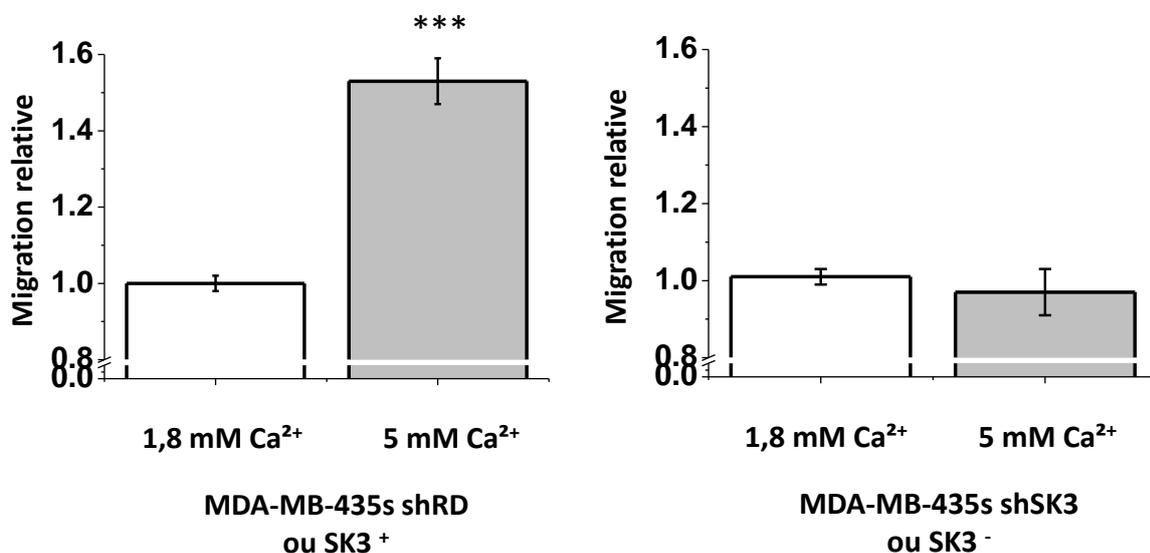


Figure 92. Effets du Ca^{2+} extracellulaire sur la migration des cellules MDA-MB-435s à 24 h, exprimant ou non SK3 (SK3^+ vs SK3^-) (N=3 pour SK3^- et N=6 pour SK3^+ , *** $p < 0,001$ Mann Whitney). La migration cellulaire est relativisée par rapport à la migration en condition contrôle ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}} = 1,8 \text{ mM}$).

Une élévation de Ca^{2+} dans le milieu de culture de 1,8 à 5 mM pendant 24 h augmente de 60 % la migration des cellules SK3^+ alors que nous n'avons aucun effet sur la migration des cellules SK3^- .

3.2.2. Implication du CaSR dans la régulation de la migration activée par l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$

Afin d'étudier le rôle du CaSR dans la migration des cellules MDA-MB-435s, nous avons utilisé un agoniste non spécifique du CaSR, la néomycine. La migration cellulaire a été évaluée après 24 h de traitement avec la néomycine à la concentration de 200 μM (Figure 93).

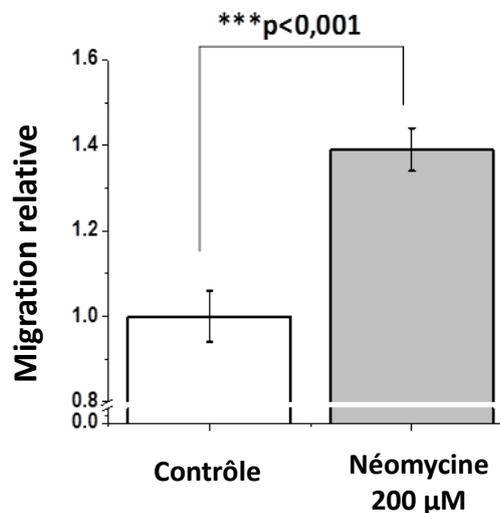


Figure 93. Effets de la néomycine sur la migration des cellules MDA-MB-435s. La migration s'effectue sur 24 h avec \pm 200 μM de néomycine (N=3, ***p<0.001 Mann Whitney).

La néomycine augmente de 40 % la migration des cellules SK3^+ . Pour démontrer que le CaSR est impliqué dans l'augmentation de la migration en réponse à l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext.}}$, le CaSR a été invalidé à l'aide d'ARN interférents. L'invalidation transitoire du CaSR diminue la migration activée par l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ dans ces cellules (Figure 94).

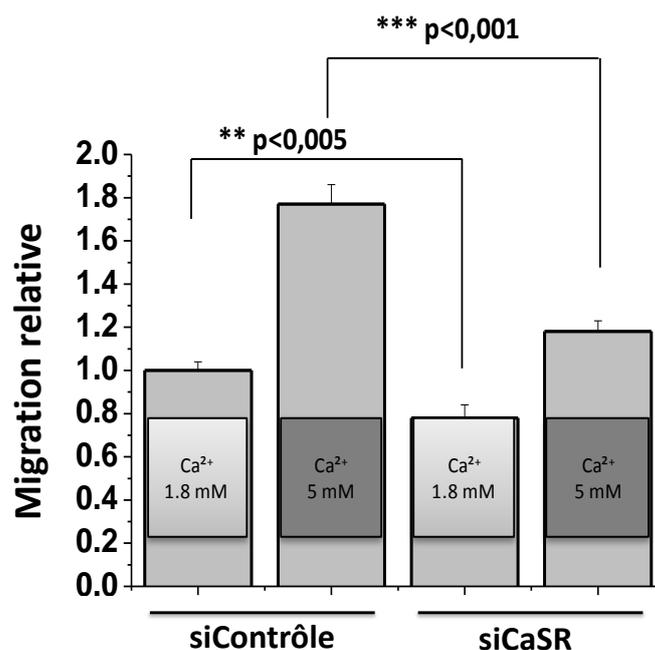


Figure 94. Implication du CaSR dans la migration activée par l'élévation de Ca^{2+} extracellulaire. Les cellules MDA-MB-435s ont été transfectées pendant 72 h avec le siCaSR (150 pmoles/300 000 cellules) et placées dans des inserts de migration pour 24 h d'expérience (N=3, ** $p<0,005$, et *** $p<0,001$, Kruskal-Wallis et post-hoc de Bonferroni).

Il faut noter que la migration cellulaire observée à une $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ physiologique (1,8 mM) en présence du siCaSR est plus faible que celle en présence du siContrôle (Figure 94) ce qui implique que de base, le CaSR module la migration des cellules SK3⁺. Cependant, cet effet est bien plus visible en présence d'une $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ de 5 mM, ce qui indique que le CaSR est plus activé à 5 mM qu'à 1,8 mM de Ca^{2+} extracellulaire. Il reste une faible proportion de la migration activée par le Ca^{2+} extracellulaire qui n'est pas inhibée par le siCaSR, ce qui peut s'expliquer soit i) par le fait que le siCaSR ne détruit pas la totalité des transcrits codant pour le CaSR, soit ii) par l'implication d'autres voies telles que celles mettant en jeu des canaux calciques voltages indépendants (Orai 1 par exemple, (Chantôme *et al.*, 2013)).

Nous avons donc montré que l'élévation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ active uniquement la migration dépendante de SK3 dans les cellules MDA-MB-435s, bien que cette augmentation de Ca^{2+} active des voies dépendantes et indépendantes du CaSR.

3.2.3. Modulation de la migration des cellules MDA-MB-435s par l'AMPc intracellulaire

Nous venons de montrer que la voie $\text{Ca}^{2+}/\text{CaSR}$ favorise la migration des cellules MDA-MB-435s de manière dépendante de SK3. Afin de préciser les mécanismes en jeu, nous avons testé les effets de l'AMPc, qui comme nous l'avons démontré dans la première partie, module l'expression de SK3. Pour cela, nous avons prétraité les cellules pendant 24 h avec la FSK et le CI-1044 de façon à diminuer l'expression de SK3. Puis, la capacité des cellules à migrer a été évaluée. On observe que ce prétraitement diminue la migration cellulaire de 50 % (Figure 95).

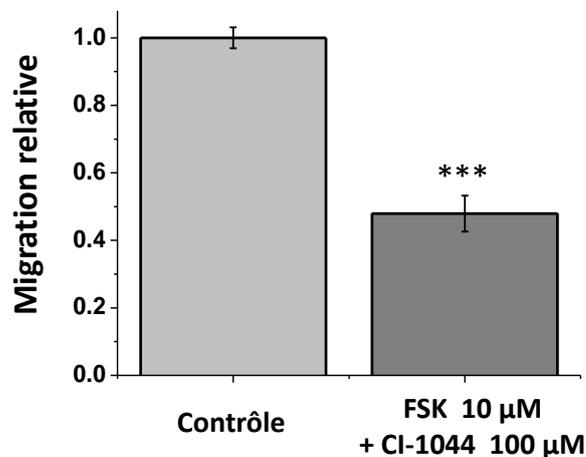


Figure 95. Effets d'un prétraitement avec la FSK et le CI-1044 sur la migration des cellules MDA-MB-435s. Les cellules ont été prétraitées pendant 24 h avec le CI-1044 (100 µM) et la FSK (10 µM), puis placées dans des inserts de migration pour une expérience de 24 h (N=3, Mann Whitney ***p<0.001).

3.2.4. Discussion

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré une modulation transcriptionnelle de SK3 par la voie $\text{Ca}^{2+}/\text{CaSR}$. Cependant, les effets de ces deux médiateurs n'ont jamais été étudiés sur la migration dépendante de ce canal.

Les résultats obtenus dans cette seconde partie mettent en évidence pour la première fois une régulation de la migration dépendante de SK3 des cellules MDA-MB-435s par le Ca^{2+} extracellulaire. Ce messager extracellulaire module donc une propriété majeure du canal SK3 dans les cellules cancéreuses du sein, et cette régulation de la migration cellulaire peut

expliquer la colonisation préférentielle du tissu osseux, en présence de SK3, dans le modèle murin de xénogreffe développé au laboratoire (Chantôme *et al.*, 2013).

Nous avons montré qu'une part importante de l'effet du Ca^{2+} extracellulaire sur la migration cellulaire est médié par le CaSR. En effet, en invalidant ce CaSR, nous montrons une diminution importante de l'augmentation de migration normalement observée en réponse au Ca^{2+} extracellulaire. Le CaSR a été montré comme impliqué dans la migration dépendante du Ca^{2+} extracellulaire d'autres cellules cancéreuses du sein, les cellules MDA-MB-231, pour lesquelles il favorise également l'augmentation de migration induite par l'élévation de Ca^{2+} extracellulaire (Saidak *et al.*, 2009a). Nos résultats sont donc en cohérence avec ceux obtenus par cette équipe, sur une autre lignée épithéliale de cancer du sein. Par ailleurs, ces cellules n'expriment pas le canal SK3. Il serait intéressant néanmoins de vérifier si l'élévation de Ca^{2+} extracellulaire n'a pas induit l'expression de SK3 dans ce modèle cellulaire. Par ailleurs, Le fait que le siCaSR n'inhibe pas totalement la migration induite par le Ca^{2+} extracellulaire dans notre modèle indique qu'il existerait d'autres acteurs de cette migration, tels que les canaux calciques voltages indépendants comme nous l'avons montré récemment (Chantôme *et al.*, 2013).

Ayant démontré une implication du CaSR dans la migration dépendante du Ca^{2+} extracellulaire dans les cellules MDA-MB-435s, nous avons voulu savoir si l'élévation prolongée d'AMPC, dont la concentration intracellulaire est modulée par le CaSR, avait une influence sur la migration des cellules MDA-MB-435s. Nous avons ainsi montré qu'un prétraitement à l'aide de FSK et de CI-1044 diminuait la migration cellulaire des cellules SK3⁺. Ceci indique que la diminution d'expression transcriptionnelle de SK3 observée suite à 48 h de traitement par ces agents éleveurs d'AMPC, entraîne une diminution du nombre de canaux fonctionnels à la membrane, et pas seulement des transcrits ou des protéines totales codant pour SK3. La diminution de migration, dans ces conditions d'exposition longue des cellules à une forte $[\text{AMPC}]_{\text{int}}$ est serait due à la diminution d'expression du canal SK3.

Dans la troisième et dernière partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux effets du Ca^{2+} extracellulaire et de l'AMPC intracellulaire sur l'activité du canal SK3. En effet, ces deux premières parties concernaient principalement les effets sur l'expression de SK3.

3.3. Partie III. Régulation de l'activité du canal SK3 par l'AMPC et conséquences sur l'entrée de Ca²⁺ et la migration dépendantes de SK3

3.3.1. L'élévation de [Ca²⁺]_{ext.} augmente l'amplitude du courant SK3

La mesure de l'amplitude du courant généré par le canal SK3, reflet de l'activité du canal, a été réalisée en patch clamp. Nous avons utilisé la configuration cellule entière et un protocole de rampe balayant les voltages de -70 à +70 mV pendant 2 secondes a été réalisé. Le courant résultant a été mesuré, et permet d'obtenir le type de traces présenté sur la figure 96, en présence d'une [Ca²⁺]_{ext.} de 2 mM dans le PSS. L'application de 5 mM de Ca²⁺ extracellulaire se traduit par une augmentation de l'amplitude à 25 mV du courant sensible à l'apamine, qui est multipliée par 3. La [Ca²⁺]_{ext.} module donc l'amplitude du courant sensible à l'apamine. De plus, cette augmentation d'amplitude s'accompagne d'une hyperpolarisation membranaire, puisque le voltage membranaire (ou V_m) passe de -40 mV à -60 mV. Ceci est une conséquence de l'augmentation d'activité du canal SK3 (Chantôme *et al.*, 2009). L'apamine, un bloqueur spécifique des SKCa a permis de montrer que le courant augmenté par le Ca²⁺ extracellulaire est bien le courant SK3, le seul canal SK_{Ca} fonctionnel exprimé par les cellules MDA-MB-435s (encart Figure 96). Cette augmentation de Ca²⁺ extracellulaire entraîne une augmentation de Ca²⁺ intracellulaire *via* l'activation du CaSR ou d'Orai 1, et celle-ci, à terme active le canal SK3.

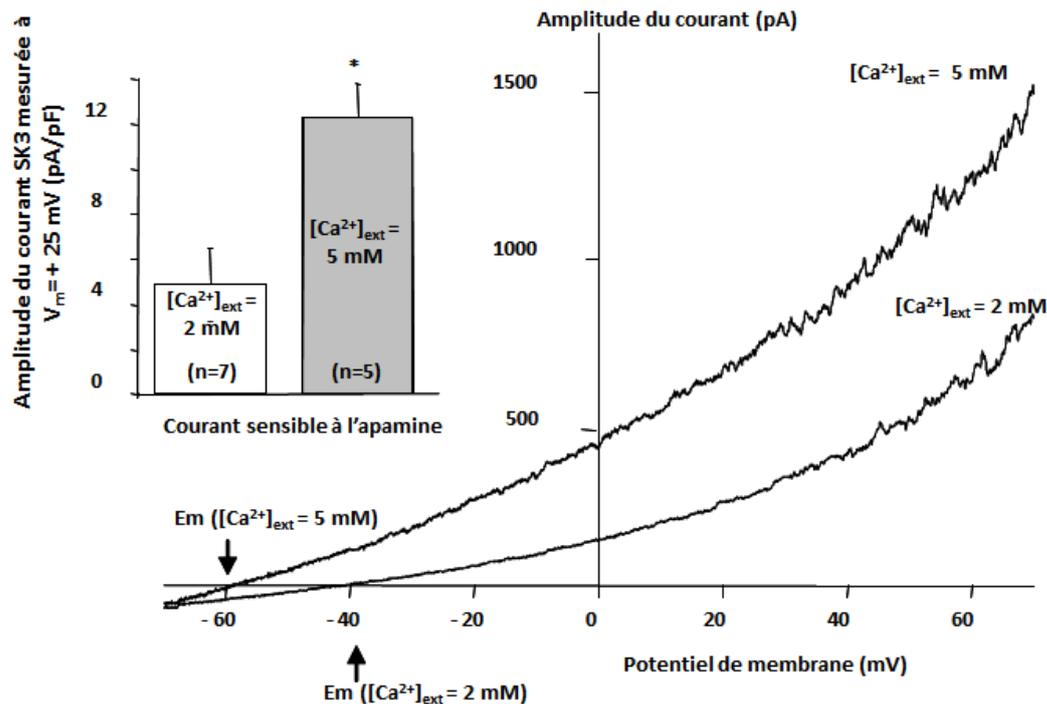


Figure 96. Trace représentative d'une mesure de l'amplitude du courant SK3 en présence de 2 et 5 mM de Ca^{2+} extracellulaire obtenue par un protocole de rampe de potentiel (-70 ; +70 mV, potentiel de maintien : -70 mV) dans les cellules MDA-MB-435s. Encart : Comparaison des moyennes de densités de courant sensible à l'apamine (50 nM) mesurées à $V = +25 \text{ mV}$ (N=5, * $p < 0,05$ Mann Whitney) (Chantôme *et al.*, 2013).

Puisque les effets du Ca^{2+} extracellulaire sur l'expression de SK3 sont médiés par l'AMPC, il a paru intéressant d'étudier les effets de l'AMPC sur le courant SK3.

3.3.2. Les agents éleveurs d'AMPC réduisent l'amplitude du courant SK3

De manière surprenante, peu d'études ont cherché à montrer une régulation de l'activité de SK3 par l'AMPC. Il a été montré que le canal SK2, lui, était régulé par le taux d'AMPC intracellulaire, et que sa phosphorylation par la PKA diminuait son expression à la surface de la membrane plasmique dans les cellules rénales simiennes Cos7 (Ren *et al.*, 2006). Nous avons utilisé les cellules HEK-293-, surexprimant le canal rSK3 (forme exprimée chez le rat) et possédant de manière endogène les récepteurs β -adrénergiques. On observe une diminution rapide du courant SK3 à $V_m = 0 \text{ mV}$, de l'ordre de 50 %, lorsque le CI-1044 et l'ISO (agoniste β_2 -adrénergique) sont présentes dans le PSS (100 μM et 100 nM respectivement). Cet effet est robuste, et a lieu dès les premières minutes d'application de ces deux molécules (Figure 97).

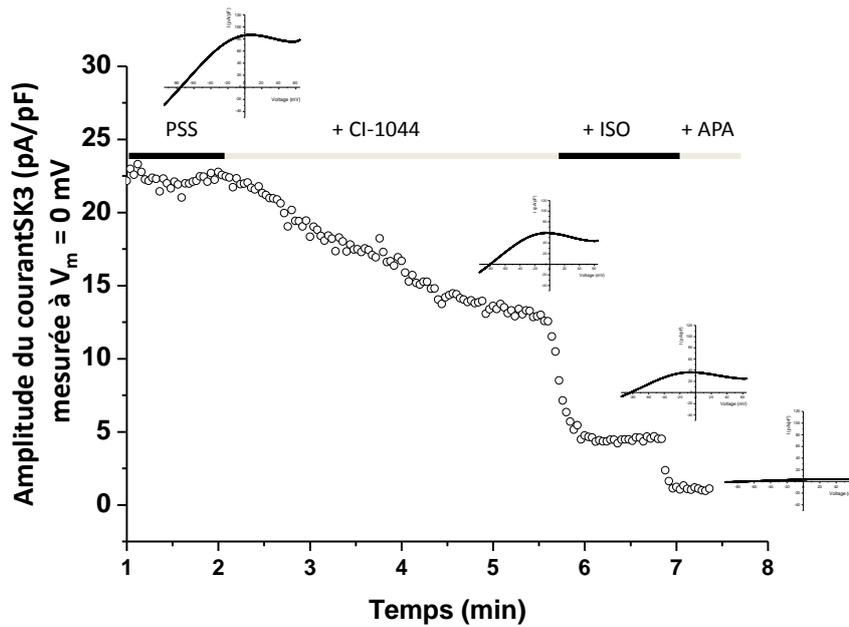


Figure 97. Trace représentative du dérouls cinétique de l'amplitude du courant SK3 mesurée au V_m de 0 mV, suite aux traitements par le CI-1044 et l'ISO. Les quatre encarts représentent les relations I/V enregistrées dans chaque condition à l'état stable. Les molécules utilisées (CI-1044 100 μ M ; ISO 100 nM) sont connues pour augmenter la $[AMPC]_{int}$ dans les cellules HEK293T-rSK3. L'apamine (Apa) a été utilisée à la concentration de 100 nM pour inhiber le courant SK3 (N=5).

Les effets du CI-1044 et de l'ISO sont additifs. Les deux molécules ajoutées en même temps permettent de maintenir une $[AMPC]_{int}$ élevée et stable, qui inhibe quasi-totalement le courant à $V_m = 0$ mV (Figure 98).

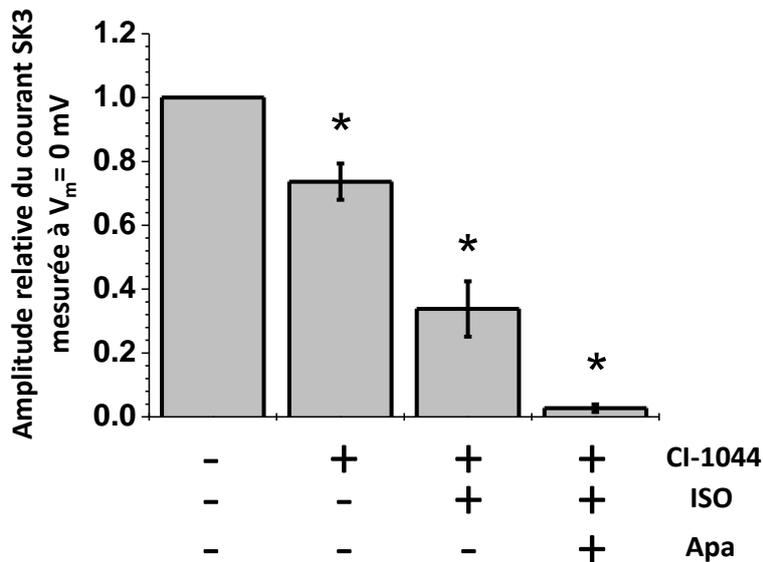


Figure 98. Moyenne des amplitudes relatives du courant SK3 mesurée à $V_m = 0$ mV en présence de CI-1044 (100 μ M), d'ISO (100 nM), puis d'Apa (100 nM), dans les cellules MDA-MB-435s par rapport au contrôle sans molécule (N=4 * $p < 0.05$, Kruskal Wallis, post-hoc de Dunnett's permettant de comparer chaque condition au contrôle sans molécule).

L'ISO entraîne la production endogène d'AMPC en activant les récepteurs β -adrénergiques, qui sont couplés positivement à l'AC. Afin de caractériser les effets de l'ISO sur le courant I_{SK3} dans les cellules HEK293T-rSK3, nous avons réalisé une courbe dose-réponse et déterminé une IC_{50} de $57,91 \pm 8,47$ nM d'ISO, en présence du CI-1044 (Figure 99). La présence du CI-1044 permet de maintenir une $[AMPC]_{int}$ élevée, en inhibant la dégradation de l'AMPC par les PDE4.

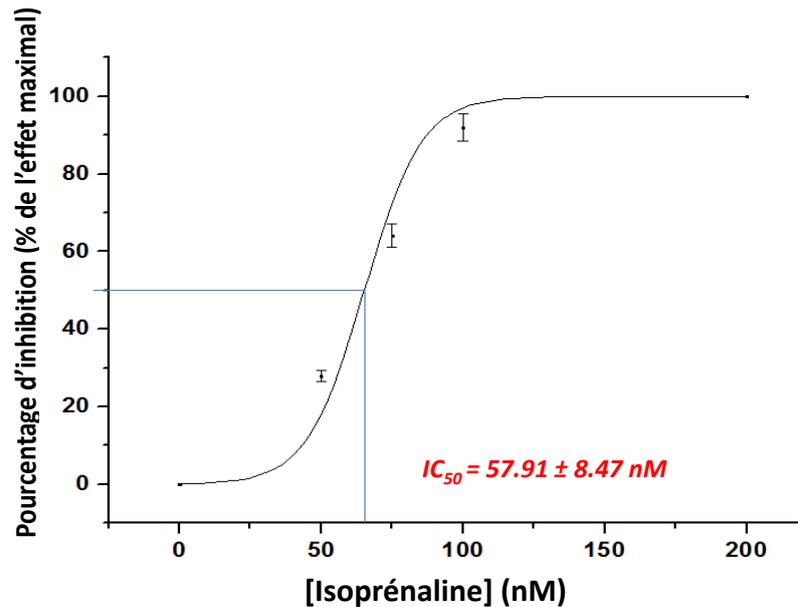


Figure 99. Courbe effet-dose de l'ISO sur le courant SK3 dans les cellules HEK293T-rSK3 en présence de CI-1044 (100 μ M) (N=5).

Nous avons donc montré que le CI-1044 seul, ou associé à l'ISO, diminuait le courant SK3. Une autre façon d'élever la $[AMPC]_{int}$ est d'activer directement l'AC. Nous avons utilisé pour cela la FSK, que nous avons testée sur le courant SK3. Ces expériences ont été réalisées dans un premier temps en présence de CI-1044 dans les cellules HEK293T-rSK3. Les figures 100 et 101 montrent que la FSK (10 μ M) associée au CI-1044 (100 μ M) inhibe totalement le courant SK3, puisque l'apamine n'a pas d'effet supplémentaire (Figure 100). De manière intéressante, la FSK seule inhibe le courant SK3 de 20 % (Figure 101).

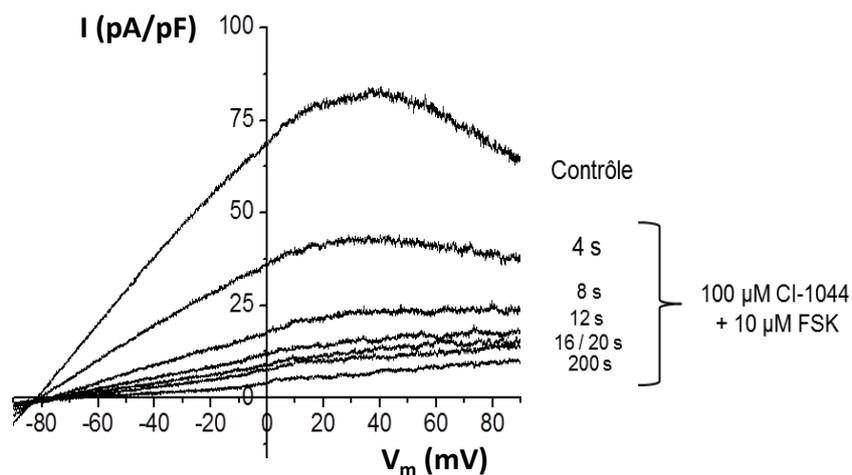


Figure 100. Courbes I/V représentatives des effets de la FSK (10 μ M) et du CI-1044 (100 μ M) sur le courant SK3 dans les cellules HEK293T-rSK3, en fonction du temps (N=6).

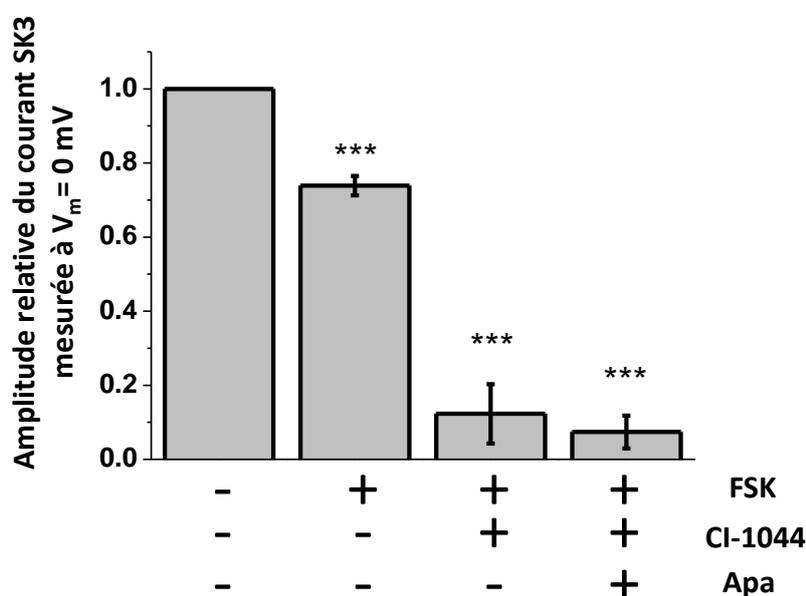


Figure 101. Amplitudes moyennes relatives des courants SK3 mesurés à $V_m = 0$ mV, en réponse à la FSK (10 μ M) seule ou associée au CI-1044 (100 μ M) puis au CI-1044 et l'Apamine (Apa, 100 nM) par rapport au contrôle dans les cellules HEK293T-rSK3 (N=6, *** $p < 0.001$ ANOVA et post-hoc de Dunnett's permettant la comparaison de chaque condition à celle en absence de molécule).

Nous avons donc montré que l'AMPC a donc un effet inhibiteur sur l'activité du canal SK3, en plus de son effet sur l'expression de la protéine SK3.

3.3.3. Effets de l'élévation d'AMPC sur les courants SK2 et SK1

Nous avons voulu tester la spécificité des agents élévateurs de l'AMPC sur le courant SK3. Pour cela nous disposons de lignées HEK293T sur-exprimant rSK2 et hSK1, qui ont été

développées au laboratoire. Afin de comparer les effets de l'AMPC sur les courants SK3, SK2 et SK1, nous avons dans un premier temps utilisé le CI-1044 à la concentration de 100 μM . Puis nous avons ajouté l'ISO à la concentration de 100 nM, et enfin, ajouté l'apamine pour observer les courants résiduels et calculer le pourcentage d'effet de ces molécules sur le courant sensible à l'apamine. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 102, 103 et 104, pour les courants SK3, SK2 et SK1, respectivement.

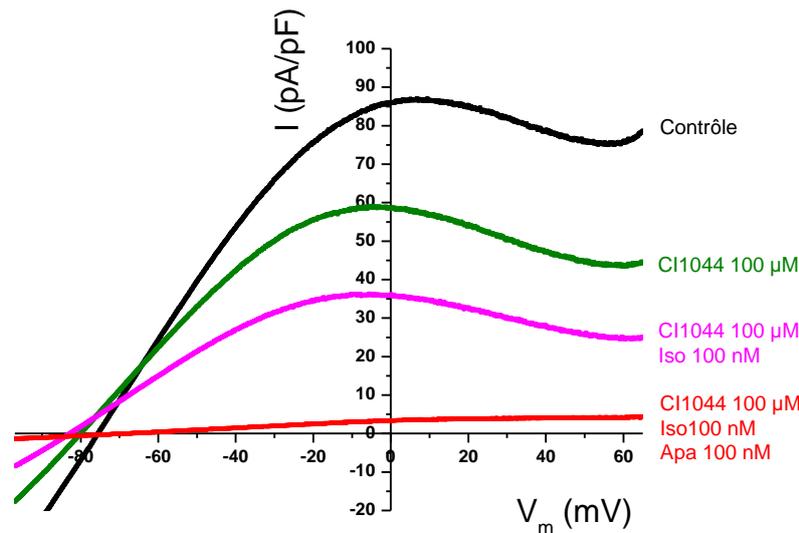


Figure 102. Traces représentative des effets du CI-1044, de l'ISO sur la densité de courant SK3 en fonction du potentiel membranaire (V_m) imposé. L'apamine (Apa) est utilisée afin de bloquer totalement le courant SK3, ce qui est visible à $V_m = 0$ mV. Le courant résiduel n'est pas sensible à l'apamine, et son amplitude est souvent proche de 0 pA/pF.

On observe une diminution du courant SK3 mesuré à $V_m = 0$ mV de 25 % avec le CI-1044 appliqué seul. L'ajout de l'ISO à ce CI-1044, entraîne une diminution de l'amplitude du courant SK3 de 50 %. Enfin, l'apamine couplée au CI-1044 et à l'ISO entraîne une inhibition totale du courant SK3 mesuré à $V_m = 0$ mV (Figure 102).

Le même type de protocoles de rampes de voltages a été utilisé pour étudier les effets du CI-1044 et de l'ISO sur les courants hSK1 et rSK2 dans la lignée HEK 293T, afin de comparer ces effets à ceux observés sur le courant SK3.

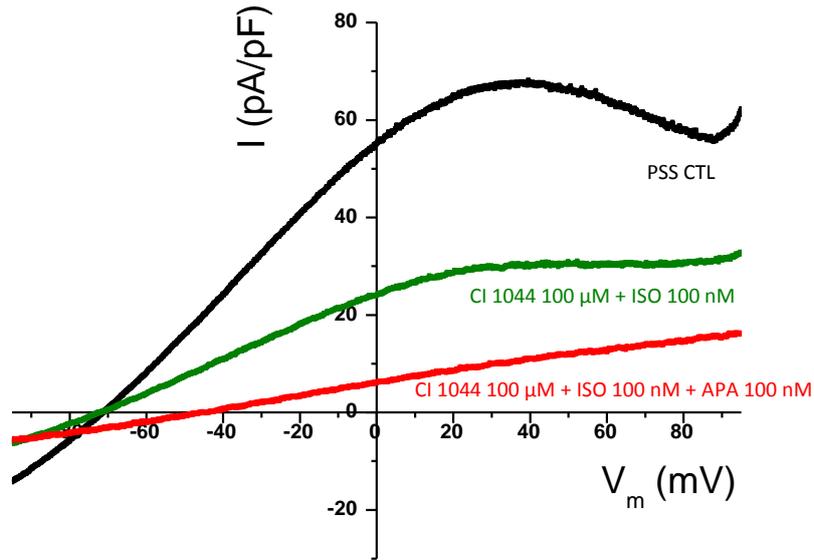


Figure 103. Trace représentative des effets du CI-1044 et de l'ISO sur le courant hSK1 dans les cellules HEK 293. (N=3). L'ajout d'apamine (Apa) entraîne permet de montrer que l'ISO et le CI-1044 réduisent la quasi-totalité du courant SK1.

Le courant SK1 est également diminué par le CI-1044 et l'ISO de la même manière que le courant SK3 (Figure 103). En effet, l'ajout simultané de CI-1044 et d'ISO diminue de 50 % le courant mesuré à $V_m = 0$ mV comme observé pour le courant SK3.

Le courant SK2 est lui aussi diminué par l'ISO et le CI-1044 dans les cellules HEK-293-rSK2. La diminution du courant à $V_m = 0$ mV est également de l'ordre de 50 % (Figure 104). Il faut noter que sur les 6 cellules pour lesquelles nous avons enregistré un courant SK2, on observe une variabilité des effets du CI-1044 et de l'ISO, plus importante que pour les cellules HEK293T-rSK3 et HEK293T-hSK1 (Figure 105).

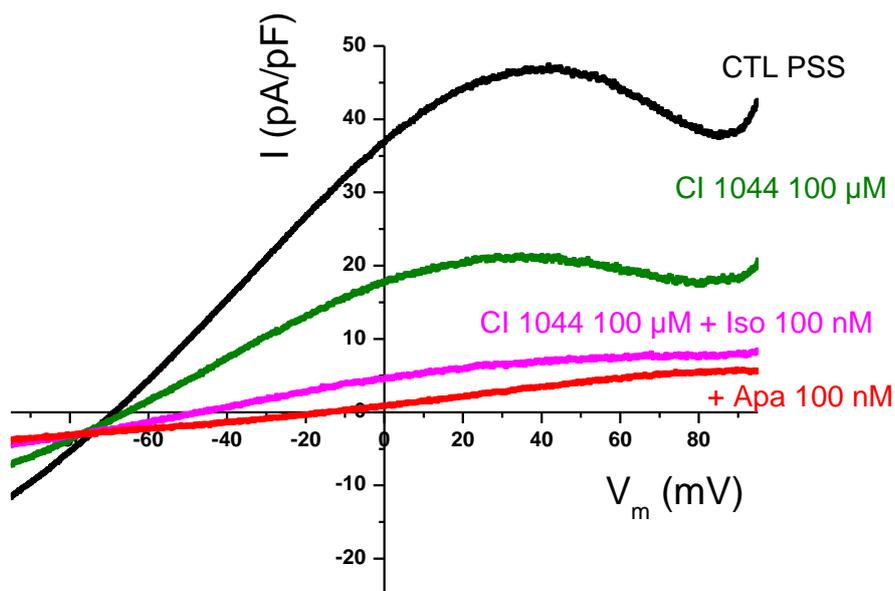


Figure 104. Trace obtenue sur une cellule HEK293T-rSK2 montrant les effets du CI-1044 et de l'ISO sur le courant SK2 mesuré en fonction du voltage membranaire imposé (N=6). L'apamine (Apa) réduit totalement le courant SK2 mesuré à $V_m = 0$ mV dans cette cellule.

Les résultats obtenus ici montrent que le CI-1044 et l'ISO diminuent l'amplitude des courants SK1, SK2 et SK3. L'effet n'est donc pas spécifique du courant SK3.

Afin de comparer quantitativement l'effet de ces molécules sur les courants SK1, SK2 et SK3, le pourcentage d'inhibition du courant sensible à l'apamine par le CI-1044 et l'ISO a été calculé pour chaque courant. Les résultats sont présentés sur la figure 105. Cette inhibition est située aux alentours de 60 % pour chaque courant, et la différence n'est pas significative. Ceci indique que l'augmentation d'AMPC intracellulaire réduit ces courants avec la même efficacité, quelle que soit la sous-famille de SK_{Ca}.

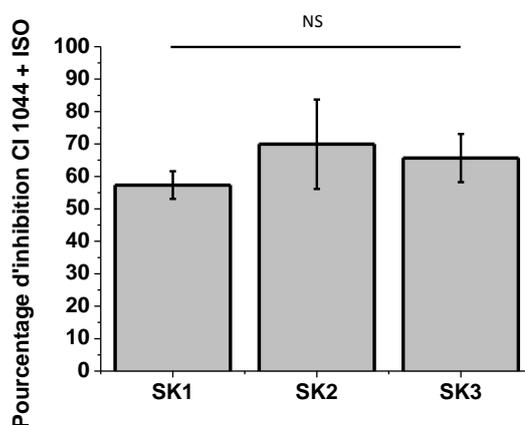


Figure 105. Pourcentages d'inhibition des courants sensibles à l'apamine par le CI-1044 (100 μ M) associé à l'ISO (100 nM) (N=3, $p=0.5671$ ANOVA et test post-hoc de comparaison multiple de Neuman-Keuls ; NS: non significatif).

3.3.4. Les agents éleveurs d'AMPC réduisent la migration dépendante du canal SK3

Dans ce chapitre, il est question d'étudier les effets de l'AMPC sur l'activité du canal SK3. Contrairement aux expériences de migration cellulaire précédentes, nous n'avons pas prétraité les cellules pendant 24 h, mais le CI-1044 et la FSK ont été appliqués directement pendant l'expérience de migration. La figure 106 présente les résultats obtenus sur la migration cellulaire en présence de FSK et de CI-1044. On observe que la FSK et le CI-1044 réduisent de 81,9 % la migration. Cet effet est plus important que l'effet observé avec prétraitement pendant 24 h avec le CI-1044 et la FSK, ce qui suggère qu'un mécanisme de compensation suite à la diminution de l'expression du canal SK3 s'est mis en place.

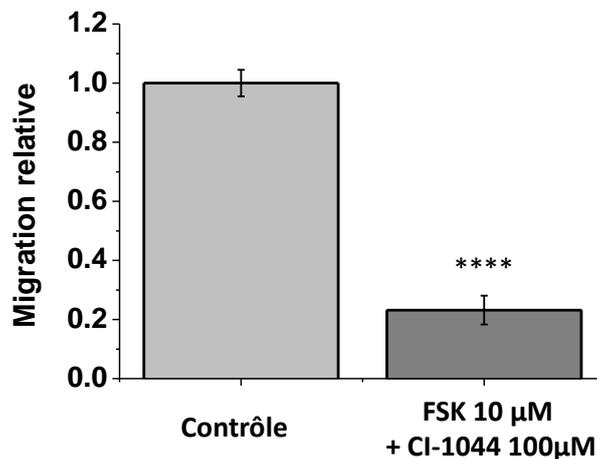


Figure 106. Effets de la FSK et du CI-1044 sur la migration des cellules MDA-MB-435s. Les cellules ont été traitées avec le CI-1044 (100 μ M) et la FSK (10 μ M) pendant toute la durée de l'expérience (24 h) (N=3, Mann Whitney, ****p<0.0001).

Nous avons voulu ensuite savoir si l'invalidation stable de la protéine SK3 (cellules SK3⁻) entraînait une suppression de cet effet, ou du moins une réduction de celui-ci. Pour cela nous avons comparé l'inhibition de la migration des cellules SK3⁺ par rapport à celle des cellules SK3⁻. Or, les cellules SK3⁻ migrent beaucoup moins en condition contrôle, puisque l'absence de SK3 entraîne une diminution de la migration de 40 % (Chantôme *et al.*, 2013). Nous avons donc tenu compte de ce pourcentage pour déterminer l'effet du CI-1044 et de la FSK sur la migration des cellules SK3⁻. Les résultats sont présentés dans la figure 107, et montrent que l'AMPC diminue la migration des cellules SK3⁻ de 39,6 % contre les 81,9 % d'inhibition dans les cellules SK3⁺. Nous pouvons donc déduire que l'effet inhibiteur de l'AMPC sur la migration dépendante de SK3 est de 42,3 % (81,9 – 39,6 = 42,3 %). Il existe

donc d'autres mécanismes responsables de l'effet de l'AMPC sur la migration des cellules MDA-MB-435s, qu'il serait intéressant d'étudier, en ciblant d'autres acteurs de la migration cellulaire tels que le canal K^+ Eag1, ou encore les calpaïnes qui sont sensibles au Ca^{2+} (Chantôme *et al.*, 2009).

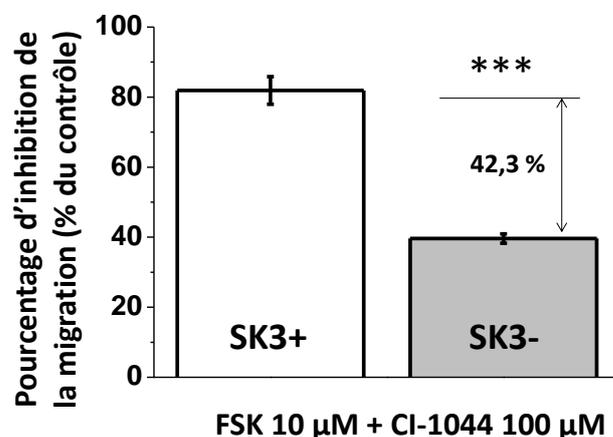


Figure 107. Comparaison des effets du CI-1044 (100 μ M) et de la FSK (10 μ M) sur la migration des cellules SK3⁺ et des cellules SK3⁻. Les cellules ont été traitées pendant toute la durée de la migration (24 h). (N=3, Mann Whitney, ***P= 0,002). La part dépendante de SK3 dans l'inhibition de la migration par la FSK et le CI-1044 (42,3 %) est obtenue en soustrayant l'inhibition obtenue dans les cellules SK3⁻ (39,6 %) à celle obtenue dans les cellules SK3⁺ (81,9 %).

Nous avons montré récemment, que le canal SK3 favorisait la migration cellulaire dans les cellules MDA-MB-435s, en s'associant avec le canal calcique Orai 1, au sein des radeaux lipidiques. Ainsi, en hyperpolarisant la membrane plasmique, SK3 favorise l'activité d'Orai 1, à savoir une entrée de Ca^{2+} , qui en retour active le canal SK3 (Chantôme *et al.*, 2013). Nous avons voulu savoir si l'entrée calcique constitutive (indépendante de STIM1) *via* Orai 1, et dépendante de SK3, était modulée par l'élévation d'AMPC.

3.3.5. Les agents éleveurs d'AMPC réduisent l'entrée calcique dépendante de SK3

Afin d'étudier l'entrée calcique constitutive dans les cellules MDA-MB-435s, nous avons utilisé la sonde fluorimétrique Fura-2. Le rapport de fluorescence $F_{340/380}$ étant proportionnel à la $[Ca^{2+}]_{int}$ cytosolique libre, nous avons pu comparer l'entrée calcique en réponse à l'augmentation de la $[AMPC]_{int}$ induite par le CI-1044 et la FSK, par rapport à celle obtenue sans ces deux molécules. Pour cela, nous avons réalisé un prétraitement de 30 min avec ces deux molécules. La figure 108.A présente les traces moyennes obtenues en absence

ou en présence de ces molécules. Le traitement par la FSK et le CI-1044 entraîne une diminution de 51,4 % de l'entrée calcique constitutive dans les cellules MDA-MB-435s (Figure 108.B).

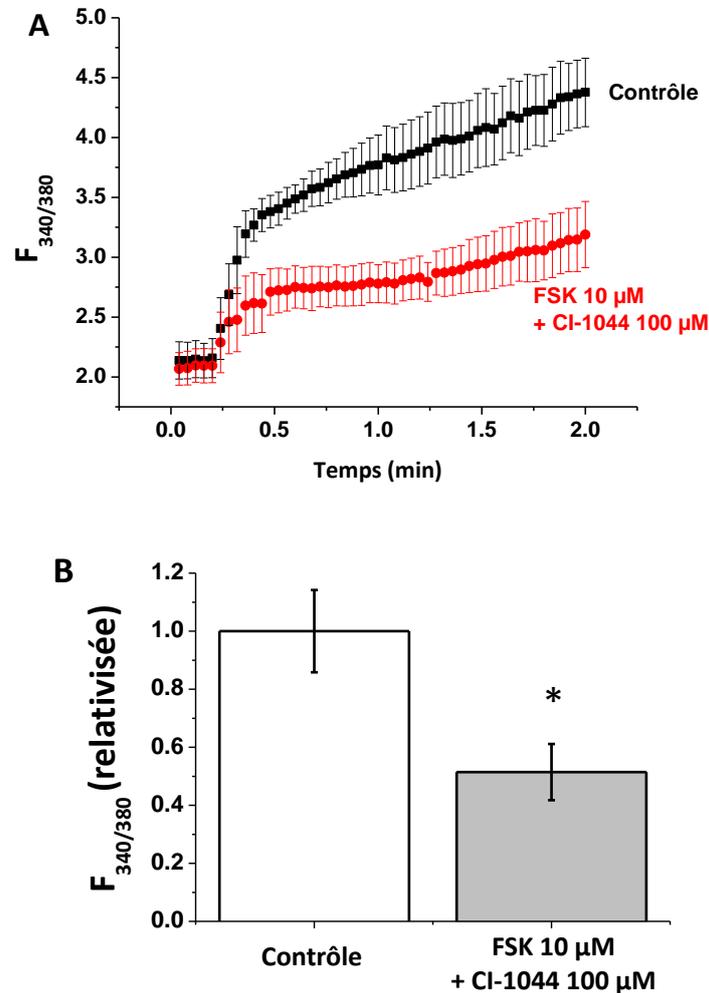


Figure 108. Effets du CI-1044 et de la FSK sur l'entrée de Ca^{2+} constitutive mesurée dans les cellules MDA-MB-435s. A. Traces moyennes des rapports de fluorescences du Fura-2 en conditions contrôle (noir) et en présence de CI-1044 et de FSK (rouge). B. Fluorescence moyenne du Fura-2, relativisée par rapport au contrôle, en présence ou non de FSK et de CI-1044 (N=5 *p=0,022 Mann Whitney). Les deux molécules ont été ajoutées dans le milieu extracellulaire 30 min avant le début de l'expérience.

Suite à ces observations, nous avons voulu savoir quelle était la part dépendante du canal SK3 dans cette diminution d'entrée calcique induite par la FSK et le CI-1044. Pour cela, nous avons utilisé à nouveau les cellules SK3⁻ et nous avons comparé l'inhibition, par la FSK et le CI-1044, de l'entrée calcique constitutive de cette lignée à celle obtenue dans la lignée SK3⁺. De la même manière que pour la migration, nous avons tenu compte de la réduction de l'entrée calcique, de base, dans les cellules ne possédant pas SK3, qui est de 60 % (Chantôme *et al.*, 2013).

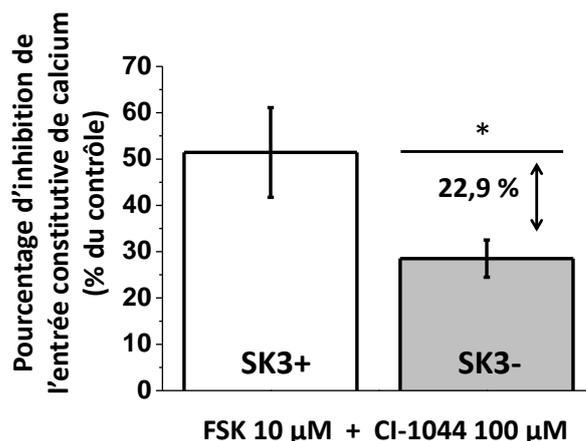


Figure 109. Comparaison des effets de la FSK et du CI-1044 sur le pourcentage d'inhibition de l'entrée constitutive de Ca^{2+} dans les cellules $SK3^+$ et les cellules $SK3^-$ (N=4, *p=0,0186 Mann Whitney).

Le traitement par la FSK et le CI-1044 entraîne une inhibition de 28,5 % de l'entrée constitutive de Ca^{2+} des cellules $SK3^-$. On estime ainsi que la FSK et le CI-1044 ont inhibé 22,9 % de l'entrée constitutive de Ca^{2+} dépendante de SK3 ($51,4 - 28,5 = 22,9$ %) (Figure 109). Ainsi, la FSK et le CI-1044 inhibent probablement d'autres voies d'entrée calcique, qui sont indépendantes de SK3. Il serait intéressant d'étudier ces voies, qui pourraient impliquer certains canaux calciques tels que les TRP, les ATPases calciques (PMCA ou SERCA).

3.3.6. Effets des agents élevant la $[AMPc]_{int}$ sur la localisation membranaire de Orai 1 et SK3

Nous avons ensuite cherché à savoir si les effets inhibiteurs de la FSK et du CI-1044 sur SK3 étaient liés à une diminution de l'expression au niveau de la membrane plasmique de SK3. Pour cela, nous disposons au laboratoire de la protéinase K, une enzyme qui, lorsqu'elle est incubée en présence de cellules vivantes permet de cliver les protéines membranaires, exclusivement, dont SK3. Les protéines membranaires ainsi clivées sont étudiées en western blot, et les produits du clivage sont repérés par l'anticorps ciblant SK3. Ainsi, il est possible de quantifier le nombre de canaux SK3 adressés à la membrane, par rapport aux protéines totales, et d'observer un éventuel effet de l'AMPc sur l'expression membranaire de SK3. La figure 110 montre le résultat de cette expérience réalisée par Aurélie Chantôme.

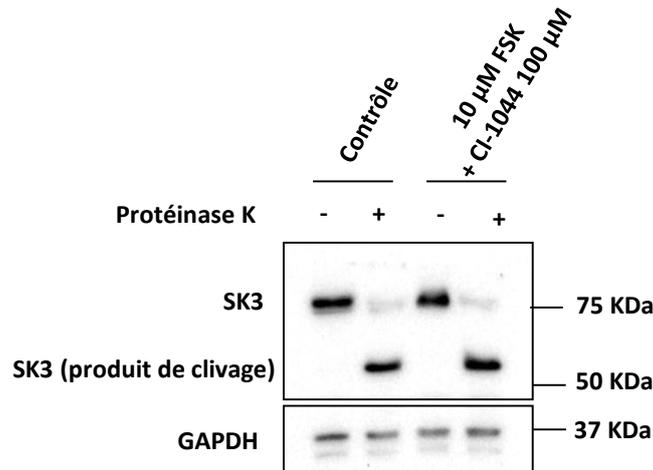


Figure 110. Western blot montrant l'expression membranaire des protéines SK3 suite au traitement de 24 h avec la FSK (10 μM) et le CI-1044 (100 μM) dans les cellules MDA-MB-435s. Les cellules ont été incubées avec la protéinase K pendant 30 min. La GAPDH constitue un contrôle de dépôt ainsi qu'un contrôle de l'effet spécifique de la protéinase K sur les protéines membranaires.

Le traitement avec ces deux molécules élevant la $[AMPC]_{int}$ ne modifie pas l'expression membranaire de SK3. En effet, que ce soit avec et sans FSK associée au CI-1044, la quasi-totalité des protéines SK3 sont situées dans la membrane plasmique. La FSK et le CI-1044 ne modifient pas l'expression à la membrane plasmique de SK3, contrairement à ce qui a été observé par Ren et coll. sur l'expression membranaire de SK2 (Ren *et al.*, 2006).

Nous avons récemment montré que le canal SK3 est associé au canal calcique Orai 1 au sein des radeaux lipidiques, dans les cellules MDA-MB-435s (Chantôme et al 2013). L'inhibition de SK3 par l'Ohmline (un alkyl-lipide) entraîne une délocalisation de ces protéines, hors des radeaux lipidiques ainsi qu'une perte de fonction biologique de SK3. Par ailleurs, dans les cellules SK3⁻, Orai 1 n'est plus localisé dans les radeaux (Chantôme *et al.*, 2013). Nous émettons l'hypothèse que la FSK et le CI-1044 puissent également réduire la migration et l'entrée constitutive de Ca^{2+} dépendantes de SK3 en entraînant sa sortie et/ou celle d'Orai 1 hors des radeaux lipidiques. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié la localisation membranaire d'Orai 1 et de SK3, en présence de FSK et de CI-1044. La technique utilisée est le fractionnement membranaire sur gradient de saccharose, et permet de différencier 8 fractions membranaires. Les fractions 8 et 7 sont les fractions représentatives des radeaux lipidiques qui nous intéressent ici.

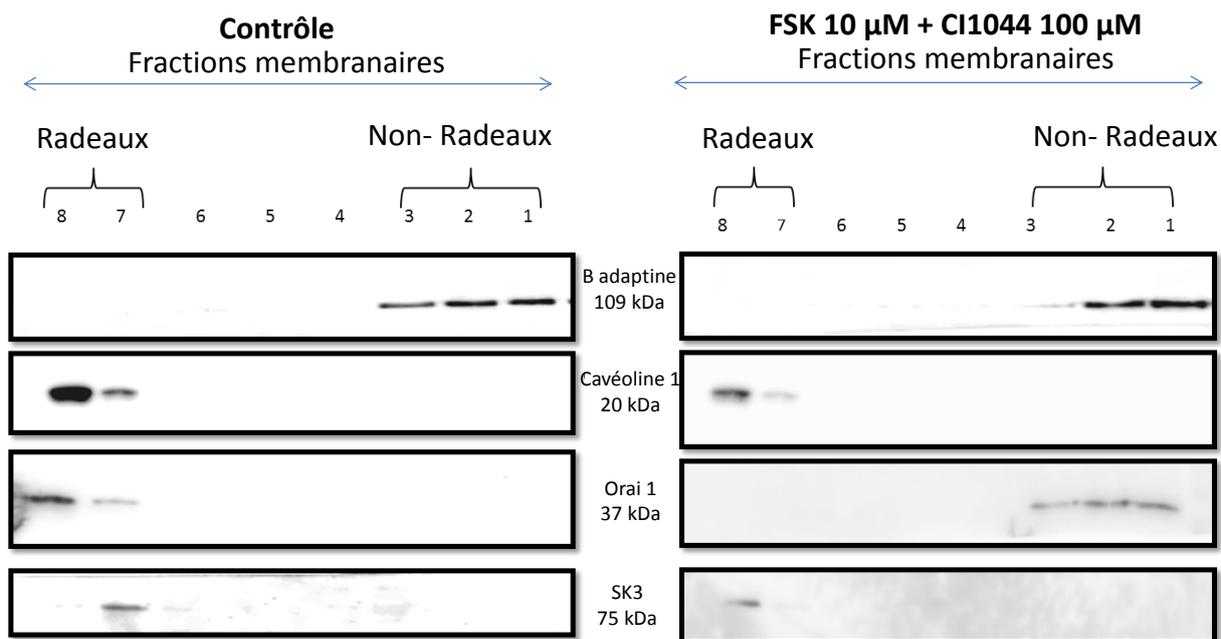


Figure 111. Comparaison de la localisation membranaire des canaux Orai 1 et SK3 dans les cellules MDA-MB-435s en présence (à droite) ou non (à gauche) de FSK et de CI-1044, pendant 30 min.

La FSK et le CI-1044 entraînent une sortie d'Orai 1 hors des radeaux lipidiques, contrairement au canal SK3 qui, lui, reste dans ces radeaux (Figure 111). Ces résultats suggèrent que la délocalisation d'Orai 1 induite par l'élévation d'AMPc intracellulaire, entraîne une réduction de l'activité du complexe Orai 1- SK3, et donc une diminution de la migration et de l'entrée constitutive de Ca^{2+} dépendantes de SK3.

3.3.7. Discussion

Dans cette dernière partie de ce travail de thèse, nous avons montré qu'il existe un lien entre l'augmentation de Ca^{2+} extracellulaire et l'activité du canal SK3. En effet, l'augmentation de Ca^{2+} extracellulaire augmente l'amplitude du courant SK3 et entraîne une hyperpolarisation de la membrane plasmique. Il existerait donc une boucle de rétrocontrôle positif, puisque cette hyperpolarisation membranaire, elle-même, induit une entrée de calcium, favorisant en retour l'activité du canal SK3. Le microenvironnement osseux, riche en Ca^{2+} constitue donc un environnement privilégié à la migration dépendante de SK3 des cellules cancéreuses du sein, et favoriserait donc lui-même sa colonisation par ces cellules, qui plus est, dans le contexte de métastases ostéolytiques.

Il serait intéressant d'étudier le rôle du CaSR dans la détection de cette augmentation de $[Ca^{2+}]_{ext}$, par analogie avec le rôle que nous avons démontré de ce CaSR dans la régulation de l'expression de SK3 et de la migration dépendante de SK3. Pour démontrer une telle régulation, nous pourrions étudier les caractéristiques électrophysiologiques du courant SK3 dans des cellules MDA-MB-435s invalidées transitoirement pour le CaSR, ou étudier les effets d'un agoniste ou d'un antagoniste du CaSR sur le courant SK3 dans ces cellules. Nos résultats préliminaires présentés dans la figure 112 laissent penser que la néomycine, un agoniste du CaSR active le courant global mesuré dans les cellules MDA-MB-435s. Il faudrait répéter l'expérience ainsi qu'utiliser l'apamine pour montrer que le courant activé par le CaSR est bien le courant SK3. Il faut noter que le CaSR est capable d'activer certains canaux ioniques puisqu'il a été montré comme un régulateur de l'activité du TRPV5 dans les cellules HEK293, dont il augmente l'activité, un effet médié par la PKC (Topala *et al.*, 2009).

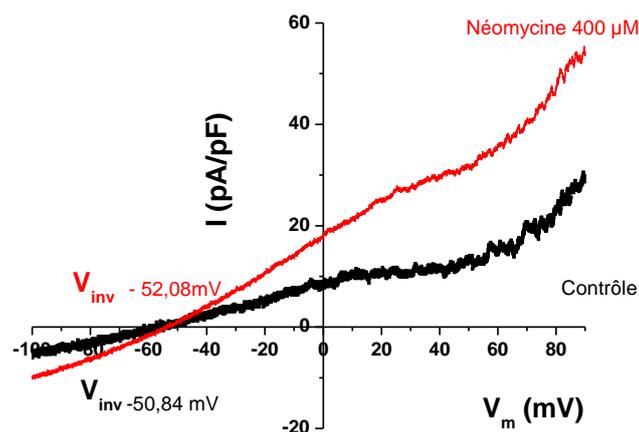


Figure 112. Effet de la néomycine sur le courant SK3 mesuré dans les cellules MDA-MB-435s à l'aide d'un protocole de rampe balayant les voltages de -100 à +100 mV (N=1). L'activation du CaSR semble augmenter l'amplitude des courants globaux dans cette cellule.

De manière intéressante, l'élévation pharmacologique (FSK et CI-1044) d'AMPC, dont la concentration intracellulaire peut être modulée par le CaSR dans les cellules d'intérêt, a la capacité de réduire le courant SK3. Tous ces résultats mènent à penser que le CaSR, en plus de moduler l'expression du canal SK3, aurait la capacité de moduler son activité et ce *via* la modulation de la $[AMPC]_{int}$. Or, cette concentration est contrôlée par une balance entre l'activité de certaines protéines qui soit produisent (ACs) soit dé-cyclisent l'AMPC (PDEs). Il en existe plusieurs types, et les effets différentiels observés pour les différentes molécules utilisées élevant la $[AMPC]_{int}$ peuvent sans doute être expliqués par l'implication de différentes isoformes de ces ACs et PDEs. En effet, dans les cellules HEK, on observe un effet

plus fort de la FSK associée au CI-1044 que celui de l'ISO associée au CI-1044. Or, il a été montré une implication différentielle des PDE présentes dans les cellules HEK en fonction du taux d'AMPC intracellulaire (Matthiesen *et al.*, 2011). Les PDE3 et 10 seraient impliquées dans la dégradation de l'AMPC en présence d'un faible taux d'AMPC (ISO 100 nM), alors que la PDE4 serait impliquée uniquement en présence d'un fort taux d'AMPC (FSK 10 μ M). Ceci pourrait expliquer l'effet massif de l'inhibition du courant SK3 par la FSK associée au CI-1044, qui est un inhibiteur des PDE4.

Concernant l'effet de l'AMPC sur les canaux K^+ , de nombreuses études réalisées dans les cellules endothéliales et dans celles du muscle lisse vasculaire démontrent un effet de l'AMPC, ou de ses effecteurs (PKA, Epac, etc...) sur l'activité des canaux potassiques tels que le K_{ATP} (Kleppisch *et al.*, 1995) ou les canaux BK_{Ca} (Barman *et al.*, 2003; Perry *et al.*, 2009; Ster *et al.*, 2007). Ces canaux K^+ , contrairement à SK3, voient leur probabilité d'ouverture augmentée en présence de 10 μ M d'AMPC, un effet qui est bloqué par la présence d'un inhibiteur de la PKA : le Rp-cAMP (Ledoux *et al.*, 2006; Wellman *et al.*, 2001). Le canal IK_{Ca} est également régulé par l'AMPC, et contrairement à SK3, il est soit activé, soit inhibé par l'AMPC et ces régulations impliquent la PKA ((Pellegrino *et al.*, 1998); (Neylon *et al.*, 2004) respectivement). Toutes ces études, ainsi que les résultats obtenus ici, nous mènent à penser que l'AMPC pourrait réguler les canaux KCa *via* une phosphorylation directe des canaux, probablement par la PKA.

Notre étude démontre pour la première fois un effet de l'AMPC sur les courants SK1, SK2 et SK3. Les mécanismes expliquant la diminution d'activité des canaux SK_{Ca} , et en particulier celle du canal SK3, ne sont pas démontrés ici. Cependant, il existe plusieurs hypothèses, et il pourrait s'agir d'une phosphorylation par la PKA, la PKG ou une interaction directe entre l'AMPC et les canaux SK_{Ca} . Il n'existe pas de domaine d'interaction directe avec l'AMPC sur les protéines SK_{Ca} tel que c'est le cas sur les HCN et les CNG (Hofmann *et al.*, 2005). Le canal SK3 ne possède pas non plus de séquences en acides aminés phosphorylables par la PKG, donc l'effet de cette kinase est à exclure ici (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/). L'hypothèse la plus probable concerne donc la phosphorylation du canal par la PKA puisque les domaines C- et N-term de SK3 sont des substrats pour la PKA. Le fait que l'AMPC régule de la même manière les trois canaux SK_{Ca} étudiés ici, laisse penser qu'une sérine ou thréonine commune puisse être le site

phosphorylable par la PKA (la sérine 285 (rSK3) et la thréonine 581 (rSK3) d'après www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/). Ces deux sites communs sont différents de ceux décrits par l'étude de Ren et al, sur SK2, qui montre une diminution de l'expression du canal SK2 à la surface de la membrane plasmique, due à une internalisation suite à la phosphorylation par la PKA (Ren *et al.*, 2006). De plus, la régulation de l'activité de SK3 ne semble pas impliquer une internalisation de ce canal comme c'est le cas pour SK2, puisque nous avons montré qu'il reste adressé à la membrane, au sein des radeaux lipidiques, en présence de FSK et de CI-1044. On peut donc supposer que la phosphorylation par la PKA puisse soit induire une diminution du nombre de canaux fonctionnels au niveau de la membrane plasmique, soit une diminution de la probabilité d'ouverture de ces canaux ou de leur conductance unitaire, par changement conformationnel.

Afin d'identifier le site de phosphorylation qui pourrait être impliqué dans cet effet, les séquences en acides aminés des trois protéines hSK1, rSK2 et rSK3 ont été alignées. Il n'existe qu'une sérine et une thréonine phosphorylables par la PKA (site PKA : « RxS/Tx » ou « RxxS/Tx » ou x est un acide aminé aléatoire) présentes sur les trois protéines, au niveau du même domaine protéique (Figure 113). Il serait donc intéressant de muter l'un de ces deux sites phosphorylables par la PKA sur le plasmide SK3, et transduire les cellules HEK 293 avec ce plasmide. En effet, si le courant observé sur ces cellules possédant ce canal SK3 muté n'est plus inhibé par l'élévation d'AMPc intracellulaire, alors le site de régulation de l'activité des SK_{Ca} par l'AMPc aura été identifié.

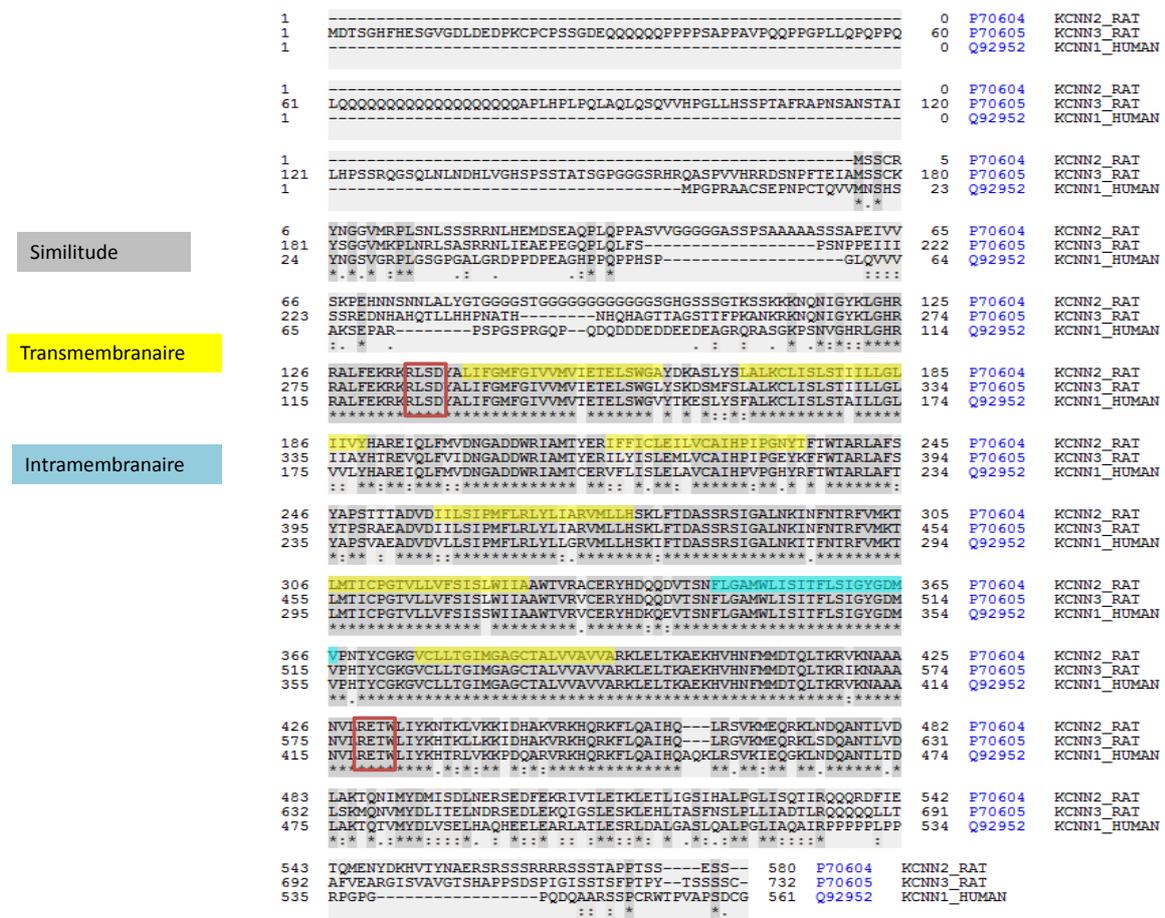


Figure 113. Alignement des séquences protéiques de rSK2, rSK3 et hSK1. Les zones en commun sont grisées, tandis que les zones communes intramembranaires (domaine pore entre le segment S5 et S6 des canaux) sont surlignées en bleu et les zones communes transmembranaires en jaune. La sérine 285 (rSK3) et la thréonine 581 (rSK3) sont les deux sites phosphorylables par la PKA en commun, elles sont entourées en rouge (Modifié d'après www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/).

Concernant les effets de l'AMPC sur la migration dans les cellules MDA-MB-435s, nous avons démontré pour la première fois un effet de l'AMPC sur la migration non orientée de ces cellules cancéreuses. Le type de migration semble être un facteur important car, contrairement à notre cas, l'équipe de O'Connor et coll. a montré que l'activation des PDE4 par les intégrines $\alpha_6\beta_4$ favorisait la migration chimiotactique de ces mêmes cellules (vers l'acide lysophosphatidique ou LPA) (O'Connor *et al.*, 1998), et a montré également un rôle de la PKA dans ce phénomène (O'Connor *et al.*, 2001). Dans d'autres cellules cancéreuses du sein, les MDA-MB-231, l'élévation du taux intracellulaire d'AMPC inhibe la migration induite par la leptine, alors qu'elle active la migration chimiotactique vers le LPA (Paulucci-Holthausen *et al.*, 2009; Spina *et al.*, 2012). De manière intéressante, les cellules de sein MCF 10A, qui sont non cancéreuses, voient leur migration augmentée par l'AMPC, en présence de laminine-5 sur les inserts utilisés (Plopper *et al.*, 2000). Ces résultats montrent que l'AMPC

module la migration cellulaire par d'autres voies indépendantes de SK3, et que la régulation de la migration cellulaire par l'AMPC est très variable d'un modèle cellulaire à l'autre, et d'une condition à l'autre (chimiotactisme ou non). Une explication de cette diversité peut résider dans la localisation des acteurs de la voie AMPC, au sein des compartiments cytoplasmiques. La régulation spatio-temporelle ou la compartimentation de l'activité de la PKA, et de celle des PDEs dans les cellules MDA-MB-435s peuvent ainsi permettre d'obtenir des [AMPC] locales plus ou moins élevées qui modulent alors différents acteurs de la migration cellulaire, tels que Rac et RhoA (O'Connor *et al.*, 2001). Une étude de modélisation mathématique a montré récemment qu'il pourrait s'agir non pas d'une compartimentation de l'AMPC du fait de la localisation des acteurs de la voie AMPC en « clusters » ancrés à la membrane par les AKAP, mais que le gradient d'AMPC intracellulaire serait le simple résultat d'un coefficient de diffusion d'AMPC différent de part et d'autre de la cellule (Feinstein *et al.*, 2012). Enfin, nous avons montré que malgré le fait que l'AMPC réduise la migration dépendante de SK3, il reste une partie de l'effet de l'AMPC sur la migration des cellules MDA-MB-434s qui est indépendante de SK3 (45 % de l'inhibition induite par l'AMPC). L'AMPC aurait donc d'autres effets sur des acteurs de la migration cellulaire, et pourrait induire une phosphorylation par la PKA des monomères d'actine, et ainsi inhiber sa polymérisation, et donc la migration (Howe, 2004). Il pourrait aussi induire une phosphorylation de certains canaux Ca^{2+} impliqués dans la migration, tels que les TRPs. De façon intéressante, les gradients intracellulaires d'AMPC et de Ca^{2+} des cellules qui migrent indiquent que l'activité du canal SK3 serait moins importante sur le front de migration qu'à l'arrière de la cellule. Les travaux de Liebau et coll. ont démontré une expression préférentielle de SK3 au niveau des lamellipodes des cellules progénitrices de neurones (Liebau *et al.*, 2007), ce qui paraît être en contradiction avec nos données. Il serait intéressant d'étudier la localisation cellulaire du canal SK3 dans les cellules cancéreuses qui migrent.

Nous avons voulu tester l'effet d'une augmentation de la $[AMPC]_{int}$ sur l'interaction entre Orai 1 et SK3 dans les cellules MDA-MB-435s. Pour cela nous avons étudié les effets de la FSK et du CI-1044 sur l'entrée constitutive de Ca^{2+} . Nous avons montré récemment que le complexe Orai1-SK3 était impliqué dans cette entrée de Ca^{2+} dans les cellules MDA-MB-435s (Chantôme *et al.*, 2013). Nous avons montré ici, que l'augmentation de la $[AMPC]_{int}$ diminue l'entrée constitutive de Ca^{2+} dépendante de SK3. Ceci est cohérent avec l'effet de l'AMPC sur

l'activité du canal SK3, qui en diminuant l'amplitude du courant et en dépolarisant la membrane plasmique diminue l'entrée constitutive de Ca^{2+} *via* Orai 1. L'AMPC rompt ainsi la boucle de rétrocontrôle positive reliant les activités de ces deux canaux. De la même manière que pour la migration, l'AMPC a des effets indépendants de SK3 sur l'entrée constitutive de Ca^{2+} . On peut également supposer que l'AMPC, en activant la PKA (ou d'autres effecteurs) puisse phosphoryler directement Orai 1, ou d'autres canaux calciques impliqués dans cette entrée constitutive de Ca^{2+} (TRPs).

Enfin, nous avons montré que l'augmentation d'AMPC intracellulaire entraîne la délocalisation d'Orai 1 hors des rafts, ce qui n'est pas le cas de SK3. Cette délocalisation membranaire est proposée comme étant une explication à la perte de fonction biologique (migration) du complexe Orai1-SK3 lors de l'inhibition de SK3 par l'Ohmlin (Chantôme *et al.*, 2013). Nous retrouvons ici cette perte de fonction, mais de manière surprenante, seul Orai 1 est délocalisé hors des radeaux lipidiques. Ces résultats permettent de proposer l'hypothèse d'une phosphorylation de l'un des deux canaux par la PKA responsable de la sortie d'Orai 1 hors des radeaux, et de la diminution de la migration et de l'entrée de Ca^{2+} dépendantes du canal SK3. De manière intéressante, il a été démontré qu'il existe des interactions entre certains canaux ioniques, qui sont réduites en présence d'une $[AMPC]_{int}$ élevée. En effet, hERG et KCNQ1, deux canaux K^+ interagissent directement, et leur interaction est réduite en présence d'une forte [AMPC] (100 μ M FSK ; (Organ-Darling *et al.*, 2013)).

Notre étude démontre pour la première fois que le canal SK3 est régulé par l'AMPC, dans des cellules cancéreuses. A notre connaissance, dans ce domaine d'étude, jusqu'ici, parmi les canaux potassiques seul le canal Eag1 a été démontré comme modulé par l'AMPC (Bruggemann *et al.*, 1993) et comme impliqué également dans le processus de cancérisation (Pardo *et al.*, 1999). De plus, nous avons montré pour la première fois que l'AMPC a un rôle dans l'interaction entre Orai 1 et SK3, et que ses effets inhibiteurs sur la migration des cellules cancéreuses peuvent être expliqués par une diminution de l'activité de ce complexe, par délocalisation d'Orai 1 hors des radeaux lipidiques.

3.4. Partie IV. Etude de l'implication d'autres facteurs du microenvironnement osseux dans la régulation de SK3

Il existe de nombreux facteurs dans le microenvironnement osseux, qui favorisent le développement de métastases osseuses (Kingsley *et al.*, 2007). Nous nous sommes demandé si ces derniers pouvaient également participer à la colonisation osseuse dépendante du canal SK3.

3.4.1. Rôle du SDF-1 sur la migration dépendante de SK3

Nous avons voulu tester l'implication d'un autre facteur du microenvironnement osseux, le SDF-1, qui est un facteur sécrété par les cellules stromales osseuses, et qui en se fixant à son récepteur (CXCR4) est connu pour favoriser le tropisme osseux. Le CXCR4 est exprimé par les cellules MDA-MB-435s et les cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 (Subik *et al.*, 2012).

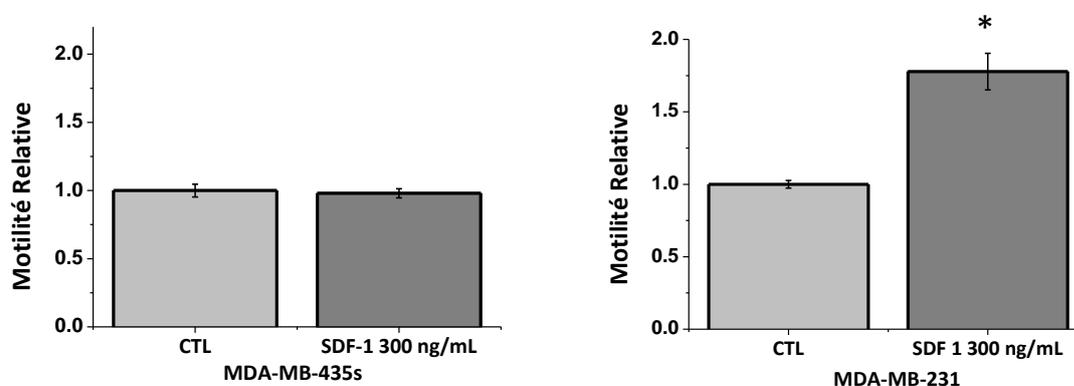


Figure 114. Effets du SDF-1 sur la migration des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-435s et MDA-MB-231. Le SDF-1 n'a pas d'effet sur la migration des cellules possédant SK3, alors qu'il augmente la migration de 70 % des cellules ne le possédant pas : les MDA-MB-231 (N=2, *p= 0.0159 MW).

Les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 sont des cellules qui métastasent également à l'os dans certains modèles murins de xénotransgreffe. Elles constituent ici un contrôle positif de la migration dépendante du SDF-1 dans les cellules cancéreuses du sein (Subik *et al.*, 2012). De manière intéressante, ces cellules n'expriment pas le canal SK3. Le fait que le SDF-1 augmente la migration des cellules MDA-MB-231 sans affecter celle des MDA-MB-435s montrent que dans ce modèle le SDF-1 n'a pas d'effet sur la migration des

cellules possédant SK3 (Figure 114). Ce résultat est en cohérence avec les travaux obtenus par Lechertier et coll. qui montrent que la migration trans-endothéliale des cellules MDA-MB-231 est modulée par le SDF-1 alors que ce n'est pas le cas pour les cellules MDA-MB-435 (Lechertier *et al.*, 2004).

3.4.2. Rôle du RANKL sur l'expression de SK3 et la migration dépendante de ce canal

Notre attention s'est ensuite portée sur le ligand du récepteur activateur de NFκB, le RANKL. En effet, il est intéressant d'étudier plus précisément la régulation de l'expression de SK3 par le RANKL, qui constitue avec le Ca²⁺, l'un des facteurs du microenvironnement osseux majoritairement impliqués dans le cancer du sein métastasant dans l'os. Ce ligand, en se fixant à son récepteur entraîne une dégradation de la protéine IκBα, qui séquestre NFκB. Une fois la dégradation de cette protéine inhibitrice engendrée, le facteur de transcription NFκB est libéré et peut se transloquer au noyau, afin d'activer la transcription des gènes qui sont sous sa dépendance. Au préalable, nous avons vérifié que les cellules MDA-MB-435s possédaient effectivement le récepteur RANK à leur surface. Pour cela nous avons utilisé la cytométrie en flux, avec l'aide du Dr Romain Felix de l'E.A. 4245 de Tours, Cellules Dendritiques et Greffes et nous avons montré que ces cellules expriment effectivement RANK (Figure 115).

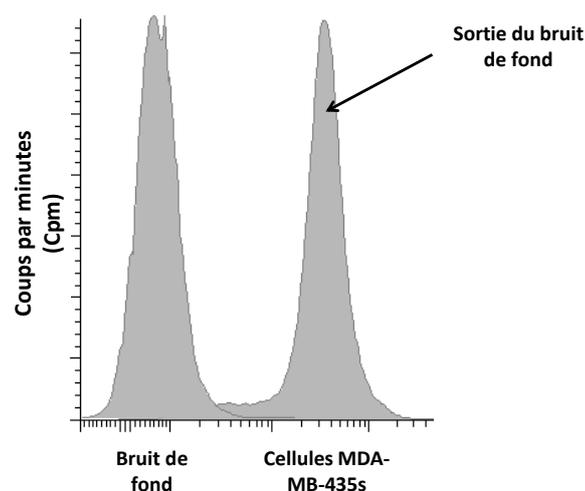


Figure 115. Etude de l'expression du RANK en cytométrie en flux. Le fait que le pic de fluorescence représentant les cellules MDA-MB-435s soit décalé vers la droite par rapport au bruit de fond, indique que ces cellules expriment toutes le récepteur RANK (N=1).

Nous avons voulu tester si la transcription de la protéine SK3 pouvait être régulée par le facteur NFκB dans les cellules MDA-MB-435s. Afin de démontrer cette régulation, le RANKL a été ajouté au milieu extracellulaire pendant 24h, sur les cellules MDA-MB-435s exprimant le promoteur *KCNN3*.

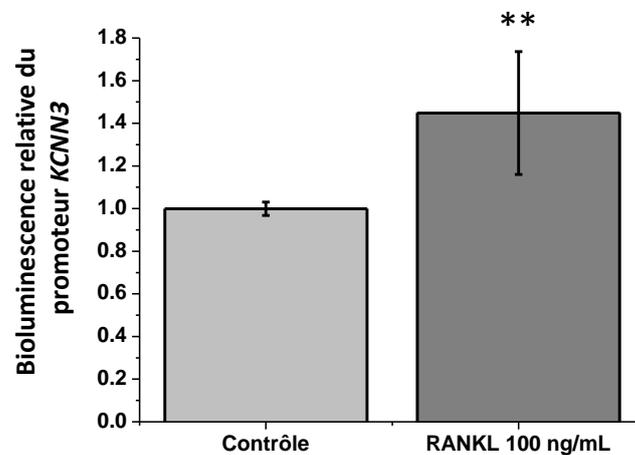


Figure 116. Effets du RANKL sur l'activité du promoteur *KCNN3* transfecté de manière transitoire dans les cellules MDA-MB-435s (48 h post-transfection, RANKL 100 ng/mL pendant 24 h ; N=3 **p<0.001 Mann Whitney).

On observe que le RANKL favorise l'activité du promoteur *KCNN3* et qu'il l'augmente de 44 % (Figure 116). Cette augmentation est largement significative malgré une variabilité assez grande d'une expérience à l'autre. Il y a donc une régulation de la transcription du gène *KCNN3* par le RANKL, probablement par la voie dépendante de NFκB. Ce récepteur RANK, une fois activé par le RANKL, pourrait également activer d'autres voies de signalisation qui pourraient moduler l'expression de SK3. Bien que le RANK soit présent à la surface des cellules d'intérêt, il n'est pas certain qu'il soit fonctionnel dans ces cellules. Nous avons voulu savoir si le RANKL était effectivement capable d'activer la translocation nucléaire de NFκB. Afin de répondre à cette question, nous avons vérifié qu'il y avait bien l'extinction progressive de l'expression de la protéine IκBα, consécutivement à un traitement à l'aide du RANKL. En effet, cette protéine inhibitrice est constitutivement associée à NFκB, et l'activation de RANK par le RANKL entraîne sa phosphorylation, et sa dégradation rapide par le protéasome, ce qui libère ainsi le FT actif. Les deux expériences réalisées ici nous ont permis de montrer une diminution de cette expression suite à 30 min de traitement avec le RANKL. Cependant, cette diminution n'est que transitoire, ce qui ne permet pas de conclure à une réelle activation de la translocation nucléaire de NFκB (Figure 117).

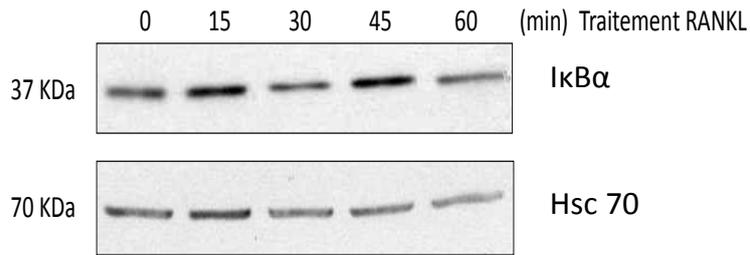


Figure 117. Western blot représentatif de la dégradation de la protéine IκBα en réponse à une cinétique de traitements courts avec le RANKL (100 ng/mL) sur les cellules MDA-MB-435s (N=2).

Ces résultats expliquent sans doute la variabilité des effets obtenus au cours des expériences de mesure de l'activité du promoteur *KCNN3* suite au traitement par le RANKL (SEM élevée malgré une différence significative).

Etant donné que le rôle majeur du canal SK3 dans les cellules cancéreuses est de favoriser la migration de ces cellules, nous avons étudié les effets du RANKL sur la migration des cellules MDA-MB-435s (Figure 118). Après 24 h de traitement avec le RANKL à concentration de 100 ng/mL, nous n'observons aucun effet de cette molécule sur la migration cellulaire. Nous nous attendions à une migration plus importante avec le traitement au RANKL, puisqu'il est capable d'augmenter la transcription du canal SK3. Cette absence d'effet peut s'expliquer soit par la durée du traitement (24 h) qui est peut-être trop courte pour observer un effet sur la protéine SK3 et donc sur la migration malgré l'effet sur la transcription, soit par un effet sur la transcription seule, et non sur la synthèse de protéines SK3 adressées à la membrane et donc fonctionnelles. Des expériences complémentaires, telles que l'étude de l'effet du RANKL sur la protéine SK3 par western blot, ou sur le courant SK3 en patch clamp, pourraient permettre de répondre à cette question.

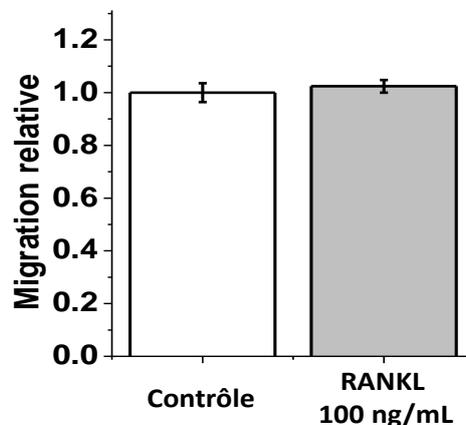


Figure 118. Effets du RANKL sur la migration des cellules MDA-MB-435s. Le RANKL a été appliqué sur les cellules durant toute la durée de l'expérience (24 h). Nous n'observons aucune différence significative (N=3, Mann Whitney, $p > 0.05$).

Le fait que le promoteur *KCNN3* possède une séquence consensus pour NF κ B et nos résultats préliminaires montrant un effet sur l'activité du promoteur de SK3 du RANKL, laisse penser que cette voie pourrait également être impliquée dans le développement de métastases osseuses dépendantes du canal SK3. Il est intéressant de noter que récemment, un essai clinique de Phase II a montré que l'utilisation du Denosumab[®], un anticorps thérapeutique ciblant le RANKL décale de 4 mois l'apparition de métastases osseuses (Smith *et al.*, 2012).

IV. Conclusion et Perspectives

Le Ca^{2+} extracellulaire régule l'expression transcriptionnelle de SK3 et l'activité de ce canal. Nous avons démontré lors de cette étude qu'une augmentation de Ca^{2+} extracellulaire augmente l'activité et l'expression de SK3. On peut supposer que les fortes $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ présentes dans le contexte de métastases ostéolytiques favoriseraient à la fois l'activité et l'expression de SK3 dans les cellules cancéreuses du sein qui arrivent dans l'os, ceci favorisant alors la colonisation de ce tissu par les cellules cancéreuses. En régulant l'activité et l'expression de SK3, le Ca^{2+} est donc un facteur du microenvironnement osseux qui participe au cercle vicieux établi entre la niche osseuse métastatique et les cellules cancéreuses de sein.

Le CaSR est le récepteur membranaire régulant SK3 par le Ca^{2+} extracellulaire. Nous avons montré que le CaSR est impliqué dans la régulation de l'expression du canal SK3 et la migration dépendante de ce canal, induites par le Ca^{2+} extracellulaire dans les cellules MDA-MB-435s. Nous pourrions aller plus loin dans l'étude du rôle de ce CaSR en étudiant les effets de son inhibition ou de son activation, sur le courant SK3. Bien que ce CaSR ne puisse être une cible thérapeutique proprement dite, du fait de ses nombreux rôles physiologiques (Saidak *et al.*, 2009b), il serait intéressant d'étudier *in vivo* dans le modèle murin de xénogreffe développé au laboratoire, les effets d'inhibiteurs utilisés en clinique tels que le Cinacalcet® sur le développement de métastases osseuses. Nous avons montré ici la nécessité d'être en présence d'une $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ élevée (5 mM) afin d'observer des effets plus importants d'une inhibition du CaSR ou de l'un de ses effecteurs. Nous pensons que les cellules MDA-MB-435s expriment une isoforme de CaSR peu sensible au Ca^{2+} extracellulaire. En effet, il existe plusieurs polymorphismes de cette protéine, qui peuvent entraîner une diminution de la sensibilité calcique de ce CaSR, qui sont associées à des maladies telles que l'hyperthyroïdie (<http://www.uniprot.org/uniprot/P41180>)(Hannan *et al.*, 2010).

Le CaSR est modulé positivement par le pH acide (Quinn *et al.*, 2004), on peut donc supposer que lorsque les cellules cancéreuses du sein arrivent dans le microenvironnement osseux particulièrement acide dans le contexte des métastases ostéolytiques, il y ait une activation encore plus importante du CaSR, ce qui alimenterait à nouveau le cercle vicieux des métastases osseuses.

Le CaSR diminue la $[AMPc]_{int}$ et lève l'inhibition de la transcription et de l'activité de SK3 par l'AMPc et la PKA. Nous avons montré qu'une inhibition de la protéine $G_{\alpha i}$ diminue l'expression de SK3 à la $[Ca^{2+}]_{ext}$ physiologique, or celle-ci est induite par le CaSR. L'effet observé est cependant relativement faible (20 %) et pourrait être plus important si la $[Ca^{2+}]_{ext}$ était augmentée (5 mM). L'élévation d'AMPc diminue, elle aussi, l'expression de SK3 ainsi que le courant SK3. Nous avons démontré que cette augmentation d'AMPc diminue la migration et l'entrée constitutive de Ca^{2+} (*via* Orai1) dépendantes de SK3. Ces résultats suggèrent que l'activation du CaSR par l'élévation de Ca^{2+} extracellulaire, entraîne une diminution de la $[AMPc]_{int}$ et une levée de l'inhibition de SK3, que ce soit au niveau expression ou au niveau de l'activité du canal SK3, favorisant ainsi la migration cellulaire. Nous avons également montré que cette régulation de la transcription fait intervenir un FT répresseur de la famille CREB : CREM α ou ICER, qu'il serait intéressant d'identifier à l'aide d'outils permettant de discriminer ces deux FT répresseur, afin de préciser les mécanismes de régulation de l'expression de SK3.

Dans les cellules MDA-MB-435s nous avons obtenu une $[AMPc]_{int}$ de 24 pmoles/mL, qui correspond à 5 pmoles/million de cellules, une valeur proche de celle mesurée dans ces cellules par l'équipe de O'Connor et coll. (O'Connor *et al.*, 1998). Nous émettons l'hypothèse que les cellules MDA-MB-435s, en exprimant le CaSR et grâce à l'activité des PDE, maintiennent une $[AMPc]_{int}$ faible afin de promouvoir l'expression et l'activité du canal SK3, et de permettre la migration cellulaire qui en dépend. Toute augmentation de cette $[AMPc]_{int}$, par l'utilisation de molécules commercialisées telles que les inhibiteurs des PDE4 (Rolipram®) pourraient permettre de réduire cette migration, et pourquoi pas, la colonisation osseuse par les cellules cancéreuses du sein.

L'AMPc délocalise Orai 1 hors des radeaux lipidiques membranaires.

Il est très probable que l'effet inhibiteur de l'AMPc fasse intervenir la PKA, qui en phosphorylant SK3 ou Orai 1, délocaliserait Orai 1 réduisant ainsi l'activité du complexe Orai1-SK3 promouvant la migration cellulaire. Le fait que SK3 soit situé à l'avant des cellules qui migrent (Liebau *et al.*, 2007; Potier *et al.*, 2006), et que l'activité de la PKA y soit également plus importante (Lim *et al.*, 2008), alors que la $[Ca^{2+}]_{int}$ y est plus faible (Schwab *et al.*, 2007), est en faveur d'une régulation préférentielle de SK3 par la PKA, plutôt que par le

Ca²⁺. Avant d'étudier ces interactions fonctionnelles hypothétiques entre les canaux SKCa et la PKA, il faudrait démontrer que l'effet de l'AMPc sur ces courants SKCa passent par la PKA, en utilisant des inhibiteurs en pré incubation, ou en transfectant les cellules HEK-293-SK3 avec le PKi, un plasmide inhibiteur de la sous unité catalytique de la PKA. Puis, il serait intéressant d'étudier si Orai 1 est phosphorylé par PKA, avec pour conséquence la sortie d'Orai 1 hors des radeaux lipidiques, et donc la diminution de l'activité de SK3 et de la migration qui en dépend. Une collaboration est en cours au laboratoire avec le Dr. Martine Cadène du laboratoire CBM d'Orléans. Ce projet a plusieurs objectifs, dont celui d'identifier des sites de phosphorylation (résidus sérines et thréonines) de SK3 par la PKA et d'étudier les conséquences sur la biologie des cellules cancéreuses. La mutagenèse dirigée des sites phosphorylables par la PKA permettra d'identifier parmi les deux sites possibles (une sérine et une Thréonine) ceux qui sont impliqués dans l'inhibition des courants SK3, SK2 et SK1 que nous avons démontrée ici. Un autre objectif consiste à étudier l'impact de la phosphorylation du canal SK3 sur son interaction avec la CaM. En effet, nous pensons qu'il est possible que cette interaction soit également perturbée par l'action de la PKA sur le canal SK3, et que ce soit une des explications possibles de la diminution de courant et de migration suite à l'élévation d'AMPc.

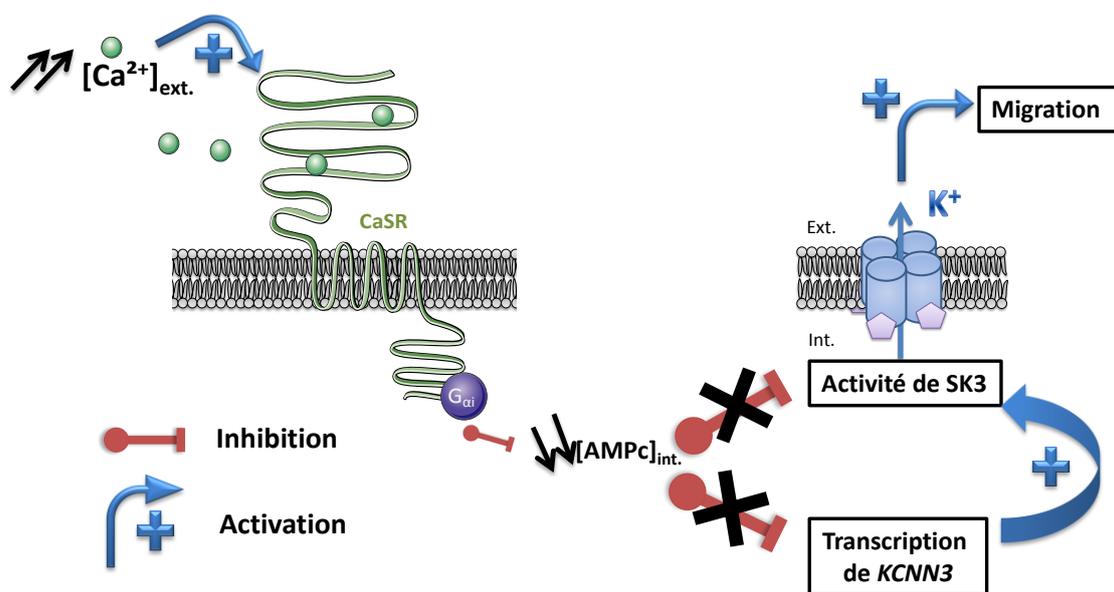


Figure 119. Schéma résumant les résultats majeurs obtenus lors de ce travail de thèse. Le Ca²⁺ extracellulaire, qui est augmenté dans la niche métastatique ostéolytique, active le CaSR, qui lève l'inhibition de l'AMPc à la fois sur l'expression transcriptionnelle de *KCNN3* et sur l'activité de ce canal. Le résultat de cette régulation est synergique et conduit à une augmentation de la migration cellulaire, permettant aux cellules cancéreuses du sein de coloniser le tissu osseux.

Nous avons donc montré pour la première fois une régulation synergique de l'activité et de l'expression de SK3 par l'AMPc et le Ca^{2+} extracellulaire dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-435s. L'ensemble des résultats majeurs obtenus au cours de ce travail de thèse sont résumés dans la figure 119 ci-dessus.

Les résultats obtenus ici pourraient être complétés par l'utilisation d'une approche visant à reproduire le cercle vicieux existant entre les cellules métastasant à l'os et le microenvironnement osseux en co-cultivant des cellules du stroma osseux (cellules de la lignée RAW) et des cellules cancéreuses du sein. Par exemple, l'étude d'Espinosa et coll. a montré que IK_{Ca} régule la migration des ostéoclastes en cultivant des ostéoclastes sur des coupes de tissu osseux *in vitro* (Espinosa *et al.*, 2002). La compréhension des mécanismes impliqués dans la colonisation du tissu osseux par les cellules cancéreuses du sein pourrait ainsi être améliorée.

V. Références bibliographiques

Articles scientifiques

A.

Adams GB, Chabner KT, Alley IR, Olson DP, Szczepiorkowski ZM, Poznansky MC, *et al.* (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**(7076): 599-603.

Aguirre A, Gonzalez A, Planell JA, Engel E (2010). Extracellular calcium modulates in vitro bone marrow-derived Flk-1+ CD34+ progenitor cell chemotaxis and differentiation through a calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **393**(1): 156-161.

Akhtari M, Mansuri J, Newman KA, Guise TM, Seth P (2008). Biology of breast cancer bone metastasis. *Cancer Biol Ther* **7**(1): 3-9.

Allen D, Bond CT, Lujan R, Ballesteros-Merino C, Lin MT, Wang K, *et al.* (2011). The SK2-long isoform directs synaptic localization and function of SK2-containing channels. *Nature neuroscience* **14**(6): 744-749.

Andersen MN, Rasmussen HB (2012). AMPK: A regulator of ion channels. *Communicative & integrative biology* **5**(5): 480-484.

Andres MA, Baptista NC, Efird JT, Ogata KK, Bellinger FP, Zeyda T (2009). Depletion of SK1 channel subunits leads to constitutive insulin secretion. *FEBS letters* **583**(2): 369-376.

Antoni FA (2012). New paradigms in cAMP signalling. *Molecular and cellular endocrinology* **353**(1-2): 3-9.

Atlas E, Stramwasser M, Mueller CR (2001). A CREB site in the BRCA1 proximal promoter acts as a constitutive transcriptional element. *Oncogene* **20**(48): 7110-7114.

B.

Bai M, Trivedi S, Brown EM (1998). Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells. *J Biol Chem* **273**(36): 23605-23610.

Bailey J, Tyson-Capper AJ, Gilmore K, Robson SC, Europe-Finner GN (2005). Identification of human myometrial target genes of the cAMP pathway: the role of cAMP-response element binding (CREB) and modulator (CREMalpha and CREMtau2alpha) proteins. *Journal of molecular endocrinology* **34**(1): 1-17.

Balestrieri C, Alberghina L, Vanoni M, Chiaradonna F (2009). Data recovery and integration from public databases uncovers transformation-specific transcriptional downregulation of cAMP-PKA pathway-encoding genes. *BMC bioinformatics* **10 Suppl 12**: S1.

Baljinnyam E, De Lorenzo MS, Xie LH, Iwatsubo M, Chen S, Goydos JS, *et al.* (2010). Exchange protein directly activated by cyclic AMP increases melanoma cell migration by a Ca²⁺-dependent mechanism. *Cancer Res* **70**(13): 5607-5617.

Barfod ET, Moore AL, Lidofsky SD (2001). Cloning and functional expression of a liver isoform of the small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel SK3. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**(4): C836-842.

Barman SA, Zhu S, Han G, White RE (2003). cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **284**(6): L1004-1011.

Benarroch EE (2013). HCN channels: function and clinical implications. *Neurology* **80**(3): 304-310.

Bender AT, Beavo JA (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews* **58**(3): 488-520.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review* **11**: 127-152.

Bijland S, Mancini SJ, Salt IP (2013). Role of AMP-activated protein kinase in adipose tissue metabolism and inflammation. *Clinical science* **124**(8): 491-507.

Blank T, Nijholt I, Kye MJ, Radulovic J, Spiess J (2003). Small-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel SK3 generates age-related memory and LTP deficits. *Nature neuroscience* **6**(9): 911-912.

Bleich M, Riedemann N, Warth R, Kerstan D, Leipziger J, Hor M, *et al.* (1996). Ca²⁺ regulated K⁺ and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells. *Pflugers Arch* **432**(6): 1011-1022.

Bond CT, Maylie J, Adelman JP (1999). Small-conductance calcium-activated potassium channels. *Annals of the New York Academy of Sciences* **868**: 370-378.

Bond CT, Sprengel R, Bissonnette JM, Kaufmann WA, Pribnow D, Neelands T, *et al.* (2000). Respiration and parturition affected by conditional overexpression of the Ca²⁺-activated K⁺ channel subunit, SK3. *Science* **289**(5486): 1942-1946.

Bosch MA, Kelly MJ, Ronnekleiv OK (2002). Distribution, neuronal colocalization, and 17beta-E2 modulation of small conductance calcium-activated K(+) channel (SK3) mRNA in the guinea pig brain. *Endocrinology* **143**(3): 1097-1107.

Bosch MA, Tonsfeldt KJ, Ronnekleiv OK (2013). mRNA expression of ion channels in GnRH neurons: subtype-specific regulation by 17beta-estradiol. *Molecular and cellular endocrinology* **367**(1-2): 85-97.

Boudot C, Saidak Z, Boulanouar AK, Petit L, Gouilleux F, Massy Z, *et al.* (2010). Implication of the calcium sensing receptor and the Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the extracellular calcium-mediated migration of RAW 264.7 osteoclast precursor cells. *Bone* **46**(5): 1416-1423.

Brennan SC, Conigrave AD (2009). Regulation of cellular signal transduction pathways by the extracellular calcium-sensing receptor. *Curr Pharm Biotechnol* **10**(3): 270-281.

Brennan SC, Thiem U, Roth S, Aggarwal A, Fetahu I, Tennakoon S, *et al.* (2013). Calcium sensing receptor signalling in physiology and cancer. *Biochim Biophys Acta* **1833**(7): 1732-1744.

Brock SE, Rendon BE, Yaddanapudi K, Mitchell RA (2012). Negative regulation of AMP-activated protein kinase (AMPK) activity by macrophage migration inhibitory factor (MIF) family members in non-small cell lung carcinomas. *J Biol Chem* **287**(45): 37917-37925.

Brouard T, Chantome A (eds) (2009). *Two Approaches for Automatic Nuclei Cell Counting in Low Resolution Fluorescence Images*. CRCPress.

Brown A, Cornwell T, Korniyenko I, Solodushko V, Bond CT, Adelman JP, *et al.* (2007). Myometrial expression of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels depresses phasic uterine contraction. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**(2): C832-840.

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, *et al.* (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**(6455): 575-580.

Brown EM, MacLeod RJ (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev* **81**(1): 239-297.

Bruggemann A, Pardo LA, Stuhmer W, Pongs O (1993). Ether-a-go-go encodes a voltage-gated channel permeable to K⁺ and Ca²⁺ and modulated by cAMP. *Nature* **365**(6445): 445-448.

Burnouf C, Auclair E, Avenel N, Bertin B, Bigot C, Calvet A, *et al.* (2000). Synthesis, structure-activity relationships, and pharmacological profile of 9-amino-4-oxo-1-phenyl-3,4,6,7-tetrahydro[1,4]diazepino[6, 7,1-hi]indoles: discovery of potent, selective phosphodiesterase type 4 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* **43**(25): 4850-4867.

C.

Cailleau R, Olive M, Cruciger QV (1978). Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In vitro* **14**(11): 911-915.

- Castoria G, Migliaccio A, D'Amato L, Di Stasio R, Ciociola A, Lombardi M, *et al.* (2008). Integrating signals between cAMP and MAPK pathways in breast cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **13**: 1318-1327.
- Cha-Molstad H, Keller DM, Yochum GS, Impey S, Goodman RH (2004). Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(37): 13572-13577.
- Cha SK, Huang C, Ding Y, Qi X, Huang CL, Miller RT (2011). Calcium-sensing receptor decreases cell surface expression of the inwardly rectifying K⁺ channel Kir4.1. *J Biol Chem* **286**(3): 1828-1835.
- Chaffer CL, Weinberg RA (2011). A perspective on cancer cell metastasis. *Science* **331**(6024): 1559-1564.
- Chambers AF (2009). MDA-MB-435 and M14 cell lines: identical but not M14 melanoma? *Cancer Res* **69**(13): 5292-5293.
- Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC (2002). Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* **2**(8): 563-572.
- Chandhoke TK, Huang YF, Liu F, Gronowicz GA, Adams DJ, Harrison JR, *et al.* (2008). Osteopenia in transgenic mice with osteoblast-targeted expression of the inducible cAMP early repressor. *Bone* **43**(1): 101-109.
- Chantôme 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**(20): 3620-3630.
- Chantôme A, Potier-Cartereau M, Clarysse L, Fromont G, Marionneau-Lambot S, Gueguinou M, *et al.* (2013). Pivotal role of the lipid raft SK3-Orai1 complex in human cancer cell migration and bone metastases. *Cancer Res*.
- Chattopadhyay N, Quinn SJ, Kifor O, Ye C, Brown EM (2007). The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem Pharmacol* **74**(3): 438-447.
- Chen MX, Gorman SA, Benson B, Singh K, Hieble JP, Michel MC, *et al.* (2004). Small and intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels confer distinctive patterns of distribution in human tissues and differential cellular localisation in the colon and corpus cavernosum. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **369**(6): 602-615.
- Chhabra A, Fernando H, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG (2007). Expression of transcription factor CREB1 in human breast cancer and its correlation with prognosis. *Oncology reports* **18**(4): 953-958.

Chioni AM, Shao D, Grose R, Djamgoz MB (2010). Protein kinase A and regulation of neonatal Nav1.5 expression in human breast cancer cells: activity-dependent positive feedback and cellular migration. *The international journal of biochemistry & cell biology* **42**(2): 346-358.

Cho-Chung YS, Pepe S, Clair T, Budillon A, Nesterova M (1995). cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth. *Critical reviews in oncology/hematology* **21**(1-3): 33-61.

Choi S, Kim MY, Joo KY, Park S, Kim JA, Jung JC, *et al.* (2012). Modafinil inhibits K(Ca)3.1 currents and muscle contraction via a cAMP-dependent mechanism. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **66**(1): 51-59.

Christofori G (2006). New signals from the invasive front. *Nature* **441**(7092): 444-450.

Chung S, Kaczmarek LK (1995). Modulation of the inactivation of voltage-dependent potassium channels by cAMP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **15**(5 Pt 2): 3927-3935.

Clezardin P (2009). Integrins in bone metastasis formation and potential therapeutic implications. *Current cancer drug targets* **9**(7): 801-806.

Coghlin C, Murray GI (2010). Current and emerging concepts in tumour metastasis. *The Journal of pathology* **222**(1): 1-15.

Conroy T, Malissard L, Dartois D, Luporsi E, Stines J, Chardot C (1988). [Natural history and development of bone metastasis. Apropos of 429 cases]. *Bulletin du cancer* **75**(9): 845-857.

Conti M, Beavo J (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annual review of biochemistry* **76**: 481-511.

Coulon V. BJ-M (2001). Flux calciques et expression génique. *Médecine/Science* **17**: 969-978.

Cuddapah VA, Sontheimer H (2011). Ion channels and transporters [corrected] in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**(3): C541-549.

D.

D'Amico L, Patane S, Grange C, Bussolati B, Isella C, Fontani L, *et al.* (2013). Primary breast cancer stem-like cells metastasise to bone, switch phenotype and acquire a bone tropism signature. *British journal of cancer* **108**(12): 2525-2536.

D'Souza-Li L (2006). The calcium-sensing receptor and related diseases. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* **50**(4): 628-639.

Das S, Samant RS, Shevde LA (2012). The hedgehog pathway conditions the bone microenvironment for osteolytic metastasis of breast cancer. *International journal of breast cancer* **2012**: 298623.

Dilly S, Poncin S, Lamy C, Liegeois JF, Seutin V (2012). [Physiology, pharmacology and modelling of potassium channels: focus on SK channels]. *Medecine sciences : M/S* **28**(4): 395-402.

Dupont J, Reverchon M, Cloix L, Froment P, Rame C (2012). Involvement of adipokines, AMPK, PI3K and the PPAR signaling pathways in ovarian follicle development and cancer. *The International journal of developmental biology* **56**(10-12): 959-967.

E.

El Hiani Y, Lehen'kyi V, Ouadid-Ahidouch H, Ahidouch A (2009). Activation of the calcium-sensing receptor by high calcium induced breast cancer cell proliferation and TRPC1 cation channel over-expression potentially through EGFR pathways. *Archives of biochemistry and biophysics* **486**(1): 58-63.

Esguerra M, Wang J, Foster CD, Adelman JP, North RA, Levitan IB (1994). Cloned Ca(2+)-dependent K⁺ channel modulated by a functionally associated protein kinase. *Nature* **369**(6481): 563-565.

Espinosa L, Paret L, Ojeda C, Tourneur Y, Delmas PD, Chenu C (2002). Osteoclast spreading kinetics are correlated with an oscillatory activation of a calcium-dependent potassium current. *Journal of cell science* **115**(Pt 19): 3837-3848.

F.

Faber ES, Delaney AJ, Power JM, Sedlak PL, Crane JW, Sah P (2008). Modulation of SK channel trafficking by beta adrenoceptors enhances excitatory synaptic transmission and plasticity in the amygdala. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**(43): 10803-10813.

Fay AJ, Qian X, Jan YN, Jan LY (2006). SK channels mediate NADPH oxidase-independent reactive oxygen species production and apoptosis in granulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(46): 17548-17553.

Feinstein WP, Zhu B, Leavesley SJ, Sayner SL, Rich TC (2012). Assessment of cellular mechanisms contributing to cAMP compartmentalization in pulmonary microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**(6): C839-852.

Fidler IJ (1970). Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor embolilabeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *Journal of the National Cancer Institute* **45**(4): 773-782.

Fidler IJ (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**(6): 453-458.

Foller M, Jaumann M, Dettling J, Saxena A, Pakladok T, Munoz C, *et al.* (2012). AMP-activated protein kinase in BK-channel regulation and protection against hearing loss following acoustic overstimulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**(10): 4243-4253.

Fujita A, Takeuchi T, Jun H, Hata F (2003). Localization of Ca²⁺-activated K⁺ channel, SK3, in fibroblast-like cells forming gap junctions with smooth muscle cells in the mouse small intestine. *Journal of pharmacological sciences* **92**(1): 35-42.

Fujita A, Takeuchi T, Saitoh N, Hanai J, Hata F (2001). Expression of Ca²⁺-activated K⁺ channels, SK3, in the interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(5): C1727-1733.

G.

Gardos G (1958). The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **30**(3): 653-654.

Girault A, Haelters JP, Potier-Cartereau M, Chantome A, Jaffres PA, Bougnoux P, *et al.* (2012). Targeting SKCa channels in cancer: potential new therapeutic approaches. *Curr Med Chem* **19**(5): 697-713.

Gonzalez C, Baez-Nieto D, Valencia I, Oyarzun I, Rojas P, Naranjo D, *et al.* (2012). K⁺ channels: function-structural overview. *Comprehensive Physiology* **2**(3): 2087-2149.

Goodchild SJ, Lamy C, Seutin V, Marrion NV (2009). Inhibition of K(Ca)_{2.2} and K(Ca)_{2.3} channel currents by protonation of outer pore histidine residues. *The Journal of general physiology* **134**(4): 295-308.

Grandoch M, Roscioni SS, Schmidt M (2010). The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *Br J Pharmacol* **159**(2): 265-284.

H.

Hajdu SI (2011). A note from history: landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer* **117**(5): 1097-1102.

Hanahan D, Weinberg RA (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.

Hannan FM, Nesbit MA, Christie PT, Lissens W, Van der Schueren B, Bex M, *et al.* (2010). A homozygous inactivating calcium-sensing receptor mutation, Pro339Thr, is associated with

isolated primary hyperparathyroidism: correlation between location of mutations and severity of hypercalcaemia. *Clinical endocrinology* **73**(6): 715-722.

Hannan *et al.*, (2012) Identification of 70 calcium-sensing receptor mutations in hyper- and hypo-calcaemic patients: evidence for clustering of extracellular domain mutations at calcium-binding sites. *Human Molecular Genetics* **21** (12): 2768-2778.

Herrera GM, Pozo MJ, Zvara P, Petkov GV, Bond CT, Adelman JP, *et al.* (2003). Urinary bladder instability induced by selective suppression of the murine small conductance calcium-activated potassium (SK3) channel. *The Journal of physiology* **551**(Pt 3): 893-903.

Hirschberg B, Maylie J, Adelman JP, Marrion NV (1998). Gating of recombinant small-conductance Ca-activated K⁺ channels by calcium. *The Journal of general physiology* **111**(4): 565-581.

Hofer AM (2012). Interactions between calcium and cAMP signaling. *Curr Med Chem* **19**(34): 5768-5773.

Hofer AM, Lefkimmiatis K (2007). Extracellular calcium and cAMP: second messengers as "third messengers"? *Physiology* **22**: 320-327.

Hofmann F, Biel M, Kaupp UB (2005). International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and structure-function relationships of cyclic nucleotide-regulated channels. *Pharmacological reviews* **57**(4): 455-462.

Holz GG, Kang G, Harbeck M, Roe MW, Chepurny OG (2006). Cell physiology of cAMP sensor Epac. *The Journal of physiology* **577**(Pt 1): 5-15.

Howe AK (2004). Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta* **1692**(2-3): 159-174.

Huang C, Hydo LM, Liu S, Miller RT (2009). Activation of choline kinase by extracellular Ca²⁺ is Ca(2⁺)-sensing receptor, Galpha12 and Rho-dependent in breast cancer cells. *Cell Signal* **21**(12): 1894-1900.

Huang C, Sindic A, Hill CE, Hujer KM, Chan KW, Sassen M, *et al.* (2007). Interaction of the Ca²⁺-sensing receptor with the inwardly rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function. *American journal of physiology. Renal physiology* **292**(3): F1073-1081.

Huo HZ, Wang B, Qin J, Guo SY, Liu WY, Gu Y (2013). AMP-activated protein kinase (AMPK)/Ulk1-dependent autophagic pathway contributes to C6 ceramide-induced cytotoxic effects in cultured colorectal cancer HT-29 cells. *Molecular and cellular biochemistry* **378**(1-2): 171-181.

Hurley JH (1999). Structure, mechanism, and regulation of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **274**(12): 7599-7602.

Hussein O, Komarova SV (2011). Breast cancer at bone metastatic sites: recent discoveries and treatment targets. *Journal of cell communication and signaling* **5**(2): 85-99.

J.

Jacobsen JP, Weikop P, Hansen HH, Mikkelsen JD, Redrobe JP, Holst D, *et al.* (2008). SK3 K⁺ channel-deficient mice have enhanced dopamine and serotonin release and altered emotional behaviors. *Genes, brain, and behavior* **7**(8): 836-848.

Jacobson D, Pribnow D, Herson PS, Maylie J, Adelman JP (2003). Determinants contributing to estrogen-regulated expression of SK3. *Biochem Biophys Res Commun* **303**(2): 660-668.

Jager H, Adelman JP, Grissmer S (2000). SK2 encodes the apamin-sensitive Ca²⁺-activated K⁺ channels in the human leukemic T cell line, Jurkat. *FEBS letters* **469**(2-3): 196-202.

Jones HM, Hamilton KL, Devor DC (2005). Role of an S4-S5 linker lysine in the trafficking of the Ca²⁺-activated K⁺ channels IK1 and SK3. *J Biol Chem* **280**(44): 37257-37265.

Joyce JA, Pollard JW (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**(4): 239-252.

K.

Kamp TJ, Hell JW (2000). Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circulation research* **87**(12): 1095-1102.

Kang G, Leech CA, Chepurny OG, Coetzee WA, Holz GG (2008). Role of the cAMP sensor Epac as a determinant of KATP channel ATP sensitivity in human pancreatic beta-cells and rat INS-1 cells. *The Journal of physiology* **586**(5): 1307-1319.

Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Cordon-Cardo C, *et al.* (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**(6): 537-549.

Kantham L, Quinn SJ, Egbuna OI, Baxi K, Butters R, Pang JL, *et al.* (2009). The calcium-sensing receptor (CaSR) defends against hypercalcemia independently of its regulation of parathyroid hormone secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **297**(4): E915-923.

Kim A, Son M, Kim KI, Yang Y, Song EY, Lee HG, *et al.* (2009). Elevation of intracellular cyclic AMP inhibits NF-kappaB-mediated thymosin beta4 expression in melanoma cells. *Exp Cell Res* **315**(19): 3325-3335.

Kim S, Harris M, Varner JA (2000). Regulation of integrin alpha vbeta 3-mediated endothelial cell migration and angiogenesis by integrin alpha5beta1 and protein kinase A. *J Biol Chem* **275**(43): 33920-33928.

Kimbrow KS, Duschene K, Willard M, Moore JA, Freeman S (2008). A novel gene STYK1/NOK is upregulated in estrogen receptor-alpha negative estrogen receptor-beta positive breast cancer cells following estrogen treatment. *Molecular biology reports* **35**(1): 23-27.

Kingsley LA, Fournier PG, Chirgwin JM, Guise TA (2007). Molecular biology of bone metastasis. *Mol Cancer Ther* **6**(10): 2609-2617.

Kleger A, Seufferlein T, Malan D, Tischendorf M, Storch A, Wolheim A, *et al.* (2010). Modulation of calcium-activated potassium channels induces cardiogenesis of pluripotent stem cells and enrichment of pacemaker-like cells. *Circulation* **122**(18): 1823-1836.

Klein CA (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nat Rev Cancer* **9**(4): 302-312.

Klein CA, Blankenstein TJ, Schmidt-Kittler O, Petronio M, Polzer B, Stoecklein NH, *et al.* (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet* **360**(9334): 683-689.

Kleppisch T, Nelson MT (1995). Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A2 receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(26): 12441-12445.

Kohler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, *et al.* (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science* **273**(5282): 1709-1714.

Kolski-Andreaco A, Tomita H, Shakkottai VG, Gutman GA, Cahalan MD, Gargus JJ, *et al.* (2004). SK3-1C, a dominant-negative suppressor of SKCa and IKCa channels. *J Biol Chem* **279**(8): 6893-6904.

Kuiper EF, Nelemans A, Luiten P, Nijholt I, Dolga A, Eisel U (2012). K(Ca)₂ and k(ca)₃ channels in learning and memory processes, and neurodegeneration. *Frontiers in pharmacology* **3**: 107.

Kunzelmann K (2005). Ion channels and cancer. *The Journal of membrane biology* **205**(3): 159-173.

Kwak JO, Kwak J, Kim HW, Oh KJ, Kim YT, Jung SM, *et al.* (2005). The extracellular calcium sensing receptor is expressed in mouse mesangial cells and modulates cell proliferation. *Experimental & molecular medicine* **37**(5): 457-465.

L.

Lam BS, Cunningham C, Adams GB (2011). Pharmacologic modulation of the calcium-sensing receptor enhances hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow. *Blood* **117**(4): 1167-1175.

Latorre R, Brauchi S (2006). Large conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel: activation by Ca²⁺ and voltage. *Biological research* **39**(3): 385-401.

Laurent AC, Breckler M, Berthouze M, Lezoualc'h F (2012). Role of Epac in brain and heart. *Biochemical Society transactions* **40**(1): 51-57.

Lechertier T, Berard M, Vassy R, Herve MA, Crepin M (2004). Transendothelial migration of two metastatic breast carcinoma cells depend on the SDF-1 α -CXCR4 complexes. *Anticancer research* **24**(6): 4011-4017.

Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT (2006). Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology* **21**: 69-78.

Leroy J, Abi-Gerges A, Nikolaev VO, Richter W, Lechene P, Mazet JL, *et al.* (2008). Spatiotemporal dynamics of beta-adrenergic cAMP signals and L-type Ca²⁺ channel regulation in adult rat ventricular myocytes: role of phosphodiesterases. *Circulation research* **102**(9): 1091-1100.

Letz S, Rus R, Haag C, Dorr HG, Schnabel D, Mohlig M, *et al.* (2010). Novel activating mutations of the calcium-sensing receptor: the calcilytic NPS-2143 mitigates excessive signal transduction of mutant receptors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **95**(10): E229-233.

Liebau S, Steinestel J, Linta L, Kleger A, Storch A, Schoen M, *et al.* (2011). An SK3 channel/nWASP/Abi-1 complex is involved in early neurogenesis. *PloS one* **6**(3): e18148.

Liebau S, Vaida B, Proepper C, Grissmer S, Storch A, Boeckers TM, *et al.* (2007). Formation of cellular projections in neural progenitor cells depends on SK3 channel activity. *Journal of neurochemistry* **101**(5): 1338-1350.

Liegeois JF, Mercier F, Graulich A, Graulich-Lorge F, Scuvee-Moreau J, Seutin V (2003). Modulation of small conductance calcium-activated potassium (SK) channels: a new challenge in medicinal chemistry. *Curr Med Chem* **10**(8): 625-647.

Lim CJ, Kain KH, Tkachenko E, Goldfinger LE, Gutierrez E, Allen MD, *et al.* (2008). Integrin-mediated protein kinase A activation at the leading edge of migrating cells. *Molecular biology of the cell* **19**(11): 4930-4941.

Lin KI, Chattopadhyay N, Bai M, Alvarez R, Dang CV, Baraban JM, *et al.* (1998). Elevated extracellular calcium can prevent apoptosis via the calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **249**(2): 325-331.

Lin MT, Lujan R, Watanabe M, Adelman JP, Maylie J (2008). SK2 channel plasticity contributes to LTP at Schaffer collateral-CA1 synapses. *Nature neuroscience* **11**(2): 170-177.

Liu G, Hu X, Chakrabarty S (2009). Calcium sensing receptor down-regulates malignant cell behavior and promotes chemosensitivity in human breast cancer cells. *Cell Calcium* **45**(3): 216-225.

Liu XK, Wang G, Chen SD (2010). Modulation of the activity of dopaminergic neurons by SK channels: a potential target for the treatment of Parkinson's disease? *Neuroscience bulletin* **26**(3): 265-271.

Lyle KS, Raaijmakers JH, Bruinsma W, Bos JL, de Rooij J (2008). cAMP-induced Epac-Rap activation inhibits epithelial cell migration by modulating focal adhesion and leading edge dynamics. *Cell Signal* **20**(6): 1104-1116.

M.

Macho B, Sassone-Corsi P (2003). Functional analysis of transcription factors CREB and CREM. *Methods in enzymology* **370**: 396-415.

Magno AL, Ward BK, Ratajczak T (2011). The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocr Rev* **32**(1): 3-30.

Mamillapalli R, VanHouten J, Zawalich W, Wysolmerski J (2008). Switching of G-protein usage by the calcium-sensing receptor reverses its effect on parathyroid hormone-related protein secretion in normal versus malignant breast cells. *J Biol Chem* **283**(36): 24435-24447.

Manning AT, O'Brien N, Kerin MJ (2006). Roles for the calcium sensing receptor in primary and metastatic cancer. *Eur J Surg Oncol* **32**(7): 693-697.

Marino M, Beny JL, Peyter AC, Diaceri G, Tolsa JF (2011). Perinatal hypoxia enhances cyclic adenosine monophosphate-mediated BKCa channel activation in adult murine pulmonary artery. *Journal of cardiovascular pharmacology* **57**(2): 154-165.

Martin TJ, Moseley JM (2000). Mechanisms in the skeletal complications of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **7**(4): 271-284.

Matthiesen K, Nielsen J (2011). Cyclic AMP control measured in two compartments in HEK293 cells: phosphodiesterase K(M) is more important than phosphodiesterase localization. *PloS one* **6**(9): e24392.

Mayr B, Montminy M (2001). Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(8): 599-609.

McEwan DG, Brunton VG, Baillie GS, Leslie NR, Houslay MD, Frame MC (2007). Chemoresistant KM12C colon cancer cells are addicted to low cyclic AMP levels in a phosphodiesterase 4-regulated compartment via effects on phosphoinositide 3-kinase. *Cancer Res* **67**(11): 5248-5257.

McKenzie AJ, Campbell SL, Howe AK (2011). Protein kinase A activity and anchoring are required for ovarian cancer cell migration and invasion. *PloS one* **6**(10): e26552.

Merkle D, Hoffmann R (2011). Roles of cAMP and cAMP-dependent protein kinase in the progression of prostate cancer: cross-talk with the androgen receptor. *Cell Signal* **23**(3): 507-515.

Mihai R, Stevens J, McKinney C, Ibrahim NB (2006). Expression of the calcium receptor in human breast cancer--a potential new marker predicting the risk of bone metastases. *Eur J Surg Oncol* **32**(5): 511-515.

Milara J, Mata M, Serrano A, Peiro T, Morcillo EJ, Cortijo J (2010). Extracellular calcium-sensing receptor mediates human bronchial epithelial wound repair. *Biochem Pharmacol* **80**(2): 236-246.

Miller WR (2002). Regulatory subunits of PKA and breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* **968**: 37-48.

Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, *et al.* (2007). Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(16): 6740-6745.

Molina CA, Foulkes NS, Lalli E, Sassone-Corsi P (1993). Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* **75**(5): 875-886.

Monaghan AS, Benton DC, Bahia PK, Hosseini R, Shah YA, Haylett DG, *et al.* (2004). The SK3 subunit of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels interacts with both SK1 and SK2 subunits in a heterologous expression system. *J Biol Chem* **279**(2): 1003-1009.

Mundy GR (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* **2**(8): 584-593.

Murray AJ (2008). Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Science signaling* **1**(22): re4.

N.

Naranjo JR, Mellstrom B (2012). Ca²⁺-dependent transcriptional control of Ca²⁺ homeostasis. *J Biol Chem* **287**(38): 31674-31680.

Naviglio S, Di Gesto D, Illiano F, Chiosi E, Giordano A, Illiano G, *et al.* (2010). Leptin potentiates antiproliferative action of cAMP elevation via protein kinase A down-regulation in breast cancer cells. *Journal of cellular physiology* **225**(3): 801-809.

Neary CL, Nesterova M, Cho YS, Cheadle C, Becker KG, Cho-Chung YS (2004). Protein kinase A isozyme switching: eliciting differential cAMP signaling and tumor reversion. *Oncogene* **23**(54): 8847-8856.

Neylon CB, D'Souza T, Reinhart PH (2004). Protein kinase A inhibits intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* **448**(6): 613-620.

Neylon CB, Fowler CJ, Furness JB (2006). Regulation of the slow afterhyperpolarization in enteric neurons by protein kinase A. *Autonomic neuroscience : basic & clinical* **126-127**: 258-263.

Nguyen DX (2011). Tracing the origins of metastasis. *The Journal of pathology* **223**(2): 195-204.

Nguyen DX, Bos PD, Massague J (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* **9**(4): 274-284.

Nguyen DX, Massague J (2007). Genetic determinants of cancer metastasis. *Nat Rev Genet* **8**(5): 341-352.

Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ (2004). Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* **279**(36): 37215-37218.

O.

O'Connor KL, Mercurio AM (2001). Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. *J Biol Chem* **276**(51): 47895-47900.

O'Connor KL, Shaw LM, Mercurio AM (1998). Release of cAMP gating by the alpha6beta4 integrin stimulates lamellae formation and the chemotactic migration of invasive carcinoma cells. *The Journal of cell biology* **143**(6): 1749-1760.

O'Keefe RJ, Guise TA (2003). Molecular mechanisms of bone metastasis and therapeutic implications. *Clinical orthopaedics and related research*(415 Suppl): S100-104.

Oerlecke I, Bauer E, Dittmer A, Leyh B, Dittmer J (2013). Cyclic AMP enhances TGFbeta responses of breast cancer cells by upregulating TGFbeta receptor I expression. *PLoS one* **8**(1): e54261.

Olesen MS, Jabbari J, Holst AG, Nielsen JB, Steinbrüchel DA, Jespersen T, *et al.* (2011). Screening of KCNN3 in patients with early-onset lone atrial fibrillation. *Europace : European pacing, arrhythmias, and cardiac electrophysiology : journal of the working groups on cardiac pacing, arrhythmias, and cardiac cellular electrophysiology of the European Society of Cardiology* **13**(7): 963-967.

Organ-Darling LE, Vernon AN, Giovanniello JR, Lu Y, Moshal K, Roder K, *et al.* (2013). Interactions between hERG and KCNQ1 alpha-subunits are mediated by their COOH termini and modulated by cAMP. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **304**(4): H589-599.

Ouadid-Ahidouch H, Chaussade F, Roudbaraki M, Slomianny C, Dewailly E, Delcourt P, *et al.* (2000). KV1.1 K(+) channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **278**(2): 272-277.

P.

Pardo LA, del Camino D, Sanchez A, Alves F, Bruggemann A, Beckh S, *et al.* (1999). Oncogenic potential of EAG K(+) channels. *The EMBO journal* **18**(20): 5540-5547.

Parihar AS, Coghlan MJ, Gopalakrishnan M, Shieh CC (2003). Effects of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel modulators on human prostate cancer cell proliferation. *European journal of pharmacology* **471**(3): 157-164.

Paulucci-Holthausen AA, Vergara LA, Bellot LJ, Canton D, Scott JD, O'Connor KL (2009). Spatial distribution of protein kinase A activity during cell migration is mediated by A-kinase anchoring protein AKAP Lbc. *J Biol Chem* **284**(9): 5956-5967.

Paviot BT, Bachelot T, Clavreul G, Jacquin JP, Mille D, Rodrigues JM (2009). [Impact of the chemotherapy protocols for metastatic breast cancer on the treatment cost and the survival time of 371 patients treated in three hospitals of the Rhone-Alpes region]. *Bulletin du cancer* **96**(10): 929-940.

Peitersen T, Hougaard C, Jespersen T, Jorgensen NK, Olesen SP, Grunnet M (2006). Subtype-specific, bi-component inhibition of SK channels by low internal pH. *Biochem Biophys Res Commun* **343**(3): 943-949.

Pellegrino M, Pellegrini M (1998). Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch* **436**(5): 749-756.

Perera RK, Nikolaev VO (2013). Compartmentation of cAMP signalling in cardiomyocytes in health and disease. *Acta physiologica* **207**(4): 650-662.

Perez G, Toro L (1994). Differential modulation of large-conductance KCa channels by PKA in pregnant and nonpregnant myometrium. *The American journal of physiology* **266**(5 Pt 1): C1459-1463.

Perry MD, Sandle GI (2009). Regulation of colonic apical potassium (BK) channels by cAMP and somatostatin. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **297**(1): G159-167.

Pierce SL, England SK (2010). SK3 channel expression during pregnancy is regulated through estrogen and Sp factor-mediated transcriptional control of the KCNN3 gene. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**(4): E640-646.

Plopper GE, Huff JL, Rust WL, Schwartz MA, Quaranta V (2000). Antibody-induced activation of beta1 integrin receptors stimulates cAMP-dependent migration of breast cells on laminin-5. *Molecular cell biology research communications : MCBRC* **4**(2): 129-135.

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**(11): 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**(1): 42-47.

Prevarskaya N, Skryma R, Bidaux G, Flourakis M, Shuba Y (2007). Ion channels in death and differentiation of prostate cancer cells. *Cell death and differentiation* **14**(7): 1295-1304.

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2010). Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in molecular medicine* **16**(3): 107-121.

Pribnow D, Johnson-Pais T, Bond CT, Keen J, Johnson RA, Janowsky A, *et al.* (1999). Skeletal muscle and small-conductance calcium-activated potassium channels. *Muscle & nerve* **22**(6): 742-750.

Q.

Quinn SJ, Bai M, Brown EM (2004). pH Sensing by the calcium-sensing receptor. *J Biol Chem* **279**(36): 37241-37249.

R.

Ray K, Clapp P, Goldsmith PK, Spiegel AM (1998). Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *J Biol Chem* **273**(51): 34558-34567.

Ren Y, Barnwell LF, Alexander JC, Lubin FD, Adelman JP, Pfaffinger PJ, *et al.* (2006). Regulation of surface localization of the small conductance Ca²⁺-activated potassium channel, Sk2, through direct phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **281**(17): 11769-11779.

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, *et al.* (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**(5651): 1704-1709.

Ro S, Hatton WJ, Koh SD, Horowitz B (2001). Molecular properties of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels expressed in murine colonic smooth muscle. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* **281**(4): G964-973.

Rochais F, Vandecasteele G, Lefebvre F, Lugnier C, Lum H, Mazet JL, *et al.* (2004). Negative feedback exerted by cAMP-dependent protein kinase and cAMP phosphodiesterase on subsarcolemmal cAMP signals in intact cardiac myocytes: an in vivo study using adenovirus-mediated expression of CNG channels. *J Biol Chem* **279**(50): 52095-52105.

Rogers AC, Hanly AM, Collins D, Baird AW, Winter DC (2012). Review article: loss of the calcium-sensing receptor in colonic epithelium is a key event in the pathogenesis of colon cancer. *Clinical colorectal cancer* **11**(1): 24-30.

Roncarati R, Decimo I, Fumagalli G (2005). Assembly and trafficking of human small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel SK3 are governed by different molecular domains. *Molecular and cellular neurosciences* **28**(2): 314-325.

Roscioni SS, Elzinga CR, Schmidt M (2008). Epac: effectors and biological functions. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **377**(4-6): 345-357.

S.

Sadana R, Dessauer CW (2009). Physiological roles for G protein-regulated adenylyl cyclase isoforms: insights from knockout and overexpression studies. *Neuro-Signals* **17**(1): 5-22.

Saidak Z, Boudot C, Abdoune R, Petit L, Brazier M, Mentaverri R, *et al.* (2009a). Extracellular calcium promotes the migration of breast cancer cells through the activation of the calcium sensing receptor. *Exp Cell Res* **315**(12): 2072-2080.

Saidak Z, Brazier M, Kamel S, Mentaverri R (2009b). Agonists and allosteric modulators of the calcium-sensing receptor and their therapeutic applications. *Mol Pharmacol* **76**(6): 1131-1144.

Saidak Z, Mentaverri R, Brown EM (2009c). The role of the calcium-sensing receptor in the development and progression of cancer. *Endocr Rev* **30**(2): 178-195.

Sanders JL, Chattopadhyay N, Kifor O, Yamaguchi T, Butters RR, Brown EM (2000). Extracellular calcium-sensing receptor expression and its potential role in regulating parathyroid hormone-related peptide secretion in human breast cancer cell lines. *Endocrinology* **141**(12): 4357-4364.

Sands WA, Palmer TM (2008). Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal* **20**(3): 460-466.

Schonherr R (2005). Clinical relevance of ion channels for diagnosis and therapy of cancer. *The Journal of membrane biology* **205**(3): 175-184.

Schumacher MA, Rivard AF, Bachinger HP, Adelman JP (2001). Structure of the gating domain of a Ca²⁺-activated K⁺ channel complexed with Ca²⁺/calmodulin. *Nature* **410**(6832): 1120-1124.

Schwab A (2001). Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *American journal of physiology. Renal physiology* **280**(5): F739-747.

Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, Stock C (2012). Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol Rev* **92**(4): 1865-1913.

Schwab A, Nechyporuk-Zloy V, Fabian A, Stock C (2007). Cells move when ions and water flow. *Pflugers Arch* **453**(4): 421-432.

Shaikh D, Zhou Q, Chen T, Ibe JC, Raj JU, Zhou G (2012). cAMP-dependent protein kinase is essential for hypoxia-mediated epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion in lung cancer cells. *Cell Signal* **24**(12): 2396-2406.

Shimizu A, Nakayama H, Wang P, Konig C, Akino T, Sandlund J, *et al.* (2013). Netrin-1 promotes glioblastoma cell invasiveness and angiogenesis by multiple pathways including activation of RhoA, cathepsin B, and cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* **288**(4): 2210-2222.

Shui IM, Mucci LA, Wilson KM, Kraft P, Penney KL, Stampfer MJ, *et al.* (2013). Common genetic variation of the calcium-sensing receptor and lethal prostate cancer risk. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **22**(1): 118-126.

Siu YT, Jin DY (2007). CREB--a real culprit in oncogenesis. *The FEBS journal* **274**(13): 3224-3232.

Smith MR, Saad F, Coleman R, Shore N, Fizazi K, Tombal B, *et al.* (2012). Denosumab and bone-metastasis-free survival in men with castration-resistant prostate cancer: results of a phase 3, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* **379**(9810): 39-46.

Son J, Lee JH, Kim HN, Ha H, Lee ZH (2010). cAMP-response-element-binding protein positively regulates breast cancer metastasis and subsequent bone destruction. *Biochem Biophys Res Commun* **398**(2): 309-314.

Spina A, Di Maiolo F, Esposito A, Sapio L, Chiosi E, Sorvillo L, *et al.* (2012). cAMP Elevation Down-Regulates beta3 Integrin and Focal Adhesion Kinase and Inhibits Leptin-Induced Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *BioResearch open access* **1**(6): 324-332.

Ster J, De Bock F, Guerineau NC, Janossy A, Barrere-Lemaire S, Bos JL, *et al.* (2007). Exchange protein activated by cAMP (Epac) mediates cAMP activation of p38 MAPK and modulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channels in cerebellar neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(7): 2519-2524.

Stocker M (2004). Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nature reviews. Neuroscience* **5**(10): 758-770.

Strassmaier T, Bond CT, Sailer CA, Knaus HG, Maylie J, Adelman JP (2005). A novel isoform of SK2 assembles with other SK subunits in mouse brain. *J Biol Chem* **280**(22): 21231-21236.

Strobl JS, Wonderlin WF, Flynn DC (1995). Mitogenic signal transduction in human breast cancer cells. *General pharmacology* **26**(8): 1643-1649.

Subik K, Shu L, Wu C, Liang Q, Hicks D, Boyce B, *et al.* (2012). The ubiquitin E3 ligase WWP1 decreases CXCL12-mediated MDA231 breast cancer cell migration and bone metastasis. *Bone* **50**(4): 813-823.

T.

Tajima N, Schonherr K, Niedling S, Kaatz M, Kanno H, Schonherr R, *et al.* (2006). Ca²⁺-activated K⁺ channels in human melanoma cells are up-regulated by hypoxia involving hypoxia-inducible factor-1alpha and the von Hippel-Lindau protein. *The Journal of physiology* **571**(Pt 2): 349-359.

Talmadge JE, Fidler IJ (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* **70**(14): 5649-5669.

Taylor MS, Bonev AD, Gross TP, Eckman DM, Brayden JE, Bond CT, *et al.* (2003). Altered expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circulation research* **93**(2): 124-131.

Theman TA, Collins MT (2009). The role of the calcium-sensing receptor in bone biology and pathophysiology. *Curr Pharm Biotechnol* **10**(3): 289-301.

Tomita H, Shakkottai VG, Gutman GA, Sun G, Bunney WE, Cahalan MD, *et al.* (2003). Novel truncated isoform of SK3 potassium channel is a potent dominant-negative regulator of SK currents: implications in schizophrenia. *Molecular psychiatry* **8**(5): 524-535, 460.

Topala CN, Schoeber JP, Searchfield LE, Riccardi D, Hoenderop JG, Bindels RJ (2009). Activation of the Ca²⁺-sensing receptor stimulates the activity of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV5. *Cell Calcium* **45**(4): 331-339.

Tu CL, Chang W, Xie Z, Bikle DD (2008). Inactivation of the calcium sensing receptor inhibits E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and calcium-induced differentiation in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* **283**(6): 3519-3528.

Tuteja D, Rafizadeh S, Timofeyev V, Wang S, Zhang Z, Li N, *et al.* (2010). Cardiac small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel subunits form heteromultimers via the coiled-coil domains in the C termini of the channels. *Circulation research* **107**(7): 851-859.

Tyczynski JEBFPDM (2002). Breast cancer in Europe. In: *European Network of Cancer Registries*, pp 1-4.

V.

VanHouten J, Dann P, McGeoch G, Brown EM, Krapcho K, Neville M, *et al.* (2004). The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport. *The Journal of clinical investigation* **113**(4): 598-608.

Villalobos C, Shakkottai VG, Chandy KG, Michelhaugh SK, Andrade R (2004). SKCa channels mediate the medium but not the slow calcium-activated afterhyperpolarization in cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**(14): 3537-3542.

Vincent JP, Schweitz H, Lazdunski M (1975). Structure-function relationships and site of action of apamin, a neurotoxic polypeptide of bee venom with an action on the central nervous system. *Biochemistry* **14**(11): 2521-2525.

W.

Wang S, Melkounian Z, Woodfork KA, Cather C, Davidson AG, Wonderlin WF, *et al.* (1998). Evidence for an early G1 ionic event necessary for cell cycle progression and survival in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Journal of cellular physiology* **176**(3): 456-464.

Wang Z (2004). Roles of K⁺ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflugers Arch* **448**(3): 274-286.

Ward BK, Magno AL, Walsh JP, Ratajczak T (2012). The role of the calcium-sensing receptor in human disease. *Clinical biochemistry* **45**(12): 943-953.

Ward DT, McLarnon SJ, Riccardi D (2002). Aminoglycosides increase intracellular calcium levels and ERK activity in proximal tubular OK cells expressing the extracellular calcium-sensing receptor. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **13**(6): 1481-1489.

Weatherall KL, Goodchild SJ, Jane DE, Marrion NV (2010). Small conductance calcium-activated potassium channels: from structure to function. *Progress in neurobiology* **91**(3): 242-255.

Weatherall KL, Seutin V, Liegeois JF, Marrion NV (2011). Crucial role of a shared extracellular loop in apamin sensitivity and maintenance of pore shape of small-conductance calcium-activated potassium (SK) channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(45): 18494-18499.

Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacological reviews* **57**(4): 463-472.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ (2005). Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer* **5**(8): 591-602.

Weilbaecher KN, Guise TA, McCauley LK (2011). Cancer to bone: a fatal attraction. *Nat Rev Cancer* **11**(6): 411-425.

Weiss L (2000). Metastasis of cancer: a conceptual history from antiquity to the 1990s. *Cancer Metastasis Rev* **19**(3-4): I-XI, 193-383.

Wellman GC, Santana LF, Bonev AD, Nelson MT (2001). Role of phospholamban in the modulation of arterial Ca(2+) sparks and Ca(2+)-activated K(+) channels by cAMP. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**(3): C1029-1037.

Wickenden A (2002). K(+) channels as therapeutic drug targets. *Pharmacology & therapeutics* **94**(1-2): 157-182.

Willoughby D, Cooper DM (2007). Organization and Ca²⁺ regulation of adenylyl cyclases in cAMP microdomains. *Physiol Rev* **87**(3): 965-1010.

Wittekindt OH, Visan V, Tomita H, Imtiaz F, Gargus JJ, Lehmann-Horn F, *et al.* (2004). An apamin- and scyllatoxin-insensitive isoform of the human SK3 channel. *Mol Pharmacol* **65**(3): 788-801.

Wolfart J, Neuhoff H, Franz O, Roeper J (2001). Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**(10): 3443-3456.

Wu D, Zhou HE, Huang WC, Iqbal S, Habib FK, Sartor O, *et al.* (2007). cAMP-responsive element-binding protein regulates vascular endothelial growth factor expression: implication in human prostate cancer bone metastasis. *Oncogene* **26**(35): 5070-5077.

Wulff H, Kolski-Andreaco A, Sankaranarayanan A, Sabatier JM, Shakkottai V (2007). Modulators of small- and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels and their therapeutic indications. *Curr Med Chem* **14**(13): 1437-1457.

Wyatt CN, Mustard KJ, Pearson SA, Dallas ML, Atkinson L, Kumar P, *et al.* (2007). AMP-activated protein kinase mediates carotid body excitation by hypoxia. *J Biol Chem* **282**(11): 8092-8098.

X.

Xia XM, Fakler B, Rivard A, Wayman G, Johnson-Pais T, Keen JE, *et al.* (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* **395**(6701): 503-507.

Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, *et al.* (2007). Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* **449**(7161): 496-500.

Xin W, Tran TM, Richter W, Clark RB, Rich TC (2008). Roles of GRK and PDE4 activities in the regulation of beta2 adrenergic signaling. *The Journal of general physiology* **131**(4): 349-364.

Y.

Yang M, Kream BE (2008). Calcitonin induces expression of the inducible cAMP early repressor in osteoclasts. *Endocrine* **33**(3): 245-253.

Yang S, Zhang JJ, Huang XY (2009). Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. *Cancer Cell* **15**(2): 124-134.

Z.

Zhong M, Clarke S, Vo BT, Khan SA (2012). The essential role of Gialpha2 in prostate cancer cell migration. *Molecular cancer research : MCR* **10**(10): 1380-1388.

Zhou B, Liu Y, Kahn M, Ann DK, Han A, Wang H, *et al.* (2012). Interactions between beta-catenin and transforming growth factor-beta signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB)-binding protein (CBP). *J Biol Chem* **287**(10): 7026-7038.

Zhou Z, Jiang DJ, Jia SJ, Xiao HB, Xiao B, Li YJ (2007). Down-regulation of endogenous nitric oxide synthase inhibitors on endothelial SK3 expression. *Vascular pharmacology* **47**(5-6): 265-271.

Chapitre dans un ouvrage imprimé

Pointillart V, Fabre T, Palussière J *Métastases osseuses* Encycl Méd Chir (Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Appareil locomoteur, 14-798, (2003), 9p.

Potier M., Roger S. , Chantome A., Gillet L., Girault A., Besson P. , Goré J., Bougnoux P., Vandier C., Le Guennec J-Y. *Abnormal expression of ion channels participates in the metastatic development of epithelial cancers* (Editions H. Duclhler) Biophysics of Ion Channels and Diseases (2009)

Widmaier E.P., Raff H., Straang K.T., *Physiologie Humaine : les mécanismes du fonctionnement de l'organisme* (2013) VANDER-Editions Maloine (5ème édition).

Sites web consultés

- NetPhosK (référence du 9 Décembre 12)
www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/
- Webmaxc (référence du 13 Janvier 2013)
<http://www.stanford.edu/~cpatton/webmaxc/webmaxcS.htm>.
- CellBioLabs (référence du 27 février 2013)
[http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA500 %20Fig %201 %281 %29.jpg](http://www.cellbiolabs.com/sites/default/files/STA500%20Fig%201%281%29.jpg)
- Pierce (référence du 15 Avril 2013)
<http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=4A93DDB6-5056-8A76-4E38-E54A3C46D750>
- Uniprot (référence du 16 Juillet 2013)
<http://www.uniprot.org/uniprot/P41180>
- ATCC (référence du 23 Avril 2013)
<http://www.atcc.org/products/all/HTB-129.aspx>
- Roche (référence du 17 Mai 2013°)
<http://www.roche-applied-science.com/>
- Pabic (référence du 5 Juillet 2013)
[http://www.pabic.com.pkpatch %20nd %20page_clip_image001.gif](http://www.pabic.com.pkpatch%20nd%20page_clip_image001.gif)
- EadAngers (référence du 10 Mai 2013)
<http://ead.univangers.fr/~jaspard/Page2/TexteTD/8TPmethodologie/5Electrophores e/1Electrophorese.htm/>.
- <http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=home>

Annexes

Annexe 1 Publication en révision :

cAMP-PKA inhibition of SK3 channel reduced both Ca²⁺ entry and cancer cell migration by regulation of SK3-Orai1 complex

Lucie Clarysse^{1,2}, Maxime Guéguinou^{1,2}, Marie Potier-Cartereau^{1,2}, Grégoire Vandecasteele^{3,4}, Philippe Bougnoux^{1,2,5}, Stephan Chevalier^{1,2}, Aurélie Chantôme^{1,2*}, Christophe Vandier^{1,2*#}

¹Inserm, UMR1069 « Nutrition, Croissance et Cancer », Tours, F-37032, France.

²Université François Rabelais, Tours, F-37032, France.

³Inserm UMR769, LabEx LERMIT, DHU TORINO, Châtenay-Malabry, F-92296, France.

⁴Faculté de Pharmacie, Université Paris Sud ; 92296 Châtenay-Malabry, F-92296, France.

⁵Centre HS Kaplan, CHRU Tours, Tours, F-37032, France.

*These authors contributed equally to this work.

#**Correspondence** should be addressed to Christophe Vandier, Phone: +(33)247366024; Fax: +(33)247366226;

E-mail: christophe.vandier@univ-tours.fr

Abstract

SK3 channel mediates the migration of various cancer cells. When expressed in breast cancer cell, SK3 channel forms a complex with Orai1, a voltage-independent Ca²⁺ channel. This SK3-Orai1 complex associates within lipid rafts where it controls a constitutive Ca²⁺ entry leading to cancer cell migration and bone metastases development. Since cAMP was found to modulate breast cancer cell migration, we hypothesized that this could be explained by a modulation of SK3 channel activity. Herein, we study the regulation of SK3 channel by the cAMP pathway and the consequences for SK3-dependent Ca²⁺ entry and cancer cell migration. We established that the beta-adrenergic receptor agonist isoprenaline or the direct adenylyl cyclase activator forskolin alone or in

combination with the PDE4 inhibitor, CI-1044, decreased SK3 channel activity without modifying the expression of SK3 protein at the plasma membrane. Forskolin and CI-1044 reduced the SK3-dependent constitutive Ca^{2+} entry and the SK3-dependent migration of MDA-MB-435s cells. PKA inhibition with KT 5720 reduced the effect of forskolin and CI-1044 by 50% on Ca^{2+} entry and SK3 activity. These cAMP-elevating agents displaced Orai1 protein outside lipid rafts in contrast to SK3 which remained in the lipid rafts fractions. All together, these results show that activation of the cAMP-PKA pathway decreases SK3 channel and SK3-Orai1 complex activities, leading to a decrease in both Ca^{2+} entry and cancer cell migration. This work supports the potential use of cAMP elevating agents to reduce cancer cell migration and may provide novel opportunities to address/prevent bone metastasis.

Keywords : cAMP/ PKA / SK3 channel / Breast cancer / Calcium entry/ Migration

Introduction

Based on their single channel conductance, Ca^{2+} -activated potassium channels (KCa channels) are divided into three families that include large or big KCa (BKCa), intermediate KCa (IKCa/KCa3.1) and small conductance KCa (SKCa) channels. There are three isoforms of SKCa subunits, named SK1/KCa2.1, SK2/KCa2.2, SK3/KCa2.3, which associate to form homo- or hetero-tetramers [19, 25]. If KCa channels regulate neuronal and smooth muscle excitabilities in a physiological context, this is not what is observed in a tumour context where the physiological function of KCa is hijacked in the cancer cell to drive essential biological functions for tumour development [1, 10, 38]. Among them, we have demonstrated a pivotal role of SK3 channel as a mediator of cancer cell migration [14]. When expressed in cancer cells, this channel associates with the voltage-independent Ca^{2+} channel Orai1 to form a SK3-Orai1 complex within lipid rafts where it triggers a constitutive Ca^{2+} entry leading to cancer cell migration [7].

The levels of cAMP are determined through the concerted action of adenylyl cyclases (AC) which synthesize this second messenger, and cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE) that degrade it. cAMP/PKA signaling has been shown to regulate cell migration by exerting both negative and positive effects depending on many factors such as gradients of [cAMP], and level of PKA activity [18]. Indeed, in breast cancer cells, [cAMP] elevation modulates cell migration [28-30] depending on the localization of [cAMP] variation which provides a spatial and temporal PKA activity, subsequently influencing differentially Rac and RhoA functions [28].

An important mechanism for ion channel modulation is cAMP-dependent phosphorylation as observed following β -adrenergic receptor increase of the L-type voltage-gated Ca^{2+} current [43]. Among KCa, [cAMP] elevation increases BKCa channels activity through the activation of PKA or PKG [9, 11, 34]. Increase in [cAMP] has been shown to enhance [13, 16, 33] or to inhibit IKCa channel activity [8, 26], likely by indirect or direct PKA phosphorylation of the channel at PKA consensus sites respectively. Surprisingly, [cAMP] elevation modulation of SK1 and SK3 channels activities have never been described whereas some publications report that cAMP-PKA decreased the surface localization of SK2 channels, leading to a reduction of the number of SK2 channel expressed at the plasma membrane, and an increase in excitatory postsynaptic potentials underlying long-term potentiation [12, 21, 23, 37].

In the present work, we have studied the regulation of SK3 channel by cAMP-elevating agents (isoprenaline, a beta adrenergic receptor agonist; forskolin, an AC activator and CI-1044, a PDE4 inhibitor) and the consequence on breast cancer cell migration depending on Ca^{2+} entry through lipid rafts SK3-Orai1 complex. We demonstrate, for the first time, that the activation of the cAMP-PKA pathway reduces SK3 channel activity, as well as the constitutive, SK3-Orai1 complex dependent Ca^{2+} entry, and the SK3-dependent migration of the MDA-MB-435s cancer cells. cAMP elevation had no effect on the quantity of SK3 protein either expressed at the plasma membrane or on its localization in lipid rafts, but displaces Orai1 outside of lipid rafts. Thus, we propose that the activation of the cAMP-PKA pathway decreases breast cancer cell migration by inhibiting SK3 channel activity and by displacing Orai1 outside of lipid rafts, leading to a reduction of constitutive Ca^{2+} entry.

Materials and methods

Cell lines

Human breast cancer cell line MDA-MB-435s and Human Embryonic Kidney 293T cells (HEK-293T) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, LGC Promochem, Molsheim, France) and cultured as already described [15]. HEK-293T and MDA-MB-435s cells were transduced using lentivectors carrying rat SK3 channels cDNA to generate HEK293T-rSK3 and shRNA specific to SK3 or a nontargeting shRNA to respectively generate SK3- and SK3+ cells as previously described [15].

Live cell cAMP measurements using fluorescence resonance energy transfer (FRET)

Cells were plated in 2 cm diameter glass bottom petri dishes and infected with an adenovirus encoding the FRET-based cAMP sensor Epac2-camps at a multiplicity of infection of 100 viral particles/cells. This sensor contains a single cAMP-binding domain of the exchange factor Epac2 fused to YFP and CFP fluorophores [27]. In the absence of cAMP, when the CFP fluorophore is excited at 440 nm, the energy is transferred to the YFP by FRET, resulting in light emission at 545 nm, the maximum of YFP emission. Increasing intracellular cAMP concentrations leads to a conformational change in Epac2-camps which abrogates the FRET between CFP and YFP, so that CFP excitation results in CFP emission at 480 nm. Thus, the CFP/YFP ratio of Epac2-camps is proportional to intracellular [cAMP] [27].

For FRET measurements cells were maintained PSS solution containing (in mmol/l): NaCl 140, MgCl₂ 1, KCl 4, CaCl₂ 2, D-glucose 11.1 and HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. Control or forskolin-containing solutions were applied by placing the cell at the opening of a 250 μm (inner diameter) capillary tube. Images were captured every 5 s using the 40x objective of a Nikon TE 300 inverted microscope connected to a software-controlled (Metafluor, Molecular Devices) cooled charge coupled (CCD) camera (Sensicam PE, PCO). CFP was excited during 300 ms by a Xenon lamp (Nikon) using a 440/20BP filter and a 455LP dichroic mirror. Dual emission imaging of CFP and YFP was performed using an Optosplit II emission splitter (Cairn Research) equipped with a 495LP dichroic mirror and BP filters 470/30 and 535/30, respectively. Average fluorescence intensity of the entire cell was measured. Background was subtracted and YFP intensity was corrected for CFP spillover before calculating the ratio.

ELISA cAMP assays

To evaluate cAMP levels in MDA-MB-435s cells, the Monoclonal Anti-cAMP Antibody Based Direct cAMP ELISA Kit has been used (NewEast Biosciences, USA), according to manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated in 6 well plates (10 mm²) the day before experiment, and cells were treated with FSK for 30 min. Then, cells were lysed using a 1 % triton X100 and 0.1 M HCl lysis buffer. The 96-wells plate of the kit was coated with goat antigens to allow fixation of anti-goat antibodies, which will recognize anti-cAMP antibodies. cAMP-HRP conjugated was placed in each well to compete with cell endogenous cAMP production. After a 2h-incubation with all antibodies and cAMP-HRP, the HRP substrate was placed in each well. To determine cAMP concentration, a standard curve was built by plotting the mean absorbance for each standard cAMP concentration.

Electrophysiology

Electrophysiological recordings were performed in the whole cell configuration of the patch clamp technique as already described [15]. Briefly, patch pipettes (2.0-4.0 M Ω) were filled with a pipette solution contained (in mM): KCl 145, MgCl₂ 1, Mg-ATP 1, HEPES 10, CaCl₂ 0.87, EGTA 1, adjusted to pH 7.2 with KOH, pCa6. The effects of tested compounds on HEK293T-rSK3 and MDA-MB-435s cells were measured using a ramp protocol from +100 mV to -100 mV with a holding potential of 0 mV (500 ms duration; 4 sec intervals). Current amplitudes of SK3 channels were analyzed at 0 mV to minimize chloride currents ($E_{Cl^-} = 0\text{mV}$). For MDA-MB-435s cells, external media contains 100 nM Iberiotoxin (IbTx) to fully inhibit BK_{Ca} channels.

Constitutive Ca²⁺ entry measurements

This protocol has been already validated in MDA-MB-435s cells [7]. Briefly, cells were loaded with Fura2-AM (5 μM) and immediately after centrifugation, cells were re-suspended at 1×10^6 cells in 2 mL PSS Ca²⁺-free solution containing (in mM): NaCl 140, MgCl₂ 1, KCl 4, EGTA 1, D-glucose 11.1 and HEPES 10, adjusted to pH 7.4 with NaOH. The validation of a constitutive calcium entry control by SK3-Orai1 complex has been validated in SK3⁺ cells silencing for STIM1 (Supplementary Fig. S3 of [7]).

Cell viability and cell migration

Cell viability was determined using the tetrazolium salt reduction method and cell migration was analysed as previously described [36]. Briefly, 4×10^4 cells were seeded in the upper compartment with medium culture supplemented with 5 % of foetal bovine serum (FBS \pm drugs). The lower compartment was filled with medium culture supplemented with 5% FBS (\pm drugs). After 24 h, stationary cells were removed from the topside of the membrane, whereas migrated cells in the bottom side of the inserts were fixed, nuclei were stained and automatically counted [3].

Proteinase K digestion

HEK293T-rSK3 and MDA-MB-435s cells were both pretreated with CI-1044 either with isoprenaline or forskolin for 30 min. Next, proteinase K digestion was performed as described previously for SK3 protein [35, 42].

Drugs and Antibodies

Forskolin (AC activator), isoprenaline (beta-adrenergic agonist), IbTx, apamin (SK3 blocker), KT 5720 (a PKA inhibitor) and KT 5823 (a PKG inhibitor) were added to the PSS or culture media at the concentrations indicated in the figure legends. All drugs were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin, France), except for KT inhibitors (R&D Systems, UK) and CI-1044 ([*(R)*-*N*-[9-amino-3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-1-phenylpyrrolo[3,2,1-*j,k*][1,4] benzodiazepin-3-yl]-3-pyridinecarboxamide]), a selective inhibitor of PDE4 with a purity of 98.5 % which was obtained from Pfizer R&D (Amboise, France). IC₅₀ of CI-1044 for the PDE4 isozyme is $0.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$, whereas it is greater than 100 μM for PDE3, PDE1 and PDE5 [5]. The antibodies used were the following : rabbit anti-Orai1 (H-46, Santa Cruz Biotech., dilution 1/500), mouse anti-GAPDH (G8795, Sigma-Aldrich., dilution 1/10000), rabbit anti-SK3 (P0608, Sigma-Aldrich, dilution 1/250), rabbit anti-caveolin (D46G3, Cell Signaling Tech, dilution 1/200), goat anti- β -adaplin (sc 6425, Santa Cruz Biotech., dilution 1/1000) and horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit, anti-goat or anti-mouse (Jackson Immuno-Research Laboratories).

Membrane fractionation

Membranes were fractionated on sucrose gradient (90 %, 45 %, 35 % and 5 %) as described [6]. Upon centrifugation a total of 12 fractions were collected. Caveolin 1 was used as a marker for the identification of caveolae fractions, and β -adaplin was used as a marker for non-lipid-rafts fractions.

Statistics

Statistical analyses have been performed using SigmaStat Software (version 3.0.1a, Systat Software, Inc). Unless otherwise indicated, data were expressed as mean \pm standard error of the mean (N, number of experiments and n, number of cells from independent experiments). For comparison between more than two means we used Kruskal-Wallis one way analysis of variance followed by Dunn's or Dunnet's post hoc tests as appropriate. Comparisons between two means were made using Mann-Whitney. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

cAMP elevating agents are inhibitors of SK3 channel activity in HEK-293T cells

To examine functional effect of cAMP on SK3 channel properties, we developed HEK-293T cells expressing SK3 channel and exposed the cells to a specific PDE4 inhibitor (CI-1044) used alone or with isoprenaline (Iso, a beta adrenergic receptor agonist), two conditions known to induce a stable increase of [cAMP] in HEK-293T cells [44]. Note that CI-1044 was used because PDE4 is one of a major PDE in HEK-293T cells known to potentiate cAMP response [24]. Figure 1A shows whole-cell SK3 currents recorded at membrane potentials varying from -100 mV to +65 mV for 500 msec before and after application of 100 μ M CI-1044 alone, then with the addition of 100 nM Iso. When the steady-state inhibition was reached, 100 nM apamin was applied to completely inhibit residual SK3 currents. The inhibitory effects of CI-1044 and Iso were voltage-independent (data not shown). The effect of cAMP elevating agents-induced inhibition of the SK3 current was analyzed at 0 mV, and the entire time course of the experiment is depicted in Figure 1B. CI-1044 reduced the amplitude of the current by about 25 % after 200 sec and then the addition of Iso further decrease SK3-current amplitude by 50 % after 30 sec. In addition, application of apamin fully blocked the SK3 current. We then examined the dose-dependent effect of Iso in the presence of CI-1044. Iso reduced SK3 current amplitude in a concentration-dependent manner with a concentration required to evoke half-maximal inhibition (IC_{50}) of 57.9 ± 8.5 nM ($n = 5$, Fig. 1C). We next evaluated the effect of 10 μ M FSK alone and in the presence of 100 μ M CI-1044 on SK3 current amplitude in HEK-293T cells. FSK alone decreased SK3 current by 25% while the addition of CI-1044 dramatically reduced SK3 current by about 90 % after 200 sec (Fig. 1D,E). These data show, for the first time, that cAMP elevating agents, either by indirectly or directly stimulating AC or by inhibiting cAMP degradation, inhibit SK3 channel activity.

cAMP elevation reduces SK3 current, cancer cell migration and constitutive Ca^{2+} entry in MDA-MB-435s cells

We have shown that SK3 channel is a mediator of MDA-MB-435s cancer cell migration [14, 36] a critical step in bone metastasis outgrowth [7]. Prior to test the effect of cAMP elevating agents on SK3 channel activity of MDA-MB-435s cells and on MDA-MB-435s cancer cells migration, we checked the efficiency of FSK to increase [cAMP] in these cancer cells. 10 μ M FSK for 30 min increased [cAMP] 1.5 times compared to control, corresponding to concentration from 24.0 ± 7.8 pmoles/mL to 33.6 ± 9.0 pmoles/mL ($n = 5$) respectively in control and after stimulation with FSK (ELISA cAMP assays). This result was confirmed by measuring [cAMP] in real time in living MDA-MB-435s cells using the FRET-based cAMP sensor Epac2-camps [27]. Exposure of MDA-MB-435s cells to FSK produced a change in the probe's FRET response consistent with an increase of [cAMP] (Fig. 2A). Then, we assessed the effect of cAMP-elevating agents (10 μ M FSK plus 100 μ M CI-1044) on SK3 currents of MDA-MB-435s. 100 nM IbTx was added to fully block BKCa channels (SK3 and BKCa are the main K^+ currents in these cells) and currents were recorded at a membrane potential of 0 mV to minimize chloride currents ($E_{Cl} = 0$ mV). Figure 2B shows that in two minutes FSK plus CI-1044 induce a 60% decrease of SK3 current amplitude in MDA-MB-435s cells. Then, we tested the effect of cAMP elevating agents on MDA-MB-435s cells migration and on their constitutive Ca^{2+} entry. To exclude a possible cell viability effects in the calculation of the number of cells that migrated, MTT assays were performed. Treatment with 10 μ M FSK or 100 μ M CI-1044 for 24 h had not significant effect on MDA-MB-435s cell viability while the combined application of both cAMP elevating agents seemed to increase their proliferation (data not shown). Although the treatment with FSK plus CI-1044 increased the number of cells, it dramatically reduced MDA-MB-435s cell migration by 81.9 % (Fig. 3A). SK3 action on cancer cell migration/bone metastasis proved to be mediated through an association with Orai1 channel, a voltage-independent Ca^{2+} channel that form a complex with SK3 and regulates a constitutive Ca^{2+} entry independently of STIM1 [7]. Treatment with 10 μ M FSK plus 100 μ M CI-1044 for 30 min reduced by 51.4 % the constitutive Ca^{2+} entry of MDA-MB-435s cells (Fig. 3B,C).

cAMP elevating agents reduce SK3-dependent cancer cell migration and constitutive Ca^{2+} entry

To investigate whether the inhibitory effect of FSK plus CI-1044 on cell migration was dependent on SK3 channel, we tested cAMP elevating agents on the migration capacity of MDA-MB-435s cells that do not express SK3, SK3⁻ cells, and compared the effect to that observed in SK3⁺ cells. Figure 3C shows that the suppression of SK3 decreases the migration capacity of MDA-MB-435s cells to approximately 46 % (924 cells / 2022 cells). Treatment with FSK and CI-1044 further reduced cell migration of SK3⁻ cells by 66 % that represent a 30.4 % reduction of SK3⁻ cell migration. Thus, combination of two cAMP elevating agents reduced by 51.5 % (81.9-

30.4) the SK3-dependent part of cancer cell migration. Note that as observed in SK3⁺ cells, FSK and CI-1044 increased SK3⁻ cell viability (data not shown). We next evaluated the SK3-sensitive part of the Ca²⁺ entry that was inhibited by FSK and CI-1044. Figure 3D shows that the suppression of SK3 decreases the constitutive Ca²⁺ entry of MDA-MB-435s cells to approximately 40 %. Treatment with FSK and CI-1044 further reduced the constitutive Ca²⁺ entry of SK3⁻ cells by 61 %. Thus, combination of two cAMP elevating agents reduced by 27 % (51.4-24.4) the SK3-dependent part of the constitutive Ca²⁺ entry of MDA-MB-435s cells. In conclusion, these experiments demonstrated that increasing [cAMP] reduced by 42.3 % and 27 % the SK3-dependent cancer cell migration and constitutive Ca²⁺ entry, respectively.

cAMP elevating agents has no effect on SK3 channel expression and localization but moved Orai1 outside of lipid rafts

The results above showed that increasing [cAMP] reduced cancer cell migration by inhibiting a constitutive Ca²⁺ entry dependent on SK3 channel activity. To determine if the decrease in SK3 channel activity observed following cAMP elevation was due to a decrease in plasma membrane SK3 protein expression, we assessed cell-surface protein expression using a proteinase K cleavage assay as described previously [35, 42]. In the absence of proteinase K, SK3 ran at an apparent molecular mass of 75 kDa, consistent with the full-length protein in HEK-SK3T and MDA-MB-435s cells (Fig. 4A,B). Treatment with 10 μM FSK and 100 μM CI-1044 for 30 min did not change the expression level nor the size of the SK3 protein (Fig. 4A, B). Following proteinase K treatment, almost all of this 75 kDa-band was converted to a product with an apparent molecular mass of 45 kDa both in control untreated- and cAMP elevating agents' treated-cells. Same results were observed in HEK-SK3T cells treated with 100 nM Iso plus 100 μM CI-1044 (data not shown). This demonstrates that the majority of the SK3 proteins were expressed at the plasma membrane and that increasing [cAMP] did not change SK3 protein expression and localization at the plasma membrane. Membrane fractionation experiments confirm the localization of SK3 protein in plasma membrane and more precisely into lipid rafts (Fig. 4C). Same results were obtained for Orai1 protein (Fig. 4C) consistent with a co-localization of a SK3-Orai1 complex in lipid rafts [7]. Interestingly, FSK plus CI-1044 treatment displaced Orai1 protein outside of lipid rafts in contrast to SK3 that remained in the lipid rafts fractions (Fig. 4C).

cAMP elevating agents act by activating PKA but not PKG

To test a potential role of PKA or PKG in the inhibitory effect of cAMP on SK3 channels, we used KT 5720 and KT 5823 which are PKA and PKG inhibitors, respectively. Cells were treated for 30 min with these compounds before testing FSK and CI-1044 on SK3 currents and on constitutive Ca^{2+} entry. Figure 5A shows that FSK with CI-1044 still reduced SK3 currents amplitude of HEK293T-rSK3 cells in the presence of KT 5823 as observed in control condition (without KT 5823). Surprisingly, in the presence of KT 5720, SK3 currents amplitude was not reduced but increased by FSK plus CI-1044. Most of this increase was transient although SK3 current amplitude remained slightly higher at steady state compared to control conditions (Fig. 5A). Same experiments were performed on constitutive Ca^{2+} entry of MDA-MB-435s cells (Fig 5B). Whereas KT 5823 had no significant effect compared to control conditions, KT 5720 reduced by 50% the inhibitory effect of FSK plus CI-1044 on MDA-MB-435s Ca^{2+} entry (Fig. 5B). All of these results strongly suggest that cAMP elevating agents reduced SK3 current amplitude and Ca^{2+} entry by activating PKA but not PKG.

Discussion

Although cAMP is known to regulate a large number of ion channels, this study is the first to demonstrate that stimulation of cAMP-PKA pathway reduces the activity of SK3 channels. In addition the stimulation of these pathway disrupted SK3-Orai1 complexes and impaired the constitutive Ca^{2+} entry and cell migration. Taken together, our results reveal a hitherto unknown regulation of SK3 channel by cAMP-PKA and its consequence in regulation of cancer cell migration.

Isoprenaline, forskolin and PDE4 inhibitors alone or in combination are well known conditions that induce robust increases of [cAMP] in various cells including HEK cells [44]. These conditions remarkably reduced the amplitude of SK3 current recorded in HEK-293T-rSK3 cells and inMDA-MB-435s cells. The mechanism by which cAMP causes a decrease in SK3 channel activity may involve direct binding of cAMP to SK3 channel or an intermediate protein activated by cAMP such as PKA, PKG phosphorylations. A direct binding of cAMP is unlikely because SK3 channels do not possess a cyclic nucleotide binding domain like that observed for cyclic nucleotide-gated channels and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels [17]. In contrast, several amino acid residues were predicted as candidate for PKA phosphorylation sites in the amino-terminal and carboxyl-terminal regions of SK3 channel alpha subunit (found using www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/). PKA phosphorylation was found to modulate KCa channels, either increasing or decreasing their activities. [cAMP] elevation increases the open probability of BKCa channel, a mechanism that depends on PKA [9, 11, 34] but also on PKG through the cross-activation of PKG by cAMP [2]. Here, a cross-activation of PKG by

cAMP is unlikely since the inhibition of PKG by KT 5823 did not affect the efficiency of cAMP elevating agents to reduce SK3 channel activity and Ca^{2+} entry. In addition, we found no putative PKG phosphorylation sites within the SK3 amino acid sequence (www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/). IKCa channels activity was found to be inhibited following [cAMP] elevation by direct PKA phosphorylation of the channel [26]. Here, we observed a major role of PKA since the inhibition of PKA by KT 5720 reduced by 50% the efficiency of cAMP elevating agents to inhibit the constitutive Ca^{2+} entry and abolished or even reversed to some extent their effect on SK3 channel activity (small activation instead of inhibition). Concerning SKCa channels, [cAMP] elevation was only found to reduce SK2 activity by decreasing the plasma membrane localization of SK2 through PKA phosphorylation on the three amino acid residues, Ser568, Ser569 and Ser570 [37]. Note that none of the PKA phosphorylation sites described in the SK2 carboxyl-terminal domain (RX1–2(S/T)X) are found conserved in the amino acid sequence of SK3 channel alpha subunit. To our knowledge, a direct effect of [cAMP] to increase on the open probability of SKCa has never been described. It is unlikely that cAMP acts on SK3 channel activity by decreasing its plasma membrane localization since proteinase K and fractionation experiments demonstrate that [cAMP] elevation did not change the expression of SK3 protein nor its localization in lipid-raft domains of the plasma membrane. Altogether, our data strongly suggest that cAMP decreases SK3 activity by a PKA-mediated phosphorylation of the channel or a closely associated protein.

We investigated whether cAMP elevating agents might alter Ca^{2+} entry, and more precisely a constitutive Ca^{2+} entry and the migration of cancer cells. The phosphorylation of SK3 channel and the displacement of Orai1 channel outside lipid rafts are two mechanisms that could explain the reduction of the constitutive Ca^{2+} entry and cell migration. Our recent findings revealed a novel signaling pathway in which the SK3-Orai1 complex elicited a constitutive and store-independent Ca^{2+} -signaling controlling SK3-dependent cancer cell migration [7]. A role for SK3 channel in this complex is to generate negative membrane potentials (K^+ efflux) that result in a stronger electrochemical driving force for Ca^{2+} , leading to an increase in constitutive Ca^{2+} entry through Orai1 channel (Fig. 6A). cAMP elevating agents, by activating PKA, decrease SK3 channel activity and depolarize the plasma membrane, thus, by itself is sufficient to reduce the constitutive Ca^{2+} entry and the SK3-dependent cancer cell migration. This would break the positive feedback loop that exists between Orai1 and SK3 channels: the decrease in Ca^{2+} entry through Orai1 reduces the activity of the Ca^{2+} -dependent SK3 channels, leading to a more positive membrane potential (Fig. 6B). In parallel, cAMP elevating agents displaced Orai1 protein outside lipid rafts. We have shown that a delocalization of one of the two partners of SK3-Orai1 complex was sufficient to suppress SK3-dependent Ca^{2+} entry and SK3-dependent migration [7]. Thus, the delocalization

of Orai1 by cAMP away from lipid rafts is another mechanism that could explain, by itself, the reduction of the Ca^{2+} entry and cancer cell migration regulated by SK3-Orai1 complex (Fig. 6C). These two action mechanisms of cAMP elevating agents are probably linked. Indeed, [cAMP] elevation may reduce the interactions between SK3 and Orai1 channels probably through PKA phosphorylations of SK3 and/or Orai1 proteins leading to a move of Orai1 outside lipid rafts. It is established that such interaction occurs between ion channel such as SK2 and Ca(v)1.3 channels or hERG and KCNQ1 channels [22, 31]. Interestingly, if direct interactions between hERG and KCNQ1 have been found, this interplay action was reduced by cAMP elevation [31]. Further studies are needed to delineate the contribution of PKA-mediated effects on SK3-Orai1 interaction. Nevertheless, the results described here represent the first description of a [cAMP] regulation of interplay between SK3 and Orai1 channels.

Results from previous studies reported both a reduction and a stimulation of breast cancer cell migration, including for MDA-MB-435s, following [cAMP] elevation [28-30, 32, 41]. This discrepancy could be explained by the localization of [cAMP] variations, providing a spatial and temporal cAMP-PKA-activity that differentially influences Rac and RhoA function [28]. Indeed, PKA is required for Rac activation by chemo-attractants as well as beta1 integrins, a function that contrasts with its inhibition of RhoA [28]. Interestingly, membrane-associated PKA activity was found to be highest in the leading edge of migrating cells compared to the rear of migrating cells [20]. These data, in addition to those demonstrating that intracellular Ca^{2+} concentration is lower in the leading edge than in the rear of the migrating cells [4, 39], strongly suggest a spatial SK3 channel activity in migrating cancer cells with a higher activity in the back of the migrating cells compared to the front. A spatial KCa activity has already been observed for IKCa channels which are found to be more active at the rear part in cell migration than at the cell front [40].

In conclusion, cAMP-PKA activation reduces SK3 channel activity, leading to a decrease of the lipid raft SK3-Orai1 complex dependent Ca^{2+} entry and cancer cell migration. As SK3-Orai1 complex affects the ability of cancer cell to form bone metastases, these results underscore an innovative opportunity to use [cAMP] elevating agents to inhibit bone metastasis.

Acknowledgements

This work was funded by “University of Tours”, “Région Centre”, “INSERM”, “Ligue Contre le Cancer”, “Cancéropôle Grand Ouest” and ANR grant 2010 BLAN 1139-01 (to GV). Lucie Clarysse held fellowships from the “Région Centre” and “INSERM” and Maxime Gueguinou from “Région Centre”.

We thank Aurore Douaud-Lecaille and Isabelle Domingo for technical assistance and Catherine Leroy for secretarial support.

References

1. Arcangeli A, Crociani O, Lastraioli E, Masi A, Pillozzi S, Becchetti A (2009) Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Curr Med Chem* 16:66-93
2. Barman SA, Zhu S, Han G, White RE (2003) cAMP activates BKCa channels in pulmonary arterial smooth muscle via cGMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L1004-1011
3. Brouard T, Chantome A (2011) Automatic nuclei cell counting in low-resolution fluorescence images. *Computational Vision and Medical Image Processing: recent trends - Springer Netherlands* 311-326
4. Brundage RA, Fogarty KE, Tuft RA, Fay FS (1991) Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* 254:703-706
5. Burnouf C, Auclair E, Avenel N, Bertin B, Bigot C, Calvet A, Chan K, Durand C, Fasquelle V, Feru F, Gilbertsen R, Jacobelli H, Kebsi A, Lallier E, Maignel J, Martin B, Milano S, Ouagued M, Pascal Y, Pruniaux MP, Puaud J, Rocher MN, Terrasse C, Wrigglesworth R, Doherty AM (2000) Synthesis, structure-activity relationships, and pharmacological profile of 9-amino-4-oxo-1-phenyl-3,4,6,7-tetrahydro[1,4]diazepino[6, 7,1-hi]indoles: discovery of potent, selective phosphodiesterase type 4 inhibitors. *J Med Chem* 43:4850-4867
6. Calaghan S, Kozera L, White E (2008) Compartmentalisation of cAMP-dependent signalling by caveolae in the adult cardiac myocyte. *Journal of molecular and cellular cardiology* 45:88-92
7. Chantome A, Potier-Cartreau M, Clarysse L, Fromont G, Marionneau-Lambot S, Gueguinou M, Pages JC, Collin C, Oullier T, Girault A, Arbion F, Haelters JP, Jaffres PA, Pinault M, Besson P, Joulin V, Bougnoux P, Vandier C (2013) Pivotal Role of the Lipid Raft SK3-Orai1 Complex in Human Cancer Cell Migration and Bone Metastases. *Cancer Res* 73:4852-4861

8. Choi S, Kim MY, Joo KY, Park S, Kim JA, Jung JC, Oh S, Suh SH (2012) Modafinil inhibits K(Ca)_{3.1} currents and muscle contraction via a cAMP-dependent mechanism. *Pharmacol Res* 66:51-59
9. Chung SK, Reinhart PH, Martin BL, Brautigan D, Levitan IB (1991) Protein kinase activity closely associated with a reconstituted calcium-activated potassium channel. *Science* 253:560-562
10. Cuddapah VA, Sontheimer H (2011) Ion channels and transporters [corrected] in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 301:C541-549
11. Esguerra M, Wang J, Foster CD, Adelman JP, North RA, Levitan IB (1994) Cloned Ca(2+)-dependent K⁺ channel modulated by a functionally associated protein kinase. *Nature* 369:563-565
12. Faber ES, Delaney AJ, Power JM, Sedlak PL, Crane JW, Sah P (2008) Modulation of SK channel trafficking by beta adrenoceptors enhances excitatory synaptic transmission and plasticity in the amygdala. *J Neurosci* 28:10803-10813
13. Gerlach AC, Gangopadhyay NN, Devor DC (2000) Kinase-dependent regulation of the intermediate conductance, calcium-dependent potassium channel, hIK1. *J Biol Chem* 275:585-598
14. Girault A, Haelters JP, Potier-Cartereau M, Chantome A, Jaffres PA, Bougnoux P, Joulin V, Vandier C (2012) Targeting SKCa channels in cancer: potential new therapeutic approaches. *Curr Med Chem* 19:697-713
15. Girault A, Haelters JP, Potier M, Chantome A, Pinault M, Marionneau-Lambot S, Oullier T, Simon G, Couthon-Gourves H, Jaffres PA, Corbel B, Bougnoux P, Joulin V, Vandier C (2011) New alkyl-lipid blockers of SK3 channels reduce cancer-cell migration and occurrence of metastasis. *Curr Cancer Drug Targets* 11:1111-1125
16. Hayashi M, Kunii C, Takahata T, Ishikawa T (2004) ATP-dependent regulation of SK4/IK1-like currents in rat submandibular acinar cells: possible role of cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C635-646
17. Hofmann F, Biel M, Kaupp UB (2005) International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and structure-function relationships of cyclic nucleotide-regulated channels. *Pharmacol Rev* 57:455-462
18. Howe AK (2004) Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochim Biophys Acta* 1692:159-174
19. Ishii TM, Maylie J, Adelman JP (1997) Determinants of apamin and d-tubocurarine block in SK potassium channels. *J Biol Chem* 272:23195-23200

20. Lim CJ, Kain KH, Tkachenko E, Goldfinger LE, Gutierrez E, Allen MD, Groisman A, Zhang J, Ginsberg MH (2008) Integrin-mediated protein kinase A activation at the leading edge of migrating cells. *Mol Biol Cell* 19:4930-4941
21. Lin MT, Lujan R, Watanabe M, Adelman JP, Maylie J (2008) SK2 channel plasticity contributes to LTP at Schaffer collateral-CA1 synapses. *Nat Neurosci* 11:170-177
22. Lu L, Zhang Q, Timofeyev V, Zhang Z, Young JN, Shin HS, Knowlton AA, Chiamvimonvat N (2007) Molecular coupling of a Ca²⁺-activated K⁺ channel to L-type Ca²⁺ channels via alpha-actinin2. *Circ Res* 100:112-120
23. Maciaszek JL, Soh H, Walikonis RS, Tzingounis AV, Lykotrafitis G (2012) Topography of native SK channels revealed by force nanoscopy in living neurons. *J Neurosci* 32:11435-11440
24. Matthiesen K, Nielsen J (2011) Cyclic AMP control measured in two compartments in HEK293 cells: phosphodiesterase K(M) is more important than phosphodiesterase localization. *PLoS One* 6:e24392
25. Monaghan AS, Benton DC, Bahia PK, Hosseini R, Shah YA, Haylett DG, Moss GW (2004) The SK3 subunit of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels interacts with both SK1 and SK2 subunits in a heterologous expression system. *J Biol Chem* 279:1003-1009
26. Neylon CB, D'Souza T, Reinhart PH (2004) Protein kinase A inhibits intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 448:613-620
27. Nikolaev VO, Bunemann M, Hein L, Hannawacker A, Lohse MJ (2004) Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation. *J Biol Chem* 279:37215-37218
28. O'Connor KL, Mercurio AM (2001) Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. *J Biol Chem* 276:47895-47900
29. O'Connor KL, Nguyen BK, Mercurio AM (2000) RhoA function in lamellae formation and migration is regulated by the alpha6beta4 integrin and cAMP metabolism. *J Cell Biol* 148:253-258
30. O'Connor KL, Shaw LM, Mercurio AM (1998) Release of cAMP gating by the alpha6beta4 integrin stimulates lamellae formation and the chemotactic migration of invasive carcinoma cells. *J Cell Biol* 143:1749-1760
31. Organ-Darling LE, Vernon AN, Giovanniello JR, Lu Y, Moshal K, Roder K, Li W, Koren G (2013) Interactions between hERG and KCNQ1 alpha-subunits are mediated by their COOH termini and modulated by cAMP. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304:H589-599

32. Paulucci-Holthauzen AA, Vergara LA, Bellot LJ, Canton D, Scott JD, O'Connor KL (2009) Spatial distribution of protein kinase A activity during cell migration is mediated by A-kinase anchoring protein AKAP Lbc. *J Biol Chem* 284:5956-5967
33. Pellegrino M, Pellegrini M (1998) Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous cAMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch* 436:749-756
34. Perry MD, Sandle GI (2009) Regulation of colonic apical potassium (BK) channels by cAMP and somatostatin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297:G159-167
35. Potier M, Chantome A, Joulin V, Girault A, Roger S, Besson P, Jourdan ML, LeGuennec JY, Bougnoux P, Vandier C (2011) The SK3/K(Ca)_{2.3} potassium channel is a new cellular target for edelfosine. *Br J Pharmacol* 162:464-479
36. Potier M, Joulin V, Roger S, Besson P, Jourdan ML, Leguennec JY, Bougnoux P, Vandier C (2006) Identification of SK3 channel as a new mediator of breast cancer cell migration. *Mol Cancer Ther* 5:2946-2953
37. Ren Y, Barnwell LF, Alexander JC, Lubin FD, Adelman JP, Pfaffinger PJ, Schrader LA, Anderson AE (2006) Regulation of surface localization of the small conductance Ca²⁺-activated potassium channel, Sk2, through direct phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 281:11769-11779
38. Schwab A, Fabian A, Hanley PJ, Stock C (2012) Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiological reviews* 92:1865-1913
39. Schwab A, Finsterwalder F, Kersting U, Danker T, Oberleithner H (1997) Intracellular Ca²⁺ distribution in migrating transformed epithelial cells. *Pflugers Arch* 434:70-76
40. Schwab A, Gabriel K, Finsterwalder F, Folprecht G, Greger R, Kramer A, Oberleithner H (1995) Polarized ion transport during migration of transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Pflugers Arch* 430:802-807
41. Spina A, Di Maiolo F, Esposito A, Sapio L, Chiosi E, Sorvillo L, Naviglio S (2012) cAMP Elevation Down-Regulates beta3 Integrin and Focal Adhesion Kinase and Inhibits Leptin-Induced Migration of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *BioResearch open access* 1:324-332
42. Syme CA, Hamilton KL, Jones HM, Gerlach AC, Giltinan L, Papworth GD, Watkins SC, Bradbury NA, Devor DC (2003) Trafficking of the Ca²⁺-activated K⁺ channel, hIK1, is dependent upon a C-terminal leucine zipper. *J Biol Chem* 278:8476-8486

43. Trautwein W, Hescheler J (1990) Regulation of cardiac L-type calcium current by phosphorylation and G proteins. *Annu Rev Physiol* 52:257-274
44. Xin W, Tran TM, Richter W, Clark RB, Rich TC (2008) Roles of GRK and PDE4 activities in the regulation of beta2 adrenergic signaling. *J Gen Physiol* 131:349-364

Figure Legends

Fig. 1. [cAMP] increase reduced SK3 currents in HEK-293T-rSK3 cells. Currents were generated by ramp protocol from -100 mV to +100 mV (only currents recorded from -100 to +65 mV are shown in A and from -90 to +90 mV are shown in E) in 500 ms from a constant holding of 0 mV and with a pCa 6. **A**, Example of whole-cell K⁺ currents recorded in HEK293T cells expressing recombinant rat SK3 in control condition and after the sequential addition of 100 μM CI-1044, 100 nM Isoprenaline (Iso) and 100 nM apamin. **B**, Representative time response inhibition of 100 μM CI-1044, 100 nM Iso and 100 nM apamin on SK3 currents recorded at 0 mV. The inset represents histograms showing the effect of 100 μM CI-1044, 100 nM Iso and 100 nM apamin on SK3 current amplitudes. Means, bars, sem, n=4, *p<0.05 Kruskal Wallis test and Dunnet's post hoc. **C**, Dose-response inhibition of SK3 currents amplitude by Iso recorded with 100 μM CI-1044. The IC₅₀ is the concentration of Iso where the amplitude of SK3 current is reduced by half (n=5 cells, IC₅₀= 57.91 ± 8.47 nM). **D**, Histograms showing the effect of sequential addition of 10 μM forskolin (FSK), 100 μM CI-1044 and then 100 nM apamin on SK3 current amplitudes recorded at 0 mV. Means, bars, sem, n=4, ***p<0.001 Kruskal Wallis test and Dunnet's post hoc. **E**, Example of whole-cell K⁺ currents recorded in HEK293T-rSK3 before and after application of 10 μM FSK plus 100 μM CI-1044.

Figure 2. [cAMP] measurements using FRET assays and effect of [cAMP] increase on SK3 currents of MDA-MB-435s cells. **A**, The graph illustrates a representative cAMP measurement with Epac2-camps in a single MDA-MB-435s. Stimulation with 10 μM FSK strongly increased the CFP/YFP ratio and the effect was rapidly reversed upon washout of the drug. The histogram shows the percent increase of the ratio, normalized to baseline, in response to 10 μM FSK (Mean, bars, columns, n = 10, Wilcoxon test **p<0.002). **B**, Left, Representative time course of current recorded at 0 mV in control condition and in the presence of 10 μM FSK plus 100 μM CI-1044. The inset represent a

current-voltage relation (+ 60, +20 mV, HP 0 mV) in control condition and in the presence of 10 μ M FSK plus 100 μ M CI-1044. To fully block BKCa currents 100 nM IbTx was added in the external solutions. Right, histograms represent the mean of relative currents recorded at 0 mV with or without 10 μ M FSK plus 100 μ M CI-1044 (Mean, bars, sem, n=6, **p<0.01 Mann Whitney Test).

Figure 3. cAMP elevating agents reduced SK3-dependent cell migration and constitutive Ca^{2+} entry in MDA-MB-435s cells. **A**, Histograms showing the effect of 10 μ M FSK plus 100 μ M CI-1044 on the migration of MDA-MB-435s cells. The normalized cell number corresponds to the ratio of total number of migrating cells in presence of drugs / total number of migrating cells in control experiments. Results are expressed as mean \pm S.E.M. *** significantly different from control at p =0.001 (N = 3, n = 9, Mann Whitney test). **B, left**, Time dependent fluorescence measurement of constitutive Ca^{2+} entry recorded in MDA-MB-435s cells. **Right**, Histograms showing steady-state relative (to control) fluorescence to Ca^{2+} entry in control conditions or in the presence of 10 μ M FSK plus 100 μ M CI-1044. Data are means \pm S.E.M. *significantly different from control at p< 0.05 (N = 5, Mann Whitney test). **C, top**, Histograms showing the number of migrated MDA-MB-435s cells that expressed (SK3⁺ cells) or not SK3 (SK3⁻ cells). **Bottom**, Histograms showing the effect of 10 μ M FSK plus 100 μ M CI-1044 on the migration capacity of SK3⁻ cells (N = 3, n = 9; data normalized to SK3⁻ cells in control condition). **D, top**, Time dependent fluorescence measurement of constitutive Ca^{2+} entry recorded in SK3⁺ and SK3⁻ cells. **Bottom**, Histograms showing the effect of 10 μ M FSK plus 100 μ M CI-1044 on steady-state relative fluorescence to Ca^{2+} entry in SK3⁻ cells (N = 3, n = 9; data normalized to SK3⁻ cells in control condition). ** in **C** and **D** indicated a Significant difference from control at **p< 0.01, Mann Whitney test.

Figure 4. An increase of the cAMP production had no effect on SK3 channel cell surface expression nor on its lipid rafts localization but moved Orai1 outside of lipid rafts. Representative immunoblots of rSK3 channel overexpressed in HEK-293T (**A**) or endogenous hSK3 channel expressed in MDA-MB-435s (**B**) following incubation in the absence (-) or presence (+) of proteinase K. GAPDH was used as loading control. HEK293T-rSK3 and MDA-MB-435s cells were treated with 100 μ M CI-1044 plus 10 μ M FSK for 30 min before proteinase K digestion (30 min of incubation). Proteinase K digestion permit to evaluate the level of SK3 channel expressed in the plasma membrane with detection of SK3 cleavage product (~ 45 KDa). **C**, Immunoblots representing membrane fractionation on a sucrose gradient of MDA-MB-435s cells treated or not

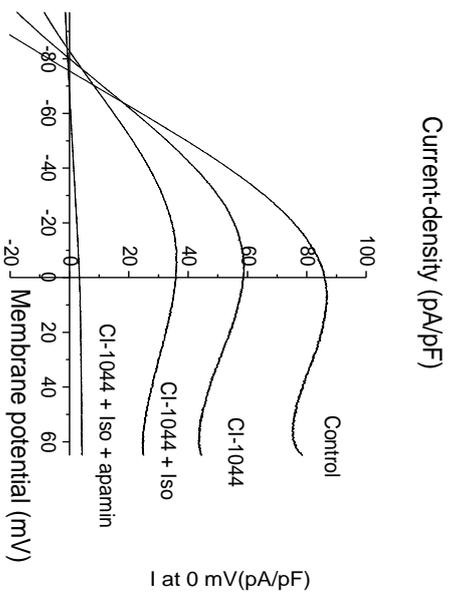
with 10 μM FSK plus 100 μM CI-1044 for 45 min. Beta adaptin is a protein used as non-lipid rafts marker and caveolin-1 is a marker of lipid-raft fractions.

Figure 5. cAMP elevating agents reduced SK3 current and constitutive Ca^{2+} entry by activating PKA but not PKG. Cells were treated for 30 min with KT5823 and KT5720 before patch-clamp and Ca^{2+} entry recordings and were continuously perfused with these drugs during SK3 currents and Ca^{2+} entry recordings. **A**, Time response measurements of whole-cell SK3 currents recorded in HEK-293T cells expressing rat SK3 at membrane potential 0 mV in the presence of 1 μM KT5823 (left) or 5 μM KT5720 (middle) and after the sequential addition of 10 μM FSK plus 100 μM CI-1044 and 100 nM apamin. Right, histograms showing the % effect of 10 μM FSK plus 100 μM CI-1044 on SK3 current amplitudes recorded at 0 mV without KT pre-treatment (control) or after pre-treatment with 1 μM KT5823 or 5 μM KT5720. **B**, Time dependent fluorescence measurements of constitutive Ca^{2+} entry recorded in MDA-MB-435s cells in the presence of 1 μM KT5823 (left) or 5 μM KT5720 (middle) and with the addition of 10 μM FSK plus 100 μM CI-1044. Right, histograms showing the % effect of 10 μM FSK plus 100 μM CI-1044 on Ca^{2+} entry without KT pre-treatment (control) or after pre-treatment with 1 μM KT5823 or 5 μM KT5720. Means, bars, sem, $N = 5$ (calcium entry) and $n = 6$ (patch-clamp). Significantly different from control at * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ Kruskal Wallis test and Dunnet's post hoc.

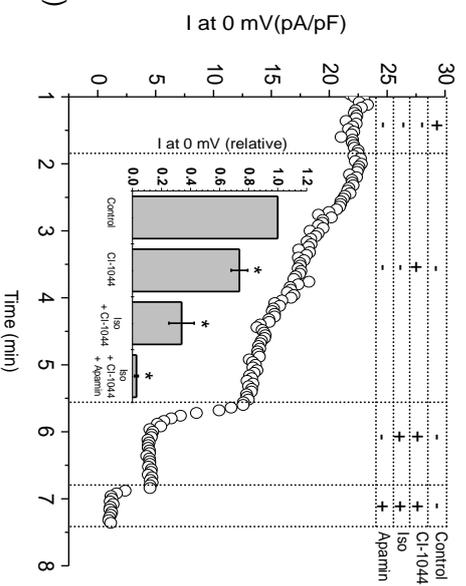
Figure 6. Hypothetic mechanism for cAMP regulation of SK3-Orai1 complex activity. **A**, SK3-Orai1 complex is located in lipid rafts domains in MDA-MB-435s cells resulting in plasma membrane hyperpolarization (by SK3) and constitutive Ca^{2+} entry (by Orai1). SK3 channel hyperpolarizes plasma membrane which increases electrochemical driving force for Ca^{2+} and enhances Ca^{2+} entry through the voltage-independent Ca^{2+} channels Orai1. A positive feedback loop exists in which Ca^{2+} entry further increases the activity of SK3 channel. **B**, The elevation of cAMP induces the phosphorylation of SK3 protein probably through PKA. **C**, This phosphorylation reduces the activity of SK3 channel and allows Orai1 to move outside lipid rafts. Therefore, this decreases the SK3-dependent constitutive Ca^{2+} entry and SK3-dependent cancer cell migration.

Fig 1. Clarysse et al.,

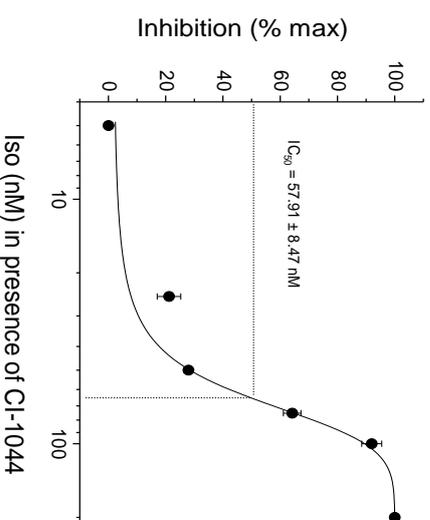
A



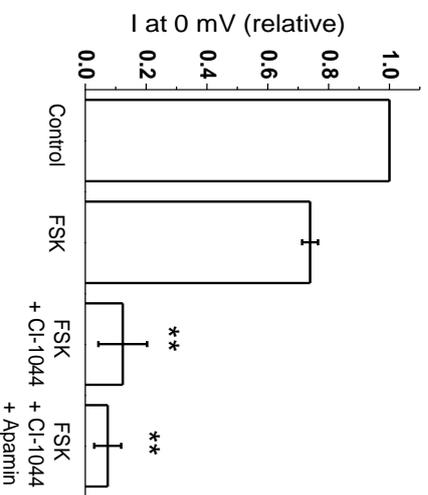
B



C



D



E

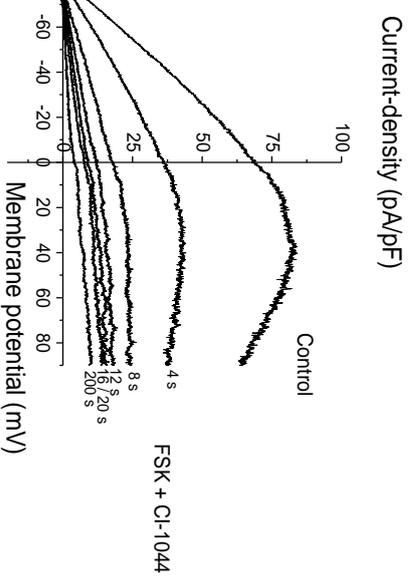
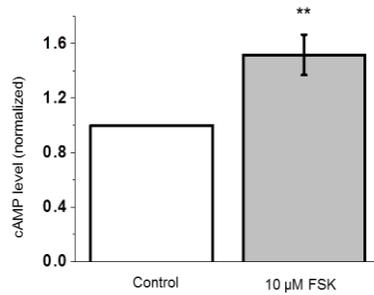
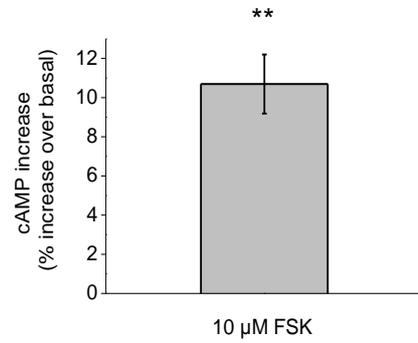
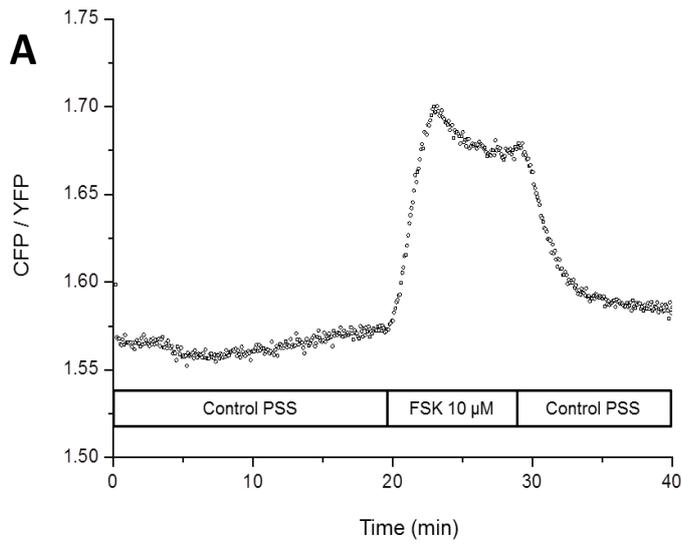
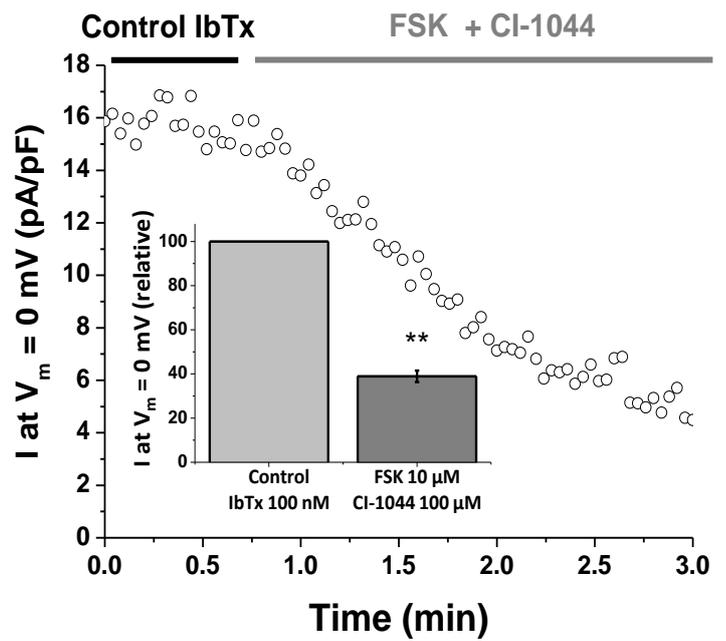
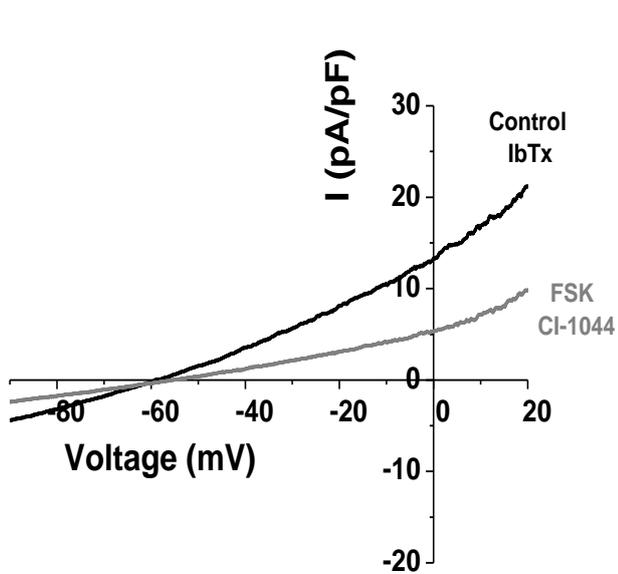


Fig 2. Clarysse et al.,



B



N= 6 **p=0.0022 Mann Withney

Fig 3. Clarysse et al.,

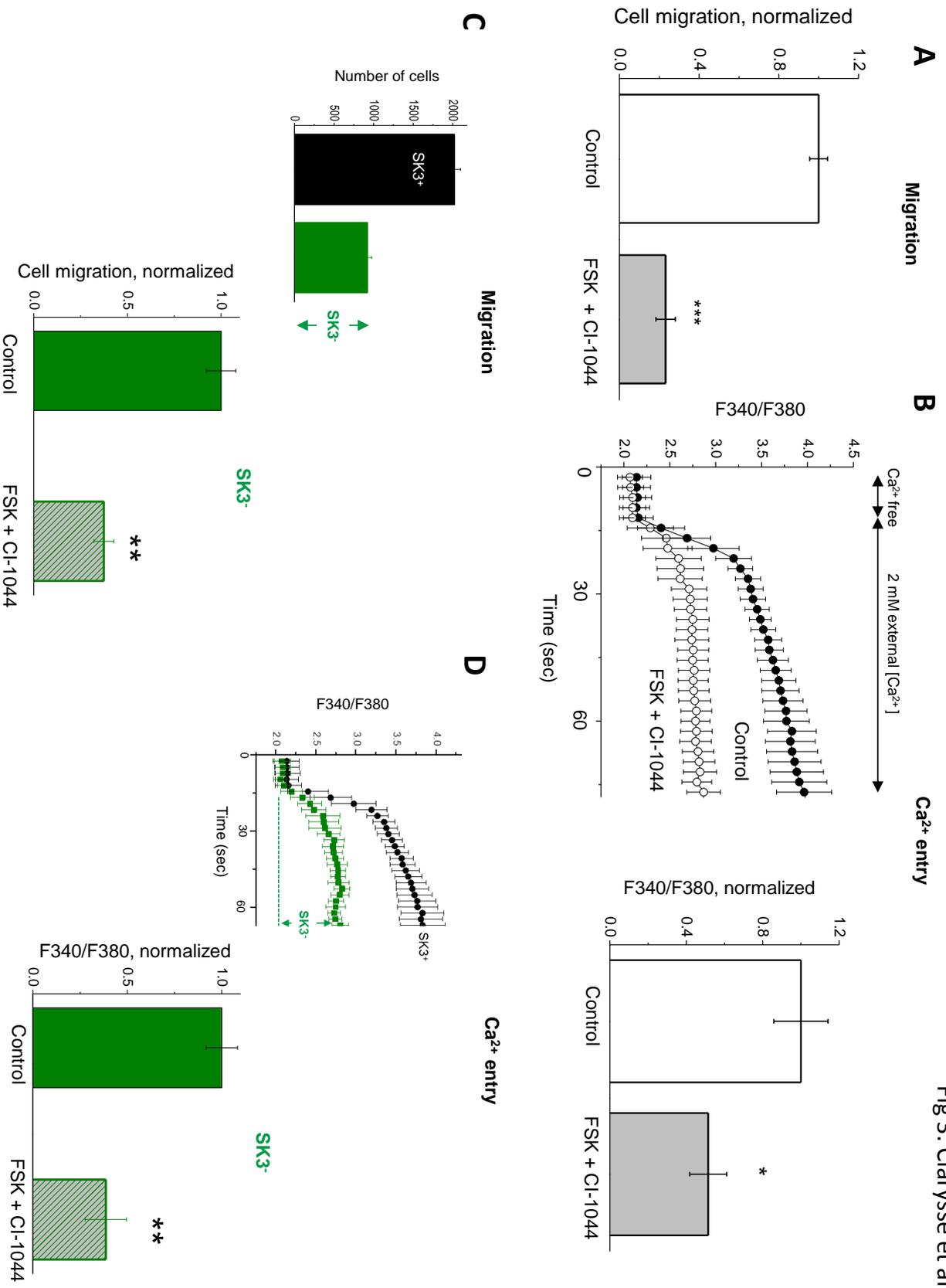
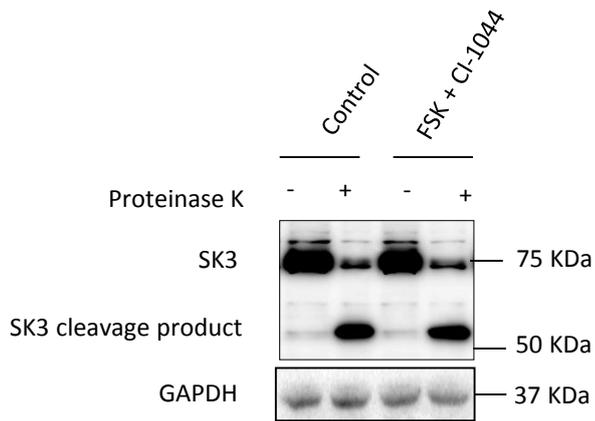


Fig 4. Clarysse et al.,

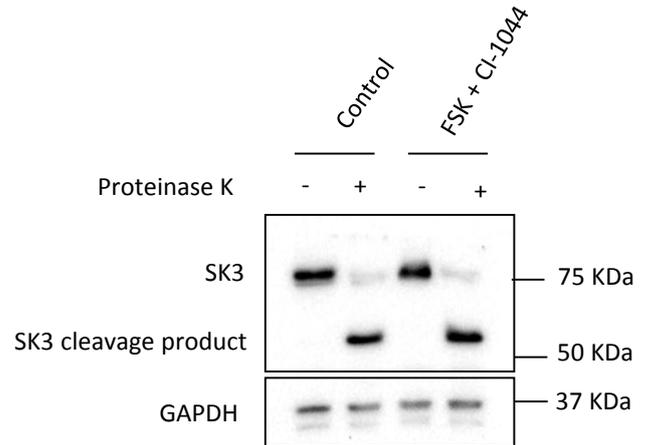
A

HEK-SK3

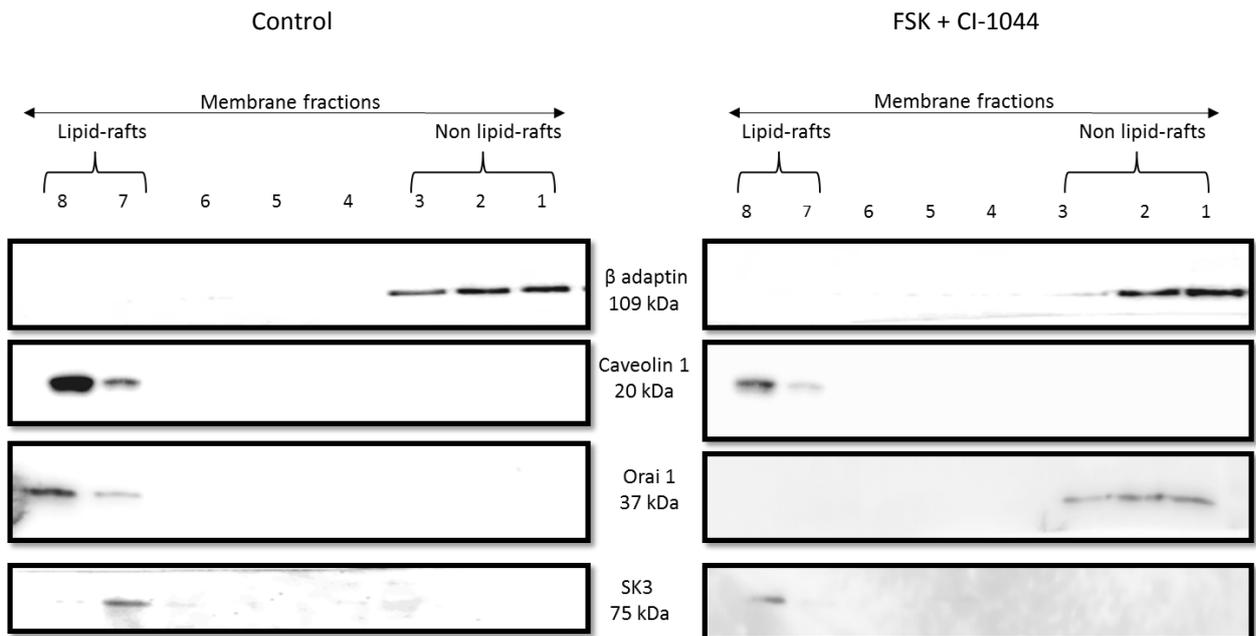


B

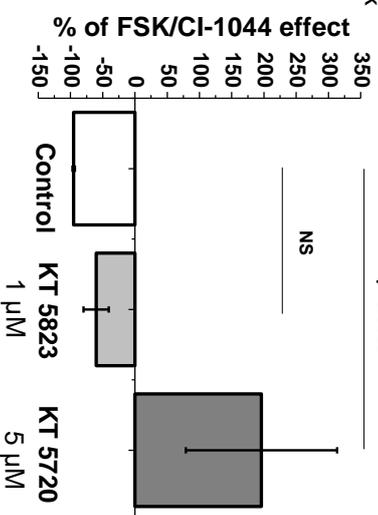
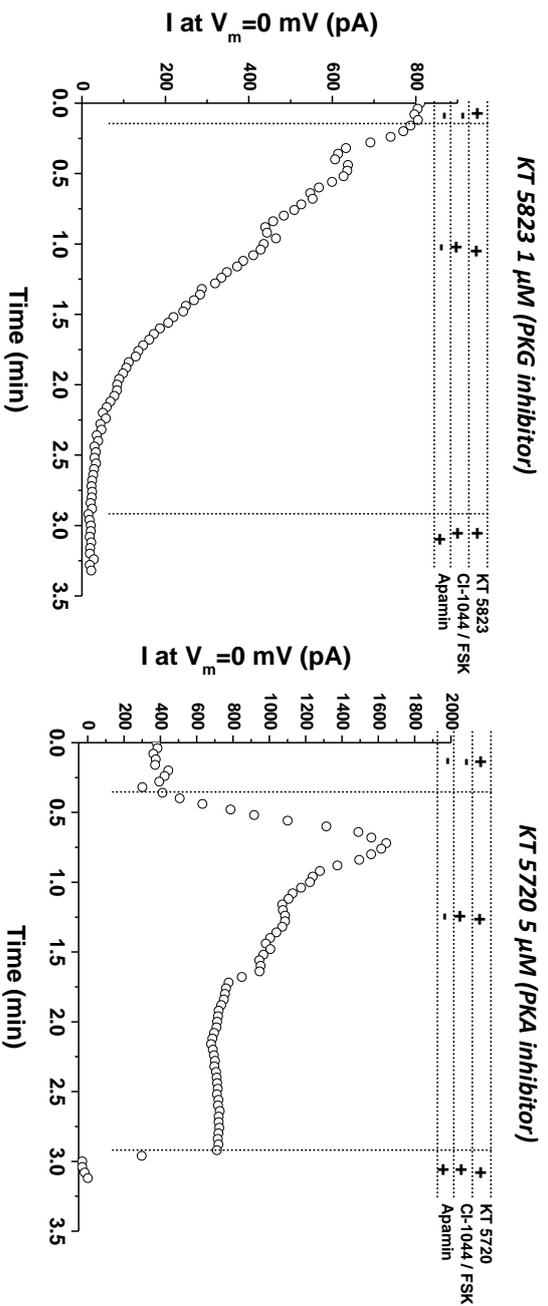
MDA-MB-435s



C



A HEK-SK3



B MDA-MB-435s

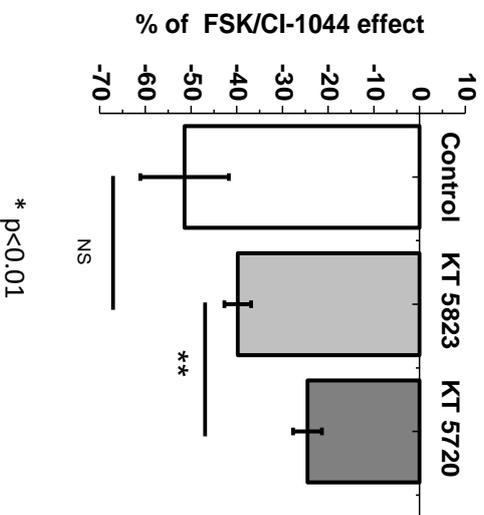
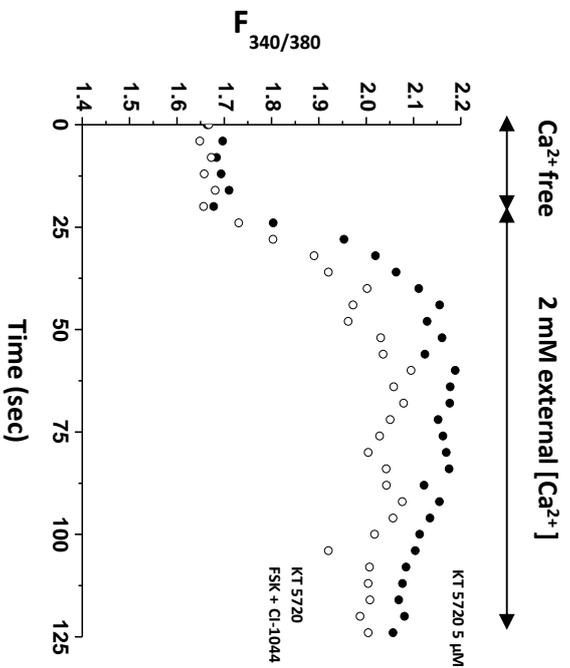
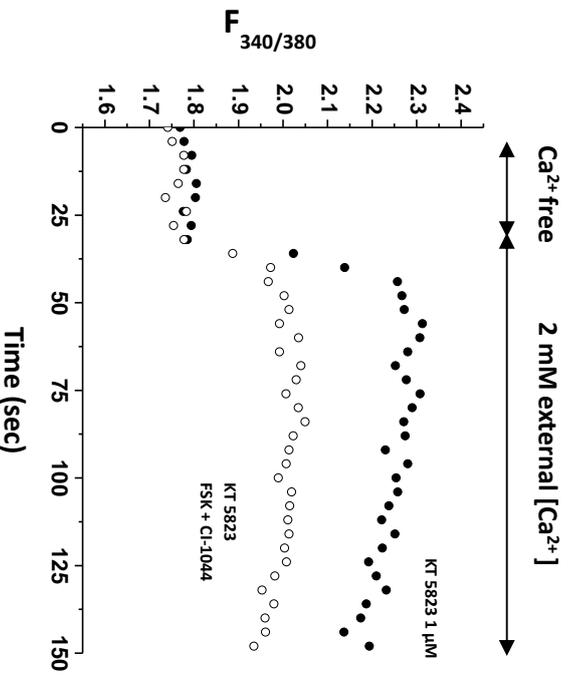
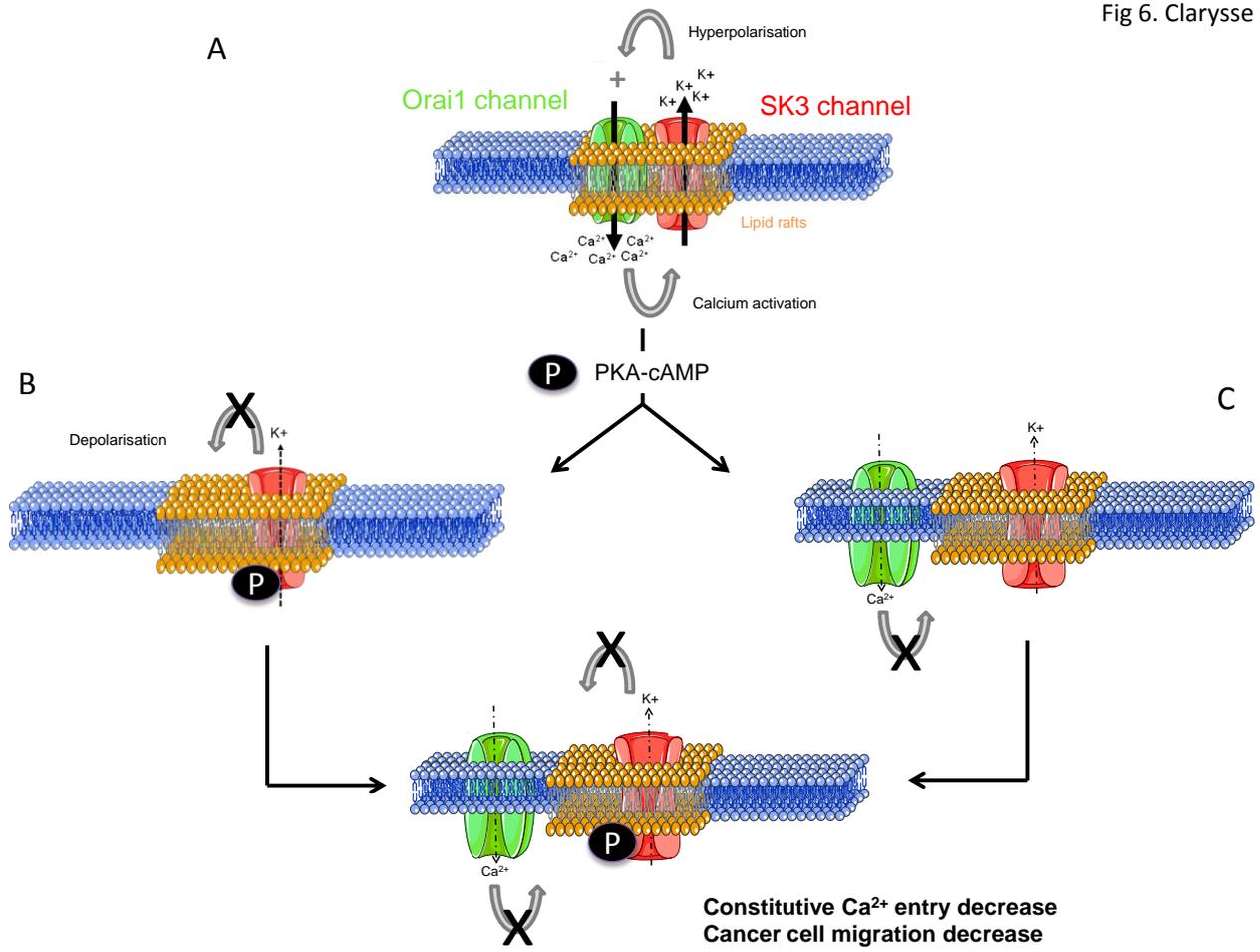


Fig 5. Clarysse et al.,

Fig 6. Clarysse et al.,



Lucie CLARYSSE
**Régulation du canal SK3
par l'AMPc et le calcium
extracellulaire dans les
cellules cancéreuses du sein**

Résumé

Nous avons montré un rôle d'un canal K^+ , le canal SK3, dans la migration des cellules cancéreuses de sein MDA-MB-435s et le développement de métastases ostéolytiques du cancer du sein. Lors de l'ostéolyse, la $[Ca^{2+}]_{ext}$ augmente dans le microenvironnement osseux. Nous avons voulu déterminer si cette élévation de $[Ca^{2+}]_{ext}$ pouvait moduler l'expression et l'activité du canal SK3. Nous avons montré que l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_{ext}$: i) favorise l'expression du canal SK3. Cet effet fait intervenir le récepteur au calcium (CaSR), qui en diminuant la $[AMPc]_{int}$ réduit l'activité de la PKA et lève ainsi son inhibition de la transcription du gène *KCNN3* (codant pour SK3) ; ii) favorise la migration cellulaire dépendante du canal SK3, mécanisme impliquant également le CaSR ; iii) active le canal SK3 qui, par ailleurs, voit son activité réduite par l'élévation d'AMPc intracellulaire. De plus, l'augmentation d'AMPc délocalise un canal calcique partenaire de SK3, le canal Orai1, et diminue l'entrée constitutive de Ca^{2+} et la migration dépendantes du canal SK3. En conclusion, nos résultats montrent que l'expression et l'activité de SK3 sont régulées par l'AMPc et le Ca^{2+} extracellulaire. Ceci permet d'envisager une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant l'AMPc pour le traitement des métastases osseuses du cancer du sein.

Mots clés : SK3, AMPc, Ca^{2+} , CaSR, métastases osseuses, Orai1.

Abstract

We showed that a K^+ channel, SK3 channel, is a mediator of MDA-MB-435s breast cancer cells migration and of osteolytic bone metastasis development of breast cancer. Since $[Ca^{2+}]_{out}$ rises during osteolysis, in bone microenvironment, we study if this $[Ca^{2+}]_{out}$ elevation could modulate SK3 expression and activity. We show that $[Ca^{2+}]_{out}$ elevation: i) increases SK3 expression threw CaSR activation which, in turn, decreases $[cAMP]_{int}$ and PKA activation, leading to loss of its inhibitory effect on *KCNN3* transcription; ii) increases SK3-dependent migration threw CaSR activation; iii) increases SK3 channel activity that is in addition, decreased by $[cAMP]_{int}$ elevation. Furthermore, cAMP elevation moves the Ca^{2+} channel Orai1 (SK3 partner) outside of lipid rafts and reduces the SK3 dependent-constitutive Ca^{2+} entry and cell migration. Our results show that both SK3 expression and activity are regulated by cAMP and extracellular Ca^{2+} . These results underscore an innovative opportunity to use therapeutic approaches targeting cAMP for the treatment of breast cancer bone metastasis.

Mots clés : SK3, cAMP, Ca^{2+} , CaSR, bone metastasis, Orai1.